



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

**VALORIZACIÓN DEL SUBPRODUCTO RAQUIS DE PALMA  
MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPOLÍMERO  
POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)**

Autor

Diana Catalina Arcila Echavarría

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de

Doctorado en Biotecnología

Medellín, Colombia

2021



VALORIZACIÓN DEL SUBPRODUCTO RAQUIS DE PALMA MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DEL  
BIOPOLÍMERO POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Diana Catalina Arcila Echavarría

Informe de tesis doctoral  
como requisito para optar al título de:  
Doctor en Biotecnología

Asesores

Mariana Peñuela Vásquez, PhD., Asesora

Natalia Andrea Gómez Vanegas, PhD., Co-Asesora

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Doctorado en Biotecnología

Medellín, Colombia

2021.

A Dios y la vida por regalarme un logro más, a mi esposo por ser mí fuerza, mi compañero y gran apoyo; a mis hijos: Carlos Andrés, quien ha sido mi gran maestro durante estos años y Emmanuel que llegó para ayudarme a reconocer nuevamente lo importante de la vida. A mi madre y hermano que me han estado acompañando durante todo este proceso. Por último y no me menos importante a mi profesora Natalia Gómez, quien más que mi maestra ha sido una gran amiga y compañera de vida.

## **Agradecimientos**

A la Universidad de Antioquia y a la Facultad de Ciencias Exactas por recibirme de nuevo como miembro de mi alma mater. A la profesora Mariana Peñuela y al grupo de Bioprocesos por su apoyo y brindarme todas las condiciones para realizar mi trabajo de investigación. A mi profesora Natalia Gómez, quien me impulsó para asumir este gran reto, de quien he recibido grandes enseñanzas y quien me ha acompañado incondicionalmente durante todo este proceso; y a todos los docentes, por toda su ayuda y enseñanzas.

También agradezco a la Universidad Santiago de Compostela por recibirme en el CRETUS Institute como miembro del Biogroup y al profesor Thelmo A. Lu Chau por todas sus enseñanzas y acompañamiento en este proceso de formación.

## Tabla de contenido

<b>CAPÍTULO 1 – CAPÍTULO INTRODUCTORIO .....</b>	<b>13</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	14
MARCO TEÓRICO .....	16
<i>Generalidades de polihidroxicanoatos.....</i>	<i>16</i>
<i>Bacterias halófilas para la producción de polihidroxicanoatos.....</i>	<i>17</i>
<i>Rutas metabólicas.....</i>	<i>18</i>
<i>Producción de polihidroxicanoatos y uso de fuentes no convencionales.....</i>	<i>20</i>
<i>Procesos de recuperación de polihidroxicanoatos .....</i>	<i>23</i>
<i>Aplicaciones de los polihidroxicanoatos.....</i>	<i>25</i>
PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	27
<i>Hipótesis.....</i>	<i>27</i>
<i>Sub-hipótesis.....</i>	<i>27</i>
<i>Objetivo General .....</i>	<i>28</i>
<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>28</i>
METODOLOGÍA .....	28
<i>Cepa utilizada y protocolo de mantenimiento.....</i>	<i>28</i>
<i>Medio de cultivo.....</i>	<i>29</i>
<i>Crecimiento bacteriano.....</i>	<i>29</i>
<i>Métodos analíticos.....</i>	<i>30</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>32</i>
<b>CAPÍTULO 2 – EVALUACIÓN DE FUENTES DE CARBONO .....</b>	<b>33</b>
INTRODUCCIÓN .....	34
METODOLOGÍA .....	35
<i>Microorganismo y medio de cultivo.....</i>	<i>35</i>
<i>Preparación del hidrolizado de raquis de palma.....</i>	<i>35</i>
<i>Producción de PHA con sustratos puros.....</i>	<i>36</i>
<i>Producción de PHA con hidrolizado de raquis de palma.....</i>	<i>36</i>
<i>Métodos analíticos.....</i>	<i>36</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
<i>Producción de PHB con sustratos puros.....</i>	<i>36</i>
<i>Producción de PHB con hidrolizado de raquis.....</i>	<i>39</i>
CONCLUSIONES .....	41
<b>CAPÍTULO 3 – EVALUACIÓN DE CONDICIONES NUTRICIONALES Y OPERACIONALES.....</b>	<b>42</b>
INTRODUCCIÓN .....	43
METODOLOGÍA .....	43
<i>Microorganismo y medio de cultivo.....</i>	<i>43</i>
<i>Preparación del hidrolizado de gluten de trigo.....</i>	<i>44</i>
<i>Diseño de experimentos.....</i>	<i>44</i>
<i>Validación de valores máximos definidos para el modelo cuadrático .....</i>	<i>45</i>

<i>Métodos analíticos</i> .....	46
<i>Análisis estadístico</i> .....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
<i>Evaluación de variables operacionales y nutricionales con mayor significancia en la obtención de PHAs (Diseño Plackett Burman)</i> .....	46
<i>Evaluación de variables significativas bajo metodología de superficie de respuesta (Diseño Box Benkhen)</i> .....	49
<i>Validación de valores máximos definidos para el modelo cuadrático</i> .....	51
CONCLUSIONES .....	52
<b>CAPÍTULO 4 – VALORACIÓN DE SUBPRODUCTOS INDUSTRIALES .....</b>	<b>53</b>
INTRODUCCIÓN .....	54
METODOLOGÍA .....	55
<i>Medios de cultivo</i> .....	55
<i>Condiciones operacionales</i> .....	56
<i>Métodos analíticos</i> .....	57
<i>Etapas definidas para la valorización del agua de cocción de mejillones como medio de cultivo para obtención de PHA a partir de Halomonas boliviensis.</i> .....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	59
<i>Obtención de PHA a escala de matraz usando hidrolizado de raquis de palma.</i> .....	59
<i>Obtención de PHAs usando agua de cocción de mejillones hidrolizada.</i> .....	61
CONCLUSIONES .....	66
<b>CAPÍTULO 5 – EVALUACIÓN DE PHA A ESCALA DE BIORREACTOR .....</b>	<b>67</b>
INTRODUCCIÓN .....	68
METODOLOGÍA .....	69
<i>Medio de cultivo</i> .....	69
<i>Condiciones operacionales</i> .....	69
<i>Métodos analíticos</i> .....	69
<i>Recuperación de PHA</i> .....	70
<i>Caracterización de PHA</i> .....	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	71
<i>Obtención de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma a escala de biorreactor.</i> .....	71
<i>Caracterización del PHA obtenido</i> .....	73
<b>CAPÍTULO 6 – CAPÍTULO FINAL .....</b>	<b>76</b>
DISCUSIÓN FINAL.....	77
<i>Conclusiones generales</i> .....	77
<i>Recomendaciones</i> .....	78
BIBLIOGRAFÍA .....	81
ANEXOS.....	87

## Lista de tablas

Tabla 1. Estudios de la incidencia de parámetros nutricionales y operacionales en la obtención de PHB para diferentes microorganismos con fuentes de carbono alternativas	22
Tabla 2. Aplicaciones de los PHAs en diferentes ámbitos productivos. (Adaptada de Masood, Yasin, & Hammed, 2015)	25
Tabla 3. Composición medio de cultivo (Quillaguamán et al., 2008)	29
Tabla 4. Composición química del raquis de palma	35
Tabla 5. Parámetros cinéticos y resultados obtenidos en las cinéticas presentadas en las figuras 2 y 3	38
Tabla 6. Comparación de microorganismos halófilos productores de PHB usando xilosa y arabinosa como la única fuente de carbono.	39
Tabla 7. Comparación de los microorganismos productores de PHA que utilizan diferentes hidrolizados de biomasa como fuente de carbono.	41
Tabla 8. Factores y niveles para evaluar la incidencia en la obtención de PHA a partir de <i>Halomonas boliviensis</i> bajo un diseño <i>Plackett Burman</i> .	44
Tabla 9. Corridas del diseño experimental <i>Plackett Burman</i>	44
Tabla 10. Factores y niveles diseño <i>Box Benkhen</i>	45
Tabla 11. Corridas del diseño experimental <i>Box Benkhen</i> *	45
Tabla 12. Diseño <i>Plackett Burman</i> con sus variables respuestas	46
Tabla 13. ANOVA para Biomasa	47
Tabla 14. ANOVA para PHB	47
Tabla 15. ANOVA para biomasa con factores definidos para diseño <i>Box Benkhen</i>	48
Tabla 16. ANOVA para PHA con factores definidos para diseño <i>Box Benkhen</i>	48
Tabla 17. Diseño <i>Box Benkhen</i> con sus variables respuesta.	49
Tabla 18. ANOVA de los modelos polinomiales de segundo orden ajustados.	50
Tabla 19. Valores de los factores para los máximos de cada variable respuesta.	51
Tabla 20. Medio de cultivo para inóculo	55
Tabla 21. Caracterización agua de cocción de mejillones de conservera zona de Galicia (España)	56
Tabla 22. Comparación ensayos realizados en este estudio	61
Tabla 23. Comparación ensayos realizados en este estudio con fuentes de carbono no convencionales	72

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema general de las rutas metabólicas para la obtención de PHAs. Tomado de (Anjum et al., 2016b).....	20
Figura 2. Cinéticas de fermentación usando fuentes de carbono puras: a) xilosa, b) arabinosa y c) glucosa. Concentración de fuente de carbono (diamante), biomasa (cuadrado) y PHB (triángulo).....	37
Figura 3. Cinética de fermentación usando hidrolizado de raquis de palma como fuente de carbono. Concentración de glucosa (diamante), xilosa (triángulo), biomasa (cuadrado) y PHB (círculo).....	40
Figura 4. Cinética de fermentación validación de las mejores condiciones en medio estándar. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo). ....	51
Figura 5. Cinética de fermentación usando las mejores condiciones en medio usando Hidrolizado de Raquis de Palma e Hidrolizado de Gluten como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente, a escala de matraz. Concentración de glucosa (diamante), xilosa (triángulo), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo).....	60
Figura 6. Crecimiento de <i>H. boliviensis</i> usando como medio de cultivo agua de cocción de mejillones hidrolizada. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado).....	61
Figura 7. Crecimiento de <i>H. boliviensis</i> en agua de cocción de mejillones hidrolizada, con adición de $\text{NaHCO}_3$ y glucosa. a) Sin ajuste de concentración inicial de NaCl. b) Con ajuste de la concentración inicial de NaCl. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado).....	64
Figura 8. Cinética de fermentación en biorreactor a escala de 1L. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo).....	65
Figura 9. Representación esquemática de las técnicas de extracción de PHA evaluadas en este estudio. Elaborado por el autor.....	70
Figura 10. Cinética de fermentación usando las mejores condiciones en medio usando Hidrolizado de Raquis de Palma e Hidrolizado de Gluten como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente, a escala de biorreactor. Concentración de glucosa (diamante), xilosa (estrella), biomasa (cuadrado) y PHA (triángulo).....	71
Figura 11. Espectros obtenidos con las pruebas FTIR, (a) Estándar de PHB de Sigma Aldrich, (b) muestra de biopolímero extraído por solventes cloroformo e hipoclorito, (c) muestra de biopolímero extraído por $\text{CO}_2$ supercrítico.....	74

## Lista de anexos

Anexo 1. Curva de calibración para cuantificación de biomasa <i>Halomonas boliviensis</i> .....	87
Anexo 2. Curva de calibración para cuantificación de proteína método Biuret	87
Anexo 3. Curva de calibración y preparación de reactivos para cuantificación de nitrógeno amoniacal .....	88
Anexo 4. Curva de calibración para cuantificación de azúcares reductores por DNS .....	89
Anexo 5. Protocolo para realizar la curva de calibración de PHA por espectrofotometría .	89
Anexo 6. Curva de calibración para cuantificación de PHB.....	90
Anexo 7. Artículo sometido a revista Waste and Biomass Valorization	90
Anexo 8. Artículo sometido a la revista World Journal of Microbiology and Biotechnology	107

## VALORIZACIÓN DEL SUBPRODUCTO RAQUIS DE PALMA MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DEL BIOPOLÍMERO POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

### Resumen

*Halomonas boliviensis* es una bacteria halófila moderada capaz de crecer utilizando varias fuentes de carbono, y así mismo puede acumular polihidroxitirato (PHB) a partir de sustratos económicos como hidrolizados de biomasa lignocelulósica o no convencionales. La producción de PHB con *H. boliviensis* debe llegar a ser competitiva como los procesos a partir de fuentes petroquímicas. Para que este proceso sea económicamente viable, se necesitan altos rendimientos utilizando los medios de cultivo económicos, por lo cual se deben encontrar las condiciones operacionales y nutricionales que favorezcan la producción de PHB, tales como: pH, temperatura, agitación, concentración de la fuente de carbono y de las fuentes de nutrientes claves en el direccionamiento a la acumulación del material de interés, entre ellos nitrógeno, fósforo y azufre.

Al utilizar hidrolizado de raquis de palma como sustrato no convencional de bajo costo, *H. boliviensis* es capaz de utilizar los azúcares glucosa, xilosa y arabinosa presentes en el hidrolizado, prefiriendo a la glucosa para un mayor crecimiento y acumulación de PHB. Al realizar esta evaluación, se logró alcanzar un contenido de PHB del 38,8 % (m/m) del peso seco de la célula (7,8 g/L) consumiendo 6,5 g/L y 1,0 g/L de glucosa y xilosa, respectivamente, después de 72 horas de fermentación a escala matraz, entre 250 mL y 500 mL.

Para favorecer la acumulación de PHB, en este estudio se determinó que, de seis condiciones experimentales (tres nutricionales y tres operacionales), los valores de los factores que permitían obtener el máximo de biomasa y de PHB fueron: 31 °C, 7,0 y 1,6 g/L para temperatura, pH y concentración inicial de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , respectivamente. La validación de los valores máximos predichos se realizó con un ensayo experimental, obteniendo concentraciones de 9,2 g/L y 6,5 g/L de biomasa y PHB, respectivamente, para observar el porcentaje de desviación con respecto a los valores teóricos de 26 % (m/m) para biomasa y 4 % (m/m) para PHB.

Bajo las condiciones nutricionales y operacionales definidas como mejores condiciones para la obtención de PHB, se realizó la validación usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma y como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten de trigo, presentándose un consumo de glucosa de 11,1 g/L, una concentración máxima de biomasa de 6,4 g/L y una concentración máxima de PHB de 2,3 g/L, para un porcentaje de acumulación de PHB del

35,7 % (m/m); lo que representa un buen comportamiento para la obtención de PHB con *Halomonas boliviensis* usando medios de cultivo económicos.

Finalmente se escaló la producción de PHB a nivel biorreactor de 3 L utilizando *H. boliviensis* bajo las condiciones nutricionales y operacionales definidas anteriormente. Se presentó un consumo de glucosa de 13,1 g/L y de xilosa de 2,0 g/L a partir del hidrolizado de raquis de palma, y se obtuvieron concentraciones finales de biomasa y PHB de 10,6 g/L y 4,1 g/L, respectivamente; lo que representa un porcentaje de acumulación del 45,5 % (m/m).

Es así como en esta tesis doctoral se determinaron las condiciones operacionales y nutricionales que favorecen el proceso de producción de polihidroxibutirato (PHB) a partir de *Halomonas boliviensis* utilizando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma, lo que viabiliza la valorización de este desecho de la industria colombiana de palma de aceite.

**Palabras clave:** Polihidroxibutirato (PHB), *Halomonas boliviensis*, hidrolizado raquis de palma aceitera, diseño *Plackett Burman*, diseño *Box Benkhen*.

## VALORIZATION OF THE EMPTY FRUIT BUNCH BY-PRODUCT FROM THE OIL PALM INDUSTRY FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB)

### Abstract

*Halomonas boliviensis* is a moderate halophilic bacterium, capable of growing using various carbon sources, and accumulate polyhydroxybutyrate (PHB) from inexpensive substrates such as hydrolysates from lignocellulosic biomass or non-conventional sources. The production of PHB with *H. boliviensis* should become as competitive as biopolymers from petrochemical sources. For this process to be economically viable, high yields are needed when using low-cost culture media. Therefore, the operational and nutritional conditions improving the obtaining of PHB must be found, e.g., pH, temperature, agitation, carbon source, and essential nutrient sources, among them, nitrogen, phosphorus, sulfur.

*H. boliviensis* can consume the main reducing sugars from the oil palm empty fruit bunch hydrolysate, a low-cost non-conventional substrate, (i.e., glucose, xylose, and arabinose) where glucose is the preferred sugar for growth Biomass production and PHB accumulation. A 38.8% of PHB content (wt. %) from the dry weight of the cell (7.8 g/L) was obtained, and the consumption of sugars after 72 hours of fermentation at flask scale was 6.5 g/L and 1.0 g/L, of glucose and xylose, respectively.

To increase the accumulation of PHB, six experimental factors (nutritional and operational conditions) were evaluated in this study, biomass and PHB higher values were obtained at: 31 °C, 7.0 and 1.6 g/L of temperature, pH and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , respectively. Validation of the predicted values showed concentrations of 9.2 g/L and 6.5 g/L of biomass and PHB, respectively. A deviation from the theoretical values was 26 (wt. %) for biomass and 4 (wt. %) for PHB.

Under the nutritional and operational conditions defined as the best conditions for obtaining PHB, validation was carried out using as a carbon and nitrogen sources the oil palm empty fruit bunch hydrolysate and hydrolyzed wheat gluten, respectively. Glucose consumption was 11.1 g/L, biomass growth 6.4 g/L, and 2.3 g/L PHB production related to 35.7 (wt. %) of PHB accumulation, which are notable results for the obtaining of PHA with *Halomonas boliviensis* using economic culture media.

Finally, the production of PHB was scaled up to a 3L bioreactor level using *H. boliviensis* under the nutritional and operational conditions defined above. It was show a glucose and xylose consumption of 13.1 g/L and 2.0 g/L from the oil palm empty fruit bunch hydrolysate,

respectively. Final biomass and PHB concentrations of 10.6 g/L and 4.1 g/L were obtained, respectively, leading to a 45.5% PHB accumulation (wt. %).

Thus, in this doctoral thesis the operational and nutritional conditions improving the production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Halomonas boliviensis* using an oil palm empty fruit bunch hydrolysate as carbon source were determined, giving an insight of the potential valorization of this by-product from the Colombian oil palm industry.

**Keywords:** Polyhydroxybutyrate (PHB), *Halomonas boliviensis*, hydrolysate of oil palm empty fruit bunch, Plackett Burman design, Box Benkhen design.

# Capítulo 1 – **CAPÍTULO INTRODUCTORIO**

## Introducción general

En la actualidad se generan una amplia variedad de desechos agroindustriales los cuales son susceptibles de ser aprovechados y valorizados, entre ellos: melazas residuales de la industria azucarera, la lactosa y el ácido láctico de la industria láctea, los alcoholes como metanol y glicerol de la producción de biodiesel, la celulosa hidrolizada (desecho de la industria papelera), la biomasa lignocelulósica de la extracción de jugo de caña o la obtención de aceite de palma; teniendo como premisa evitar el uso de materias primas que compitan con la alimentación humana (Davis et al., 2013; Ghimire et al., 2015).

En este sentido, se logra identificar que Colombia alcanzó a generar para el 2016, alrededor de 874,000 toneladas de biomasa lignocelulósica en el proceso de extracción del aceite de palma (representada por los racimos de frutos vacíos o raquis y la fibra) (Fedepalma, 2017); y para el 2017 reportó un aumento en la producción del 42 % con respecto al 2016, lo que representa alrededor de 1,2 millones de toneladas de residuos generados como biomasa lignocelulósica (Colprensa, 2018). Esto presenta una industria en crecimiento, lo cual ha logrado mantener el país como cuarto productor de aceite de palma a nivel mundial, y primero en América.

Dada la disponibilidad de estos residuos agroindustriales en el país y teniendo en cuenta la posibilidad de valorizarlos al usarlos como materias primas para obtener productos con un mayor valor agregado, es importante toda investigación que pueda ser orientada bajo esta premisa. El material lignocelulósico tiene un gran potencial para la producción de una amplia variedad de productos industriales, entre ellos: papel, maderas, bioetanol, biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (PHAs) y algunos productos de química fina (Obruca et al., 2015).

Específicamente en el caso de los PHAs, los residuos agroindustriales se tienen como sustratos muy promisorios para su producción ya que es un material abundante, económico, no compite con la cadena alimenticia humana, por lo cual aplica para tener un proceso de producción de PHA sostenible. Los PHAs cuentan con un amplio rango de aplicaciones que va desde su uso como *commodities*, plásticos usados de forma masiva como empaques para alimentos, hasta biomateriales usados en medicina, lo que los convierte en un producto de mayor valor agregado, el cual puede ser almacenado por bacterias en un proceso de fermentación. Este puede usar diferentes tipos de materia prima de acuerdo con la ruta metabólica que se pretenda seguir, entre ellos biomasa lignocelulósica.

Partiendo de la presunción de que se puede valorar de manera técnica la fracción celulósica del raquis de palma como fuente de carbono alternativa, renovable y económica para la obtención de PHAs, generando procesos más limpios y amigables con el ambiente. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, este documento presentará la ruta seguida y los resultados obtenidos teniendo como norte la siguiente pregunta: ¿Cómo se podría mejorar la productividad de obtención de PHB a partir de hidrolizados de raquis de palma, variando las condiciones operacionales y nutricionales? Por lo anterior, el documento se estructuró por capítulos, distribuidos de la siguiente manera:

El Capítulo 1 se enfoca en la introducción a la temática, se presenta una revisión bibliográfica de las generalidades de la producción de polihidroxialcanoatos, a través de un análisis de sus propiedades, características de acumulación y especies productoras. Posteriormente, se realiza una revisión sobre las formas alternativas para la acumulación del biopolímero, con especial énfasis en las rutas metabólicas, denotando interés en las fuentes no convencionales que se han estado utilizando y las de potencial aplicación, en miras de las posibilidades en el marco Colombia y las oportunidades de desarrollo. Una vez descrita la situación de las condiciones para acumular PHAs, se introduce la temática de la recuperación del metabolito intracelular, procesos basados en las técnicas convencionales y las propuestas actuales para la eficiente separación de los PHAs. Finalmente, el campo de aplicación de este bioproducto es uno de los puntos que mayor atención atrae porque está relacionado con el mayor valor agregado que puede proponerse a la hora de aprovechar residuos agroindustriales en el país.

En los capítulos posteriores se extendieron los estudios sobre cada etapa de la producción de polihidroxibutirato a partir del hidrolizado de raquis de palma. En el Capítulo 2 se presentan los ensayos para evaluar la capacidad de *Halomonas boliviensis* para obtener PHA a partir de glucosa, xilosa y/o arabinosa como fuentes de carbono, y también a partir del hidrolizado de raquis de palma, evaluando como variables de respuesta el consumo de sustratos, crecimiento de biomasa y acumulación de PHA.

El Capítulo 3 presenta evaluaciones experimentales sobre algunas condiciones nutricionales y operacionales empleando *Halomonas boliviensis* en la búsqueda de la definición de las condiciones que favorecen el proceso de acumulación de PHA. Se evaluaron seis factores, tres nutricionales y tres operacionales de manera simultánea bajo un diseño experimental *Plackett Burman*. Este diseño arrojó que los factores significativos fueron pH, temperatura y concentración inicial de  $K_2HPO_4$ , a partir de éstos se buscaron las mejores condiciones para dichos factores usando un diseño *Box Benkhen*, formulando valores máximos de biomasa y PHB trabajando a 31 °C, pH 7 y 1,6 g/L de  $K_2HPO_4$ . La validación experimental

representó un 74 % y 96 % (m/m) de los valores predichos por el modelo cuadrático para biomasa y PHA, respectivamente.

En el Capítulo 4 se evalúan las condiciones óptimas definidas y validadas en el capítulo 3, trabajando a escala de matraz y usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma que favorezcan crecimiento de biomasa y producción de PHA. En este capítulo, también se evalúa el uso del agua de cocción de mejillones como medio de cultivo para lograr acumulación de PHA a partir de *Halomonas boliviensis*. Siendo ambos sustratos, subproductos industriales con posibilidad de valoración. En el caso del hidrolizado de raquis de palma, se logró un porcentaje de acumulación de PHA de 35,7 % (m/m), valor que representa aproximadamente el 50 % (m/m) del obtenido con el medio estándar, en el cual se usó glucosa pura como fuente de carbono.

En el capítulo 5, se validó a escala biorreactor de 3L el crecimiento de biomasa y obtención de PHA a partir de *Halomonas boliviensis* utilizando hidrolizado de raquis de palma e hidrolizado de gluten de trigo como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El ensayo se mantuvo por 60 horas y se mantuvieron las condiciones de agitación a 300 rpm y flujo de oxígeno de 5 vvm para garantizar el oxígeno disuelto apropiado para la reproducción celular y acumulación de PHA. Bajo estas condiciones, se determinó el porcentaje de acumulación de biopolímero y se confirmó que el material obtenido es un PHA del tipo polihidroxibutirato (PHB).

Finalmente, en el Capítulo 6 se incluye una discusión final de los resultados de la investigación, donde se integran los resultados obtenidos de forma articulada, las conclusiones a las que condujeron y las recomendaciones.

## **Marco teórico**

### **Generalidades de polihidroxicanoatos**

Los polihidroxicanoatos son plásticos biodegradables con propiedades térmicas, fisicoquímicas y mecánicas similares a los polímeros de origen petroquímico. También cuentan con propiedades inherentes a su estructura molecular y proceso de obtención como son: biocompatibilidad, no toxicidad y ser amigable con el ambiente. Todo esto lo convierte en un material promisorio para uso en diferentes aplicaciones, incluso médicas (Anjum et al., 2016a).

De acuerdo con su estructura molecular los PHAs son una familia de biopoliésteres con alrededor de 150 monómeros diferentes para su conformación, tanto con cadenas lineales

como ramificadas, saturadas, insaturadas y aromáticas. Estos termoplásticos son producidos como reserva de fuente de carbono y energía de la bacteria y son acumulados como una inclusión esférica en el citoplasma. Esta producción se da en condiciones de limitación de uno o varios nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, oxígeno, azufre, y con exceso de fuente de carbono (Kaur & Roy, 2015; Leong et al., 2014). Excepcionalmente existe un grupo de bacterias que no requieren de limitación de nutrientes para la síntesis de PHA, entre ellas: *Alcaligenes latus*, una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* y *Escherichia coli* recombinante (Albuquerque & Malafaia, 2017; Anjum et al., 2016a). Muchas de las bacterias tienen la capacidad de acumular hasta un 80 % (m/m) de su peso seco en PHA, pero si se encuentran en condiciones limitantes de fuente de carbono realizarían el proceso de degradación del material (Albuquerque & Malafaia, 2017; Anjum et al., 2016a; Leong et al., 2014).

Para la producción de PHAs actualmente se han reportado cientos de especies de bacterias que pueden ser usadas para este fin, incluso, en algunos casos bacterias modificadas genéticamente. Asimismo, se han reportado algunos trabajos de obtención de este biopolímero a partir de microalgas y de plantas. A la fecha se han reportado alrededor de 90 géneros de especies de bacterias como productores de PHAs, tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas (Anjum et al., 2016a; Rodriguez-Perez et al., 2018). Entre las especies de bacterias usadas para la obtención de PHAs por su capacidad de acumular grandes cantidades de este material se encuentran: *Cupravidus necator*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Halomonas sp.*, *Haloferax sp.*, *Aeromonas sp.*, *Methylobacterium sp.*, *Thermus thermophilus.*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas sp.*, *Zobellella denitrificans*, *Chromobacterium sp.*, *Erwinia sp.*, *E. coli* recombinante (Albuquerque & Malafaia, 2017; Anjum et al., 2016a).

### **Especies halófilas para la producción de polihidroxicanoatos**

*Halomonas sp.*, la primera especie halófila con capacidad de almacenar PHAs, fue descubierta en 1972 por Kirk and Ginzburg, luego de esto muchas otras especies halófilas fueron descubiertas con esta capacidad, entre ellas: *Haloferax mediterranei*, microorganismo capaz de almacenar hasta un 46 % (m/m) de PHBV usando como fuente de carbono glucosa y teniendo como nutriente limitante el fósforo (Melanie et al., 2018). *Halomonas boliviensis*, tolera concentraciones de sal hasta del 25 % (m/v), crece en un rango de temperatura de 0-45 °C y un pH de 6-11, usa como fuente de carbono glucosa, xilosa o sacarosa para obtener PHB con alto peso molecular (Quillaguamán et al., 2010). Otras bacterias de este género han sido identificadas como productoras de PHAs con un gran potencial de disminuir los costos de obtención de dicho producto, entre ellas:

*Halomonas sp. TD01*, acumula hasta un 80 % (m/m) de PHB en glucosa y un 70 % (m/m) sobre biomasa con condiciones limitantes de nitrógeno.

*Halomonas campaniensis* LS21, crece en agua de mar artificial y desechos de cocina, la cual tiene como sustratos celulosa, proteínas, ácidos grasos y almidón. Esta bacteria alcanza una acumulación sobre biomasa de hasta el 26 % (m/m), sin embargo, la cepa modificada genéticamente llega a acumular hasta un 70 % (m/m). El uso de bacterias halófilas para la obtención de PHAs permite disminuir los costos en los procesos de fermentación y extracción ya que al estar en medios con altas concentraciones de sal se previene la contaminación por microorganismos no halófilos, el agua de mar puede ser usada para la preparación del medio de cultivo, son capaces de usar fuentes de carbono no convencionales como desechos y en algunos casos es posible realizar la extracción del material mediante un tratamiento hipo osmótico para permitir la lisis celular. Esto fue confirmado por Koller et al. (2007), al demostrar que el costo de producción de PHBHV a partir de *H. mediterranei* fue un 30 % más bajo que la producción del mismo biopolímero a partir de *Escherichia coli* (Yin et al., 2014).

### **Rutas metabólicas**

En la Figura 1 se presenta un esquema general de las rutas metabólicas para la producción de polihidroxialcanoatos. Las enzimas que participan en la ruta metabólica de obtención de PHAs están agrupadas en 4 categorías, así: las clases I y II son enzimas que consisten en un solo tipo de subunidad (PhaC), de las cuales la clase I utiliza preferentemente tioésteres-CoA de R-3-hidroxiácidos grasos de 3 a 5 átomos de carbono (scl-HAs) mientras la clase II usa los tioésteres-CoA de R-3-hidroxiácidos grasos de 6 a 14 átomos de carbono (mcl-HAs). La clase III está compuesta por dos subunidades PhaC y PhaE, los cuales prefieren los tioésteres-CoA de scl-HAs; la subunidad PhaE no es similar a otra PHA sintasa. La clase IV es similar a la clase III, sin embargo, en lugar de la subunidad PhaE tiene otra, PhaR, la cual ha sido presentada para producción de scl PHAs (Singh et al., 2015; Ray & Kalia, 2016).

De manera general hay 3 rutas metabólicas bien conocidas para la obtención de PHAs, en las cuales se presenta la relación entre la fuente de carbono usada y la composición del monómero obtenido. La ruta metabólica I es la más conocida y es usada por *C. necator*. Esta ruta se da en 3 etapas; en la primera se presenta la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA para formar acetoacetyl-CoA catalizada por la enzima  $\beta$ -ketotiolasa. En la segunda etapa el acetoacetyl-CoA se reduce por acción de la enzima acetoacetyl CoA reductasa (R-3. hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa) para formar la molécula 3-hidroxiacetyl-CoA. En la tercera etapa se da la polimerización, vía esterificación del 3-hidroxiacetyl-CoA en PHA por acción de la enzima PHA-polimerasa, propia de cada microorganismo.

La ruta metabólica II, genera sustratos por oxidación de ácidos grasos que pueden ser polimerizados por la PHA polimerasa de la especie *Pseudomonas*, en esta ruta se presenta la oxidación del trans-2-enoil-CoA a R-hidroxiacil-CoA debido a la acción del R-específico enoil-CoA hidratasa. Esta ruta permite la conformación de copolímeros integrados por PHAs de corta y mediana cadena o de homopolímeros de mediana cadena. Los ácidos grasos son degradados por la remoción de 2 unidades de carbono que se convierten en acetil-CoA, y el remanente es oxidado pasando a la formación del monómero, para lo cual el sustrato específico está en un rango de sustratos con 6 a 14 átomos de carbono, con preferencia por los monómeros de 8, 9 y 10; por esta razón, el monómero obtenido para la conformación del PHA depende directamente de la fuente de carbono empleada.

La ruta metabólica III es de gran interés ya que esta ayuda a la generación de monómeros para la obtención de PHAs a partir de fuentes de carbono económicas tales como glucosa, sacarosa y fructosa (Anjum et al., 2016; Madison & Huisman, 1999).

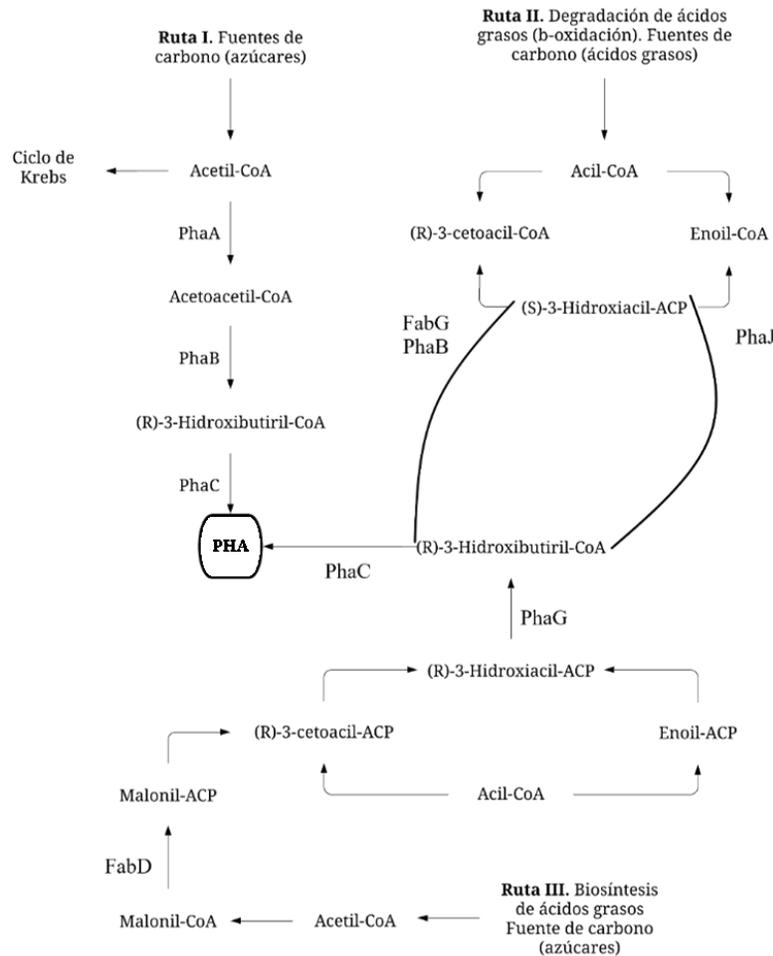


Figura 1. Esquema general de las rutas metabólicas para la obtención de PHAs. Tomado de (Anjum et al., 2016b).

### Producción de polihidroxialcanoatos y uso de fuentes no convencionales

Las condiciones de cultivo presentes en las fermentaciones para la obtención de PHAs, requieren ser controladas con el fin de mantener condiciones que favorezcan el rendimiento y la productividad de obtención del biopolímero y asimismo mantenga sus propiedades térmicas, mecánicas y fisicoquímicas estables. Esto último teniendo en cuenta que variables como concentración de nutrientes, pH, aireación, tiempo de fermentación, etc. pueden alterar la composición del biopolímero en cierto grado. Por ejemplo, un pH no controlado puede ocasionar una baja en el rendimiento de obtención del PHA, un cambio en la velocidad de agitación puede afectar el peso molecular del biopolímero, lo que a su vez afecta propiedades térmicas y mecánicas del mismo (M. Singh et al., 2015).

El costo de producción de PHB usando azúcares comerciales no es competitivo con respecto a los plásticos de origen petroquímico, debido a los altos costos de los azúcares puros y los

esquemas convencionales de separación y purificación. Una estrategia para aprovechar la biomasa se ha presentado desde el desarrollo de biorrefinerías integradas y generar un espectro de productos de valor agregado dentro del concepto de bioeconomía circular. En este sentido, se identifican como factores clave que deben abordarse en el diseño y cálculo de costos de la biorrefinería la alta productividad, los altos rendimientos de conversión de producción y la demanda del mercado final. Adicionalmente, se han identificado como parámetros fundamentales que afectan el costo final de producción, las fuentes de carbono y nitrógeno (Kachrimanidou et al., 2021).

Teniendo en cuenta que alrededor del 40 a 48 % del costo total de producción de PHAs se puede acreditar al costo de las materias primas, y que de estas la principal es la fuente de carbono usada para el crecimiento de la bacteria y la síntesis del PHA, se ha estudiado la reducción de costos en la producción de PHAs empleando diferentes sustratos económicos (no convencionales) ricos en azúcares y ácidos grasos volátiles como fuente de carbono (Rodríguez-Perez et al., 2018; Kalia, Prakash, & Koul, 2016). Lo cual unido al concepto de biorefinería y bioeconomía circular, puede aportar a tener un proceso de obtención de PHAs competitivos económicamente.

El material lignocelulósico es un sustrato muy promisorio para la producción de PHAs ya que es abundante, económico, no compite con la cadena alimenticia humana, por lo cual aplica para tener un proceso de producción de PHA sostenible. Sin embargo, hay que tener presente que el usar el material lignocelulósico para procesos biotecnológicos representa un reto por la necesidad de realizar un pretratamiento para su uso en las fermentaciones. Generalmente este pretratamiento incluye una etapa de remoción de lignina y reducción de la cristalinidad de la celulosa y otra etapa de hidrólisis de la biomasa a azúcares fermentables (Obruca et al., 2015). Es así como han sido presentados estudios de obtención de PHAs usando azúcares reductores o hidrolizados de diferentes tipos de material lignocelulósico.

Desde la industria alimentaria se están generando desechos que pueden ser utilizados como fuente de carbono en procesos biotecnológicos para la obtención de diferentes productos, incluidos los PHAs. Algunos de estos desechos que son potencialmente valorizables, se pueden encontrar como residuos sólidos vegetales y como corrientes de aguas residuales, entre ellos se encuentran: salvado de arroz, cáscaras de guisantes, achicoria de raíz, cáscaras de patata, orujo de manzana, cáscaras de cebolla, orujo de uva, desechos de animales de granja y arena para aves de corral, aguas residuales de la aceituna trifásica del proceso de extracción de aceite, aguas residuales de procesamiento de leguminosas y aguas

residuales de procesamiento de frutas; también subproductos de bajo o medio valor agregado como suero de queso y destilado de aceite de oliva (Rodríguez-Perez et al., 2018).

El lactosuero es un material excedente que proviene de la industria de productos lácteos, por ejemplo, en la producción del queso se tiene una relación másica de 9:1 suero/queso. La mayor parte del suero es usado para producir suero de leche en polvo para nutrición humana o de animales, también para usos farmacéuticos y producción de bioetanol. Teniendo en cuenta la cantidad de suero producido, la disposición final de éste constituye un problema para la industria de productos lácteos (Koller, Sandholzer, et al., 2013).

En las zonas costeras, donde se encuentran empresas procesadoras de mejillón se obtienen aguas residuales de procesamiento de este molusco. Estas aguas residuales contienen principalmente glucógeno y proteína (10,0 y 3,5 g/L, respectivamente), las cuales son fuente de carbono y nitrógeno, lo que la hace muy apta para su uso como medio de cultivo en procesos biotecnológicos para obtención de ácidos orgánicos, hormonas vegetales, péptidos antibacterianos, enzimas y biopolímeros (Torrado et al., 2013). Una potencial aplicación de estas aguas es la producción de biopolímeros a partir de bacterias halófilas como *Halomonas boliviensis*.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se muestra la Tabla 1 donde se presentan estudios realizados para diferentes microorganismos en los cuales se evalúa la incidencia en la producción de PHB de diferentes parámetros nutricionales y operacionales que juegan un rol clave en el proceso (Johnson et al., 2010).

Tabla 1. Estudios de la incidencia de parámetros nutricionales y operacionales en la obtención de PHB para diferentes microorganismos con fuentes de carbono alternativas

Microorganismo	Fuente de Carbono (FC)	Variables	Resultado PHB (g/L)	Referencia
<i>Azohydromonas australica</i> DSM 1124	Suero de queso	Licor de maíz, urea, extracto de levadura, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , lactosa, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, CaCl <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ácido cítrico.	2,07	(V. Sharma et al., 2017)
<i>Bacillus megaterium</i>	Glicerol residual	Glicerol, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , trazas, temperatura, agitación.	0,43	(Moreno et al., 2015)

<i>Bacillus formus</i> NII0830	Hidrolizado de paja de arroz	Edad de inóculo, concentración de inóculo, agitación, temperatura, tiempo de inoculación, xilosa.	1,68	(Sindhu et al., 2013)
<i>Bacillus cereus</i> <i>ps10</i>	Melaza de caña	Concentración de inóculo, peptona, melaza, tiempo de incubación, pH, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> Cl, NH <sub>4</sub> C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> .	14,02	(P. Sharma & Bajaj, 2015)
<i>Methylobacterium</i> <i>extorquens DSMZ</i> 1340	Metanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , metanol, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .	1,48	(Mokhtari- hosseini et al., 2009)

### Procesos de recuperación de polihidroxicanoatos

Para la extracción de PHAs se han utilizado diferentes métodos, entre ellos: extracción con solventes, digestión química, digestión enzimática, etc. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas en su aplicación industrial, permitiendo en algunos casos procesos más amigables con el ambiente y a su vez viables desde un punto de vista económico (Koller, Niebelschütz, et al., 2013; Rodriguez-Perez et al., 2018).

#### **Extracción con solventes: cloroformo, no halogenados, otros solventes**

La técnica de extracción con solventes es una de las más ampliamente usadas para la recuperación de PHAs desde la biomasa en el laboratorio, ya que su aplicación a gran escala, por el uso de solventes, se identifica como un método que no es amigable con el ambiente, además de requerir altos costos operacionales y de capital. Sin embargo, con este método es posible obtener PHA muy puro, con alto peso molecular y una degradación despreciable del mismo. Este método consiste en dos etapas: la primera es la modificación de la permeabilidad de la membrana celular, de tal manera que permita la liberación del PHA y su posterior solubilización; la segunda, es la precipitación del mismo usando un no-solvente (Kunasundari & Sudesh, 2011).

Los más utilizados han sido los solventes halogenados, entre ellos: cloroformo, dicloroetano, diclorometano, etano policlorado, los cuales presentan un buen desempeño tanto con los PHAs de cadena corta como de cadena mediana. Como no-solventes son usados alcoholes de bajo peso molecular como etanol o metanol, agua, hexano, éter o acetona, estos tres últimos siendo aplicados solo para precipitación de PHAs de cadena corta (Koller, Niebelschütz, et al., 2013). Teniendo en cuenta que el uso de solventes orgánicos halogenados representa un riesgo tanto para el ambiente como para la salud, se

ha buscado reemplazarlos por solventes no halogenados como ésteres de ácido láctico de base biológica, por ejemplo lactato de etilo y metilo (Koller, Niebelschütz, et al., 2013).

En este sentido, se ha investigado el uso de solventes orgánicos no clorados para la extracción de PHB, entre ellos anisol y ciclohexanona, con los cuales se reportaron rendimientos de recuperación de 97 y 93 % (m/m), respectivamente, usando una relación biomasa/solvente 1,5 % (m/v) y temperatura de 120-130 °C; condiciones para las cuales se obtuvo una pureza del 98 % (m/m). Resultando en un proceso con un rendimiento de recuperación similar al obtenido usando cloroformo, con una cantidad de solvente usado mucho menor; y en un producto con similares condiciones de pureza, peso molecular promedio y propiedades térmicas (Rosengart et al., 2015).

### ***Digestión química***

Este método se basa en la solubilización de la masa celular diferente a PHA (NPCM). Se han usado como precursores hipoclorito de sodio y surfactantes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton X-100, betaina, entre otros. La calidad del PHA obtenido usando surfactantes o hipoclorito de sodio de manera independiente no ha sido buena, por lo cual se han realizado estudios en los cuales combinan el uso de ambas sustancias (Kunasundari & Sudesh, 2011). Es aclarado por algunos autores que el uso de hipoclorito de sodio para la recuperación de PHA representa un riesgo de formación de compuestos halogenados tóxicos, por lo cual no lo consideran como una técnica promisorio para ser aplicada a gran escala (Koller, Niebelschütz, et al., 2013).

En la búsqueda de mejores resultados, se han llevado a cabo investigaciones con el fin de encontrar sustancias que puedan actuar como surfactante y reemplazar el SDS, como es el caso del hidróxido de sodio y el potasio de sodio, los cuales reportaron un producto con mayor pureza y con un impacto despreciable del peso molecular, a la vez que presentaron mayor rendimiento de recuperación, son sustancias más amigables con el ambiente y son más económicas respecto al SDS (Koller, Niebelschütz, et al., 2013). Adicionalmente, se ha combinado con la técnica de extracción con solventes usando una dispersión de hipoclorito de sodio y cloroformo. Esta técnica permite reducir significativamente la degradación del polímero (Kunasundari & Sudesh, 2011).

Otro estudio en el cual se integran las técnicas de digestión química y extracción con solventes se realizó usando una mezcla de diclorometano con hipoclorito de sodio bajo condiciones de acidez moderada, con lo cual se reportó una mejor preservación de la estructura del polímero y menos reducción en la masa molar de las cadenas poliméricas.

Este tratamiento resultó en un polímero con una pureza mayor de 98 % (López-Abelairas et al., 2015).

### **Digestión enzimática**

Esta técnica busca la solubilización de NCPM a partir de un tratamiento con calor, una hidrólisis enzimática y un lavado con agua. Especialmente se han usado las proteasas para este fin. Esta técnica es atractiva por tener condiciones operacionales moderadas y por la especificidad de las enzimas, lo que permite recuperar un PHA con una buena calidad, sin embargo, su alto costo es una de las desventajas de este proceso (Kunasundari & Sudesh, 2011). Por ejemplo, Kachrimanidou et al., (2016) reportó el uso de una enzima para la recuperación de PHB-co-PHV a partir de *Cupriavidus necator*, con la cual obtuvieron un rendimiento de recuperación y una pureza de 98 y 96,7 % (m/m), respectivamente. Adicionalmente, la biomasa bacteriana obtenida después de retirar el biopolímero fue evaluada como un suplemento nutricional que podía adicionarse al glicerol crudo para la obtención de PHB.

### **Aplicaciones de los polihidroxicanoatos**

Estos biopolímeros tienen diferentes aplicaciones, las cuales van desde su uso como material de empaque, materia prima para obtención de productos industriales, hasta las aplicaciones biomédicas; como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Aplicaciones de los PHAs en diferentes ámbitos productivos. (Adaptado de Masood, Yasin, & Hameed, 2015)

<b>PHAs como un remedio ambiental</b>	<b>PHAs como una materia prima valorizable industrialmente</b>	<b>Aplicaciones biomédicas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material de empaque</li> <li>• Biocombustibles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de compuestos quirales y drogas</li> <li>• Purificación de proteínas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHAs como implantes biomédicos</li> <li>• PHAs y la medicina regenerativa</li> <li>• PHAs como conductores terapéuticos</li> </ul>

Desde las aplicaciones biomédicas hay una gran variedad de usos que a la fecha presenta este tipo de material, entre ellas, suturas, regeneración de huesos, reparación de nervios, implante de parches, sistemas de liberación de medicamentos, sistemas de

almacenamiento de medicamentos, vacunas, sustancias para diagnósticos de algunas enfermedades, etc. (A. K. Singh et al., 2019).

Los PHAs han sido utilizados para regeneración tanto de tejidos duros como de tejidos blandos, como son: huesos, cartílagos, tendones, tejidos del corazón (Masood et al., 2015). Cabe aclarar que inicialmente los PHAs producidos no fueron enfocados para implantes, por tanto, no cumplían con la calidad necesaria para esta aplicación, teniendo en cuenta que en este caso se requiere de alta pureza, verificación de biodegradación in vivo, fabricación de *scaffolds*, entre otros. Aquellos PHAs que cuentan con las condiciones de calidad y/o modificaciones necesarias, son los que tienen un gran potencial para su aplicación en la ingeniería de tejidos, por ejemplo, injertos vasculares, válvulas cardíacas, tejidos nerviosos, etc. (Ray & Kalia, 2017). De manera especial los Scl-PHA, aportan en la adhesión y proliferación de células debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, campo de gran aplicación en la ingeniería de tejidos (Wang et al., 2016).

Con el fin de mejorar la eficacia de los medicamentos, se ha buscado como administrarlos de manera controlada y específica, para este fin se han identificado los PHAs como materiales con las propiedades físicas adecuadas para este propósito y con una alta biocompatibilidad, por lo cual se han usado para producir tabletas, nanopartículas y *scaffolds* para eluir medicamentos y lograr su liberación controlada (Ray & Kalia, 2017).

### **Problema y justificación**

Los biopolímeros tipo PHA actualmente son de gran interés, ya que tienen propiedades muy similares a los polímeros de origen petroquímico, lo que permite que tengan un amplio rango de aplicaciones en utensilios de uso básico y desechable. Otra razón para esto se encuentra, en que cuenta con propiedades diferenciadoras como la alta biodegradabilidad y la biocompatibilidad, características que hacen que pueda tener aplicaciones de mayor valor agregado como son las biomédicas; o que si es usado para aplicaciones desechables se disminuya la problemática de contaminación.

Sin embargo, a pesar de las buenas propiedades de este material, para la industria no es tan llamativo debido a sus altos costos de producción en comparación con los polímeros de origen petroquímico. Esto hace necesario que se realicen mejoras en el proceso de obtención de PHAs, con el fin de mejorar su competitividad en el mercado.

Específicamente para el PHB, el costo total de producción depende del microorganismo (rendimiento y productividad), los sustratos utilizados como fuente de carbono y nitrógeno,

las condiciones de la fermentación (temperatura, aireación, pH) y los procesos de recuperación y purificación. La fuente de carbono puede contribuir entre un 25 – 45 % del costo total de producción (Nath et al., 2008). Es así como se ha planteado la posibilidad de aprovechar residuos agroindustriales tales como: las melazas residuales de la industria azucarera, la lactosa y el ácido láctico de la industria láctea, los alcoholes como metanol y glicerol de la producción de Biodiesel, la celulosa hidrolizada (desecho de la industria papelería), la biomasa lignocelulósica de la extracción de jugo de caña o la obtención de aceite de palma; evitando usar materias primas que compitan con la alimentación humana y que signifiquen una disminución en los costos de obtención del biopolímero (Davis et al., 2013; Ghimire et al., 2015).

El hidrolizado de raquis de palma se ha reportado como fuente de carbono promisoría para la obtención de PHB a partir de *Halomonas boliviensis* (Arcila Echavarría, 2016), sin embargo, se hace preciso realizar un estudio que permita buscar las condiciones nutricionales y operacionales que mejoren la productividad del proceso, logrando disminuir los costos de producción del material obtenido; todo esto teniendo como norte la siguiente pregunta: ¿Cómo se podría mejorar la productividad de obtención de PHB a partir de hidrolizados de raquis de palma variando las condiciones operacionales y nutricionales?

## **Hipótesis y objetivos**

### **Hipótesis**

La productividad de obtención de PHB al utilizar hidrolizados de raquis de palma aumenta porque *Halomonas boliviensis* puede aprovechar los azúcares reductores principales (glucosa, xilosa y arabinosa) presentes en el hidrolizado.

### **Sub-hipótesis**

- La productividad de obtención de PHB al utilizar hidrolizados de raquis de palma aumenta al aumentar la concentración inicial de fuente de carbono.
- La productividad de obtención de PHB al utilizar hidrolizados de raquis de palma aumenta al disminuir la concentración inicial de fuente de nitrógeno.
- La productividad de obtención de PHB al utilizar hidrolizados de raquis de palma aumenta al disminuir la concentración inicial de fuente de fósforo.
- La productividad de obtención de PHB aumenta al estar en una temperatura cercana al límite inferior del rango óptimo de crecimiento.
- La productividad de obtención de PHB aumenta al estar en un pH cercano al punto central del rango óptimo de crecimiento.
- La productividad de obtención de PHB aumenta al disminuir la disponibilidad de oxígeno en el medio a través de la agitación suministrada.

## **Objetivo General**

Estudiar el efecto de algunas condiciones operacionales y nutricionales que favorezcan la productividad de PHB a partir de *Halomonas boliviensis* usando como fuente de carbono hidrolizados de raquis de palma.

## **Objetivos específicos**

- Determinar las concentraciones de fuente de nitrógeno, fósforo y carbono que favorezcan la productividad de PHB.
- Establecer el efecto de los azúcares presentes en el hidrolizado de raquis de palma sobre la calidad del PHB.
- Estudiar el efecto de la temperatura, la agitación y el pH, condiciones operacionales sobre la síntesis de PHB.
- Estudiar la producción de PHB a una mayor escala, partiendo de las mejores condiciones obtenidas en los diseños experimentales a escala de matraz.

## **Metodología**

A continuación, se describe de manera general los procedimientos y medios de cultivo usados para el crecimiento bacteriano, así como los métodos analíticos utilizados para realizar el seguimiento al crecimiento de la bacteria, la formación de productos y el consumo de sustratos.

Los diseños experimentales y métodos analíticos específicos de cada etapa del trabajo se describen en el capítulo correspondiente.

## **Cepa utilizada y protocolo de mantenimiento**

Para la realización de este estudio se utilizó la bacteria *Halomonas boliviensis* ATCC BAA-759. *H. boliviensis* es una bacteria halófila moderada, bacilo Gram negativo. Para la activación de la cepa se siguió la metodología recomendada por la ATCC y fue cultivada en medio descrito por Quillaguamán et al. (2006), compuesto por (% m/v): NaCl 4,45, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,025, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,009, KCl 0,05, NaBr 0,006, peptona 0,5, extracto de levadura 1,0, glucosa 0,1, agar granulado 2,0. El método de siembra fue en estría por agotamiento y fue incubado a una temperatura de 30 °C/24 h. Para su mantenimiento la bacteria previamente crecida en este medio se almacenó en placa Petri a 4°C, durante un mes; tiempo en el que se realizó un repique para su propagación y siembra en medio fresco. Las colonias obtenidas en el mantenimiento se usaron como caja madre para los cultivos de producción del inóculo.

Para la conservación de la cepa, se incubó la bacteria en el medio reportado por (Quillaguamán et al., 2006), a condiciones de 30 °C/200 rpm/16 h en un volumen total de 100 mL. Transcurrido este tiempo se tomaron 500 µL de glicerol al 40 % (v/v) y 500 µL del medio descrito anteriormente con las células cultivadas, obteniendo una solución 1:1 de células y glicerol para un volumen total de 1mL en viales estériles de 2 mL. Estos viales fueron almacenados en nevera a -20 °C.

### Medio de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados en agua destilada y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Una solución con las sales y la fuente de carbono fueron esterilizados de manera independiente, bajo las condiciones ya indicadas, y mezclados en condiciones estériles para evitar precipitaciones y/ degradación de los azúcares. El pH fue ajustado a 7,5 con NaOH 5 M. La composición del medio para la preparación del inóculo y del medio de producción se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición medio de cultivo (Quillaguamán et al., 2008).

Compuesto	Concentración (g/L)	
	Medio para inóculo	Medio para producción
Glucosa*	1,0	20
NaCl	80	45
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20	0,38
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	1,60
NH <sub>4</sub> Cl**	N. A.	N. A.
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,13	0,13
KCl	0,75	0,75
NaBr	0,20	0,20
Peptona**	2,0	N. A.
Extracto de levadura**	2,0	N. A.

\*La fuente de carbono es cambiada en los diferentes experimentos, lo cual será especificado en el capítulo correspondiente.

\*\*La fuente de nitrógeno es cambiada por fuente económica para el mejoramiento del proceso

### Crecimiento bacteriano

Para cada experimento se partió de una caja fresca de *H. boliviensis* incubada a 30 °C por 48 horas. El inóculo fue preparado en dos etapas, aumentando el volumen para su crecimiento. Inicialmente, usando el medio para inóculo de la Tabla 3 con *H. boliviensis* de caja fresca, se dejó en crecimiento a 30 °C y 200 rpm durante 12 horas, se pasó a mayor volumen durante 12 horas a las mismas condiciones. Este inóculo se centrifugó a 9500 rpm

y 5 minutos, para obtener la biomasa y suspenderla en agua isotónica para inocular al medio de experimentación buscando una concentración inicial de biomasa de 0,6 g/L.

- Escala de matraz: como condiciones generales los cultivos fueron incubados a 30 °C, 200 rpm con un volumen de trabajo de 200 mL, en matraz de 500 mL. Se realizaron cambios en condiciones operacionales y nutricionales de acuerdo con el tipo de experimento realizado. Las muestras para seguimiento a las fermentaciones fueron tomadas de manera periódica cada doce horas.
- Escala de biorreactor: se utilizó un biorreactor con volumen de trabajo de 2 L marca New Brunswick. Equipado con sensores de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Para el control de la temperatura el equipo contó con chaqueta de calentamiento, el pH fue controlado por adición de NaOH/HCl 5M, para el control de espuma se adicionó antiespumante al inicio de la fermentación. El oxígeno disuelto fue monitoreado, el sensor fue calibrado usando N<sub>2</sub> y aire para definir el 0 y el 100 %, respectivamente. Las condiciones operacionales fueron: 30 °C, pH de 7, 400 rpm y un flujo de aire de 5 vvm.

## **Métodos analíticos**

### ***Cuantificación de biomasa***

La concentración de biomasa se determinó por espectrofotometría, relacionando su valor con la densidad óptica mediante una curva de calibración. Para esta medición la muestra fue centrifugada a 9500 x g por 5 minutos. Luego, la biomasa fue lavada dos veces con agua destilada y finalmente suspendida en un volumen de agua igual a la inicial. La absorbancia fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro (*Synergy H1 microplate reader, Biotek*). En caso de ser necesario la muestra se diluía previamente para obtener un valor de absorbancia en un rango entre 0 y 1,0. La curva de calibración y el procedimiento para su obtención se presentan en los anexos, como Anexo 1 (pág. 87).

### ***Cuantificación de nitrógeno: proteína, nitrógeno amoniacal***

- Cuantificación de proteína (prueba de Biuret): el nitrógeno presente por fuente proteica fue cuantificado mediante la prueba de Biuret. Esta prueba se basa en la reacción de Biuret, la cual es de color violeta y se presenta debido a la formación del complejo Cu en un medio alcalino con los enlaces peptídicos de la proteína. El reactivo de Biuret se mezcló con la muestra y se dejó reaccionando durante 20 minutos, luego se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro. La curva de calibración se presenta en los anexos, como Anexo 2 (pág. 87).
- Nitrógeno amoniacal: fue cuantificado por el método colorimétrico 4500-NH<sub>3</sub> F (APHA, 1998), el cual se basa en la reacción del NH<sub>3</sub> con HClO y fenol, formando un compuesto azul. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de

amonio, la cual puede ser determinada usando un espectrofotómetro a 635 nm. La curva de calibración, la preparación de los reactivos y el procedimiento se detalla en el Anexo 3 (pág. 88).

### ***Cuantificación de azúcares***

- La determinación de azúcares en la fermentación con hidrolizado de raquis se realizó mediante la técnica de Miller del DNS para cuantificación de azúcares reductores. La curva de calibración se muestra en los anexos, como Anexo 4 (pág. 89).
- También se realizó medición de azúcares por HPLC. Se usó un equipo Agilent Technologies serie 1200 y un detector IR con una columna Transgenomic ICsep COREGEL-87H3. Se pasó fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N con un flujo de 0,6 mL/min e inyección de 20 mL. La temperatura de la columna se mantuvo a 80 °C y la del detector a 55 °C.
- El consumo de glucosa se determinó mediante mediciones en el tiempo de la concentración de esta. Para su cuantificación se usó el método de glucosa oxidasa con el kit de Biosistem S.A. Éste es un método colorimétrico, que relaciona la absorbancia obtenida a 500 nm a partir de cada muestra con la concentración de glucosa en la misma. Se toma un mililitro de reactivo y se mezcla con 10 µL de muestra o estándar (1 g/L glucosa). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro (Synergy H1 microplate reader. Biotek).

### ***Cuantificación de PHA***

El PHB se mezcló con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, luego se sometió a calentamiento (95 °C por 20 minutos al baño maría), convirtiendo el PHB en ácido crotónico, sustancia que presenta un pico característico a una absorbancia de 235 nm. El protocolo detallado de cuantificación se presenta como Anexo 5 (págs. 89 90). La lectura se realizó en un espectrofotómetro marca Thermo Fischer Scientific EVO300 LC (Gnanasekhar, 2012). La absorbancia de cada muestra se relacionó con una curva de calibración realizada con PHB comercial de Sigma-Aldrich que se presenta como Anexo 6 (pág. 90).

### ***Extracción de PHA***

La extracción de PHA de las células se realizó con la metodología empleada por (Salmiati et al., 2009) que consiste en mezclar cloroformo e hipoclorito al 5 % (m/v) en una relación 1:2 con las células. Luego se someten a 40 °C y 200 rpm por un tiempo de 180 min. Después se toma la mezcla y se centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos de donde se obtiene una mezcla de tres fases. Luego se hacen tres lavados con etanol a la parte sólida obtenida con

el procedimiento anterior y se finaliza lavando con agua destilada. Se deja secar a temperatura ambiente.

#### ***Cuantificación de contenido de carbono orgánico total y nitrógeno total***

El carbono orgánico total y el nitrógeno total del sobrenadante, fue determinado por el método 5310-B (APHA, 1998) usando un analizador automático Shimadzu TOC-L<sub>CSN</sub>.

#### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado en el software R. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las variables significativas. Se realizó análisis de superficie de respuesta con la cual se obtuvo la regresión para modelar los factores de respuestas y definir las mejores condiciones para optimizar la ecuación.

En una primera fase, se definió un diseño de experimentos *Plackett-Burman* con el fin de identificar los factores que tuvieron un efecto significativo en la producción de PHB. En total se evaluaron seis (6) factores, entre ellos: los diferentes parámetros de producción, temperatura, pH y agitación; además, concentración inicial de nutrientes tales como: glucosa, nitrógeno y fósforo. Cada factor se evaluó en un nivel alto y uno bajo. En una segunda fase, aquellos factores que presentaron un efecto significativo en la producción de PHB se evaluaron mediante un diseño *Box-Behnken* que permitió encontrar los valores que favorecieran el proceso a través de la metodología de superficie de respuesta. Se tuvieron como variables respuesta tanto la cantidad de biomasa generada como la cantidad de PHB producido (Aramvash et al., 2015; Moreno et al., 2015). Estas corridas experimentales se llevaron a cabo por triplicado, a escala de matraz y utilizando como fuente de carbono glucosa, una vez se tuvieron las condiciones operacionales y concentraciones iniciales de nutrientes que favorecen la producción de PHB, se evaluó a igual escala y usando como fuente de carbono el hidrolizado de raquis de palma.

## Capítulo 2 – EVALUACIÓN DE FUENTES DE CARBONO

## Introducción

Un factor limitante para la comercialización de PHAs es su alto costo de producción comparado con el costo de polímeros de origen petroquímico, influenciado primordialmente por los costos asociados a la fuente de carbono como materia prima. En este sentido, se han estudiado diferentes sustratos ricos en carbono provenientes de desechos o subproductos de diferentes industrias como una alternativa para la reducción de costos en la producción de PHAs, dada a su alta disponibilidad, economía y que no ponen en riesgo la seguridad alimenticia (Kalia et al., 2016; Rodríguez-Perez et al., 2018).

Las bacterias halófilas han demostrado su capacidad para seguir diferentes rutas metabólicas existentes para usar los azúcares y/o ácidos grasos volátiles disponibles en diferentes sustratos económicos (no convencionales), y así acumular PHA entre un 70 y 90 % de su peso seco (Guzmán et al., 2017; Kucera et al., 2018), explicando así su gran atractivo para establecer la producción de PHA a escala industrial. Asimismo, la alta salinidad del medio de cultivo podría contribuir a disminuir los requerimientos de esterilización, y su naturaleza halofílica podría favorecer la lisis celular durante el proceso de extracción de PHA, favoreciendo aún más el proceso de producción (Ghosh et al., 2019; Moorkoth & Nampoothiri, 2016; Oliart-Ros et al., 2016).

Guzmán y colaboradores, 2017, evaluaron la capacidad de producción de PHAs de bacterias halófilas nativas e identificaron a *Halomonas sp.* como la cepa con mayor rendimiento utilizando glucosa y almidón como fuentes de carbono (0,889 g/g y 0,144 g/g, respectivamente) (Guzmán et al., 2017). *Haloferax mediterranei* alcanzó un contenido de PHA de 33,4 y 17,34 % (m/m) usando xilosa y arabinosa, respectivamente (Ghosh et al., 2019). *H. mediterranei* también ha sido evaluado con diferentes sustratos como: hidrolizado de biomasa de macroalgas, lactosuero y vinazas de caña de azúcar y de arroz, reportando contenidos de PHA de 48, 66, 70 y 71 % (m/m), respectivamente (Ghosh et al., 2019; Moorkoth & Nampoothiri, 2016; Nielsen et al., 2017; Oliart-Ros et al., 2016). *Halomonas halophila* alcanzó máximas acumulaciones de PHA del 49,4 y 61,4 % (m/m) cuando se usaron xilosa y arabinosa como fuente de carbono, respectivamente. Esta cepa también fue evaluada con hidrolizados de aserrín, rastrojo de maíz y borra de café arrojando máximos contenidos de PHA del 46,8, 38,6 y 61,9 % (m/m), respectivamente (Kucera et al., 2018).

Teniendo en cuenta lo anterior, en este capítulo se presenta como objetivo de este estudio evaluar la capacidad de la bacteria halófila *Halomonas boliviensis* para obtener PHAs a partir de glucosa, xilosa y/o arabinosa como fuentes de carbono, y también a partir del hidrolizado de raquis de palma, una materia prima económica altamente disponible en Colombia que contiene estos azúcares.

## Metodología

### Microorganismo y medio de cultivo

Las características del microorganismo utilizado, las condiciones para preparar el inóculo, medio de cultivo y el medio de producción estándar se reportan y detallan en la sección de metodología del capítulo introductorio (págs. 28-29 Cepa utilizada y protocolo de mantenimiento). La glucosa del medio de producción estándar fue sustituida por cada fuente de carbono evaluada. Cuando la xilosa y arabinosa fueron ensayadas en sustitución de la glucosa, sus concentraciones fueron la misma a la utilizada con glucosa.

### Preparación del hidrolizado de raquis de palma

El raquis de palma fue suministrado por la empresa *Bioplanta Palmera para el Desarrollo S.A.*, una planta extractora de aceite de palma (Urabá, Colombia). En la Tabla 4 se presenta la composición química del raquis de palma usado, la cual fue determinada mediante el protocolo “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” adaptado del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en Inglés).

Tabla 4. Composición química del raquis de palma

Componente	(%) m/m
Lignina	26,53%
Hemicelulosa	13,72%
Celulosa	39,31%
Humedad	9,96%
Cenizas base seca	7,36%
Extractivos base seca	9,81%

Antes de ser usado como una fuente de carbono, el raquis de palma fue pretratado aplicando reducción de tamaño mecánica y remoción de lignina con NaOH en relación 1:10 (sólido: 0,225 M NaOH), la mezcla fue dejada en una autoclave por 180 minutos a 121 °C. Luego fue lavada con agua (Gómez Vanegas, 2015). La hidrólisis enzimática se realizó en una solución buffer de citrato (0.1 M, pH 4.8) con una relación de carga de sólidos 1:7,5 a 180 rpm y 50 °C por 120 horas. La hidrólisis se realizó con el cóctel enzimático comercial CEB3L (Sinobios, Shanghai), utilizando una carga enzimática de 30 FPU/g material pretratado, según lo reportado por (Gómez Vanegas, 2015).

### **Producción de PHA con sustratos puros**

Para la evaluación de glucosa, xilosa y arabinosa como fuentes de carbono para la producción de PHA, se usaron reactivos puros suministrados por *Sigma-Aldrich*, *Acros Organics* y *Alfa Aesar*, respectivamente. Las fermentaciones se realizaron por 72 horas a 30 °C, 200 rpm y pH 7. Esta prueba fue llevada a cabo en matraces de 500 mL con un volumen de trabajo de 200 mL. La concentración inicial de la fuente de carbono fue de 10 g/L. Se evaluó el consumo de la fuente de carbono, crecimiento de biomasa y acumulación de PHA. Cada ensayo se realizó por triplicado.

### **Producción de PHA con hidrolizado de raquis de palma**

El contenido de glucosa, xilosa y arabinosa presente en el hidrolizado de raquis de palma fue cuantificado por HPLC. En este caso se tomó como sustrato la suma de glucosa, xilosa y arabinosa presentes en el hidrolizado de raquis de palma. Las fermentaciones se realizaron bajo las mismas condiciones en las que se realizó el ensayo con los sustratos puros. Se evaluó el consumo de la fuente de carbono, crecimiento de biomasa y acumulación de PHA. Cada ensayo se realizó por triplicado.

### **Métodos analíticos**

El consumo de la fuente de carbono fue determinado en el tiempo con la cuantificación de glucosa, xilosa y arabinosa por HPLC. El crecimiento de biomasa fue determinado por la concentración de células de *H. boliviensis* en los intervalos de tiempo establecidos. La acumulación de PHA fue determinada luego de extraer el metabolito intracelular y determinar el contenido por el método colorimétrico. Todas las evaluaciones de las variables fueron ejecutadas siguiendo la metodología descrita y detallada en el capítulo introductorio (págs. 30-31).

## **Resultados y discusión**

### **Producción de PHA con sustratos puros**

En la Figura 2 se presenta el perfil de fermentación de *Halomonas boliviensis* para acumulación de PHA usando xilosa, arabinosa y glucosa. La glucosa fue el sustrato usado como estándar, y fue el que presentó los mejores resultados de consumo de sustratos, crecimiento y acumulación de PHA. Los resultados demuestran que *H. boliviensis* puede usar tanto xilosa como arabinosa como fuente de carbono para su crecimiento y acumulación de PHA, presentando un comportamiento similar con ambos sustratos.

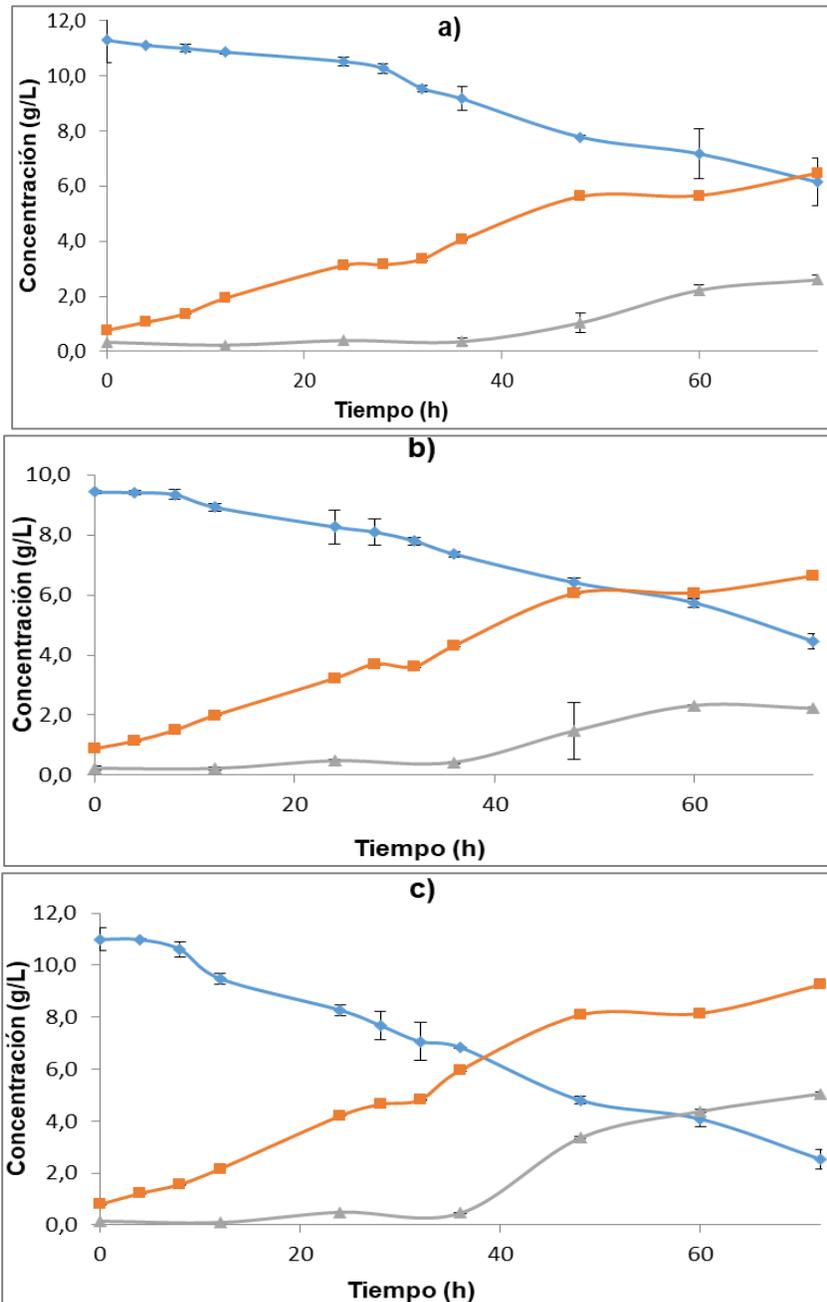


Figura 2. Cinéticas de fermentación usando fuentes de carbono puras: a) xilosa, b) arabinosa y c) glucosa. Concentración de fuente de carbono (diamante), biomasa (cuadrado) y PHB (triángulo).

La Tabla 5 muestra los rendimientos para biomasa y PHA, así como la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) calculada para las fermentaciones con las fuentes de carbono puras. El cálculo de los parámetros cinéticos fue realizado por el método integral de análisis del modelo de Monod, que es utilizado para calcular estos parámetros de los datos experimentales. Los rendimientos se calcularon a partir de datos experimentales de la

cantidad de sustrato consumido, la biomasa obtenida y el PHA acumulado, teniendo en cuenta el rendimiento de biomasa-sustrato como el cociente entre el aumento de la masa celular obtenida y el consumo de sustrato, y el rendimiento de PHA-sustrato como el cociente entre el aumento de PHA obtenido y el consumo de sustrato. Las tres fermentaciones presentaron velocidades de crecimiento y rendimientos similares para la biomasa ( $Y_{x/s}$ ), que estuvieron en el rango de 0,99 - 1,14 g/g. La afinidad obtenida fue del orden glucosa > xilosa > arabinosa.

Tabla 5. Parámetros cinéticos y resultados obtenidos en las cinéticas presentadas en las figuras 2 y 3

<b>Fuente de Carbono</b>	<b>Consumo FC (g/L)</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b><math>Y_{x/s}</math> (g/g)</b>	<b><math>Y_{PHA/s}</math> (g/g)</b>	<b><math>\mu_{max}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>PHA (% m/m)</b>
Glucosa	8,5	8,4±0,007	0,99	0,59	0,0841	60,11
Xilosa	5,1	5,7±0,015	1,12	0,51	0,0750	45,61
Arabinosa	5	5,7±0,016	1,14	0,45	0,0701	39,07
Hidrolizado de raquis	7,5	7,8±0,093	1,04	0,32	0,0540	30,77

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por Van-Thuoc et al. (2008) y (López-Abelairas et al., 2015; Van-Thuoc et al., 2008), que utilizaron la xilosa como fuente de carbono y comunicaron el crecimiento de *Halomonas boliviensis*, así como la acumulación de PHA. Aunque el catabolismo de las pentosas puede afectar el crecimiento de algunas bacterias Gram negativas, se ha reportado que *H. boliviensis* sigue la xilosa por la vía de la pentosa-P para el crecimiento y posterior acumulación de PHA (Van-Thuoc et al., 2008).

Según los datos presentados en la Tabla 6, el porcentaje de PHA alcanzado en este estudio es superior al obtenido por (Van-Thuoc et al., 2008) con *Halomonas boliviensis*, utilizando xilosa como fuente de carbono. Al mismo tiempo, en este estudio se obtuvieron porcentajes de acumulación de PHA más altos en comparación con los reportados por (Ghosh et al., 2019) al evaluar *Haloferax mediterranei* usando xilosa y arabinosa como fuente de carbono. Mientras tanto, Kucera et al., (2018) trabajaron con *Halomonas halophila* y obtuvieron acumulaciones de PHA 10 y 28 % (m/m) mayores a las alcanzadas en este estudio, al utilizar como fuentes de carbono xilosa y arabinosa, respectivamente.

Tabla 6. Comparación de microorganismos halófilos productores de PHB usando xilosa y arabinosa como la única fuente de carbono.

Microorganismo	PHA (% m/m)		Referencia
	Xilosa	Arabinosa	
<i>Haloferax mediterranei</i>	33,4	17,3	(Ghosh et al., 2019)
<i>Halomonas halophila</i>	49,4	61,4	(Kucera et al., 2018)
<i>Halomonas boliviensis</i>	23,1	N.C.	(Van-Thuoc et al., 2008)
<i>Halomonas boliviensis</i>	45,6	39,1	Este estudio

N.C. "No calculado"

### Producción de PHA con hidrolizado de raquis

El hidrolizado obtenido tenía una concentración de azúcar de 48,89 g/L (59,7%) en glucosa, 31,98 g/L (39%) en xilosa y 1,04 g/L (1,3%) en arabinosa; lo cual representó una recuperación del 80% de azúcares reductores. Después de ser diluida para lograr la concentración requerida para el ensayo, la concentración de arabinosa se hizo despreciable, con una concentración inicial de 0,13 g/L, por lo que la fuente inicial de carbono estaba compuesta principalmente por glucosa y xilosa.

Las cinéticas de la fermentación de *Halomonas boliviensis* para la acumulación de PHA utilizando el hidrolizado de raquis de palma como fuente de carbono se presentan en la Figura 3. Estos resultados muestran que, aunque el microorganismo puede utilizar los dos principales azúcares del hidrolizado, la glucosa se consume completamente, mientras que la xilosa sólo se consumió parcialmente. Respecto a esto, la Figura 3 no muestra claramente si la xilosa se consumió para el crecimiento de la biomasa o para la acumulación de PHA. También es evidente que, aunque hay cierto consumo de xilosa, éste fue inferior al alcanzado cuando se utilizó como única fuente de carbono. Teniendo en cuenta que las concentraciones inicial y final de xilosa fueron de 4,15 y 3,10 g/L, respectivamente, esto representa un consumo de xilosa del 25,3 %, mientras que fue del 45,1 % cuando se utilizó como única fuente de carbono.

En la fermentación del hidrolizado de raquis, *H. boliviensis* consumió 6,5 g/L y 1,0 g/L de glucosa y xilosa, respectivamente. Después de 72 horas de fermentación se alcanzó una concentración total de biomasa de 7,8 g/L, de los cuales 2,4 g/L correspondían a la acumulación de PHA (30,8 % (m/m)).

Considerando la composición del hidrolizado de raquis, los consumos y rendimientos presentados en la Tabla 5 para cada azúcar, se esperaba una producción de PHA de 3,92

g/L. Sin embargo, en la fermentación del hidrolizado sólo se lograron 2,4 g/L de PHA, lo que indica que la contribución en la mezcla es diferente.

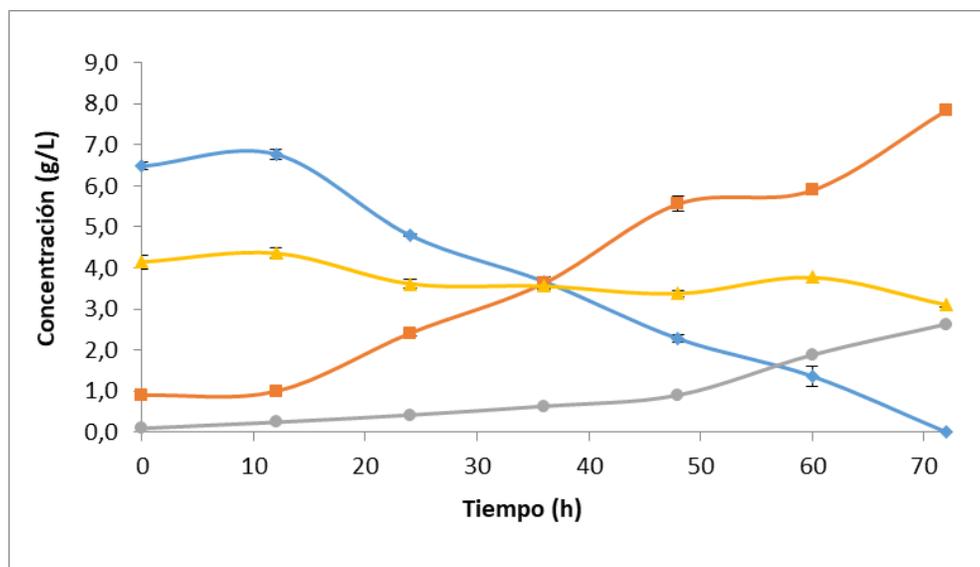


Figura 3. Cinética de fermentación usando hidrolizado de raquis de palma como fuente de carbono. Concentración de glucosa (diamante), xilosa (triángulo), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo).

La mayor productividad de PHA se obtuvo con la glucosa (0,0701 g/L-h), la cual es casi el doble la alcanzada con la xilosa (0,0361 g/L-h). Productividades ligeramente inferiores, en comparación con la alcanzada con xilosa, se obtuvieron con el hidrolizado de raquis y arabinosa (0,0334 g/L-h y 0,0310 g/L-h, respectivamente).

Según lo reportado en la Tabla 7 donde se compara el porcentaje de acumulación de PHA obtenido con diferentes microorganismos utilizando hidrolizados de biomasa como fuente de carbono, el resultado obtenido en este estudio es el más bajo. Sin embargo, aunque se utilizó un hidrolizado del mismo material, el microorganismo productor de PHA era diferente y las condiciones operacionales no eran las óptimas. Según lo que conocemos hasta el momento, este es el primer estudio que reporta la producción de PHA por bacterias halófilas usando como sustrato el hidrolizado de raquis de palma. Por otro lado, cabe aclarar que el hidrolizado de raquis utilizado en este estudio se obtuvo por hidrólisis enzimática, a diferencia de los reportados que se obtuvieron por hidrólisis ácida, además, en este estudio se utilizó una concentración inicial de FC (10 g/L) inferior a la utilizada en los otros reportes.

El hidrolizado de raquis de la palma aceitera es una fuente económica de carbono, con un precio significativamente menor que los sustratos puros evaluados en este estudio (Malán

Courdín, 2015). Sin embargo, el análisis comparativo que se muestra en la Tabla 5 demuestra que presenta un rendimiento y una acumulación de PHA cercanos a los obtenidos con la glucosa.

Tabla 7. Comparación de los microorganismos productores de PHA que utilizan diferentes hidrolizados de biomasa como fuente de carbono.

<b>Microrganismo</b>	<b>Fuente de carbono</b>	<b>PHA (% m/m)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Haloferax mediterranei</i>	Hidrolizado de macroalgas	48,1	(Ghosh et al., 2019)
<i>Halomonas halophila</i>	Hidrolizado de aserrín	46,8	(Kucera et al., 2018)
<i>Bacillus megaterium R11</i>	Hidrolizado de raquis	51,6	(Zhang et al., 2013)
<i>Bacillus cereus suaeda B-001</i>	Hidrolizado de raquis	55,4	(Yustinah et al., 2019)
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de raquis	30,8	Este estudio

## Conclusiones

*Halomonas boliviensis* es capaz de utilizar glucosa, xilosa y arabinosa, los tres principales azúcares reductores presentes en el hidrolizado de raquis de palma, como fuente de carbono. Sin embargo, *H. boliviensis* prefiere a la glucosa por encima de la xilosa y la arabinosa, y el mayor crecimiento y acumulación de PHA se produce también con la glucosa. Los parámetros cinéticos de las fermentaciones con el hidrolizado de raquis de palma aceitera complementado con sales fueron muy similares a los obtenidos con el medio de cultivo sintético utilizando xilosa y arabinosa como fuente de carbono, lo que hace al hidrolizado de raquis de palma un sustrato no convencional de bajo costo promisorio para la producción de PHA. Sin embargo, para aprovechar plenamente su potencial es necesario determinar las condiciones óptimas de fermentación.



## Capítulo 3 – EVALUACIÓN DE CONDICIONES NUTRICIONALES Y OPERACIONALES

## **Introducción**

En la valorización de subproductos y la disminución de costos de procesos biotecnológicos, tienen un papel muy importante las condiciones operacionales, las cuales permiten aumentar productividades. En este sentido, teniendo en cuenta que se tiene un amplio rango de variables que pueden afectar la producción de PHA (por ejemplo, la concentración de nutrientes esenciales y de inóculo, agitación, temperatura, pH, etc.) se hace necesario el estudio de estas variables de manera sistemática haciendo uso de diseños experimentales.

Los diseños de experimentos de tipo factorial son ampliamente usados para evaluar la significancia de factores que actúan sobre un proceso. Sin embargo, es claro que, a mayor número de factores, es necesario contar con mayor cantidad de ensayos, por lo tanto, mayor consumo de recursos. Por esta razón, se cuentan con diseños factoriales fraccionados como el *Plackett Burman*, diseño de experimentos propuesto por Plackett y Burman en 1946, con el fin de optimizar el diseño con respecto al uso de recursos, es más flexible y ha sido usado para estudios realizados en temas similares con bacterias diferentes.

Es posible unir de manera secuencial los diseños factoriales con metodologías de superficie de respuesta con el fin de encontrar mejores condiciones para un proceso determinado, entre ellos se encuentra el *Box Benkhen*, diseño que permite estimar funciones cuadráticas para conocer el comportamiento de las variables estudiadas.

En este capítulo se presentarán los diseños experimentales llevados a cabo para seleccionar las mejores condiciones para la obtención de PHA, dentro del rango de estudio definido. Estos se basaron en un diseño *Plackett Burman* utilizado para seleccionar los factores significativos, seguido de un diseño *Box Benkhen* que permitió encontrar las condiciones óptimas que maximizan las variables respuesta estudiadas.

## **Metodología**

### **Microorganismo y medio de cultivo**

Las características del microorganismo utilizado, las condiciones para preparar el inóculo, medio de cultivo y el medio de producción estándar se reportan y detallan en la sección de metodología del capítulo introductorio (págs. 28-29 Cepa utilizada y protocolo de mantenimiento). El medio de producción estándar fue utilizado para evaluar las diferentes condiciones operativas y de nutrientes, únicamente modificando las fuentes de nitrógeno por hidrolizado de gluten de trigo. Para los ensayos de este capítulo, se trabajó en matraz de 250 mL y un volumen de trabajo de 100 mL, se tomó como punto final la hora 72 y la agitación se mantuvo en 200 rpm.

### Preparación del hidrolizado de gluten de trigo

La preparación del hidrolizado de gluten de trigo se realizó de acuerdo con lo reportado por Marsiglia López et al. (2019). El gluten utilizado fue de marca Itacol, 10 g de éste y 1 mL de proteasa (Savinase 16L, *Novozymes*) se adicionaron a 1 L de agua destilada. El procedimiento se realizó en plancha de calentamiento, con agitación interna de 500 rpm y a una temperatura de 60 °C durante 24 horas. Luego fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos para retirar los lodos y finalmente el sobrenadante fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos (Marsiglia López et al., 2019).

### Diseño de experimentos

En este estudio se evaluaron seis factores, tres nutricionales y tres operacionales de manera simultánea bajo un diseño experimental *Plackett Burman*. En la Tabla 8 se presentan los factores y niveles definidos para este diseño experimental. Asimismo, en la Tabla 9 se presenta el diseño de las corridas a realizar.

Tabla 8. Factores y niveles para evaluar la incidencia en la obtención de PHA a partir de *Halomonas boliviensis* bajo un diseño *Plackett Burman*.

Factor	Alto (1)	Bajo (-1)	Punto Central (0)
Temperatura °C (T)	34	28	31
pH	8	6	7
Agitación rpm	250	150	200
Glucosa (FC) g/L	15	5	10
Fuente de nitrógeno (FN) g/L	3	0,5	1,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g/L	3	0,2	1,6

El rango experimental de estos valores fueron tomados de: a) Aramvash et al., (2015), b) Moreno et al., (2015), c) Quillaguaman et al., (2004) y d) Sindhu et al., (2013).

Tabla 9. Corridas del diseño experimental *Plackett Burman*

Ensayo	Corrida	T (°C)	pH	Agitación (rpm)	Glucosa (g/L)	Nitrógeno (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)
1	1	34	6	150	15	0,5	3
1	2	34	8	150	5	3	0,2
2	3	34	8	250	5	0,5	3
3	4	28	8	250	15	0,5	0,2
2	5	34	6	250	15	3	0,2
4	6	28	8	150	15	3	3
3	7	28	6	250	5	3	3
4	8	28	6	150	5	0,5	0,2
5	9	31	7	200	10	1,75	1,6

El diseño de experimentos fue basado en: a) Carvajal (2013) y b) Plackett & Burman (1946).

Después de realizar la evaluación del diseño *Plackett Burman* donde se definieron los factores significativos, se buscaron las mejores condiciones para dichos factores usando un diseño de experimentos basado en la metodología de superficie de respuesta, con tres factores y tres niveles, para lo cual se realizó un diseño *Box Benkhen*, con cinco réplicas en el punto central. En la Tabla 10 se detallan los factores y niveles definidos para el diseño experimental, mientras que en la Tabla 11 se presentan los experimentos definidos para este diseño. Como última parte experimental se realizó la validación de los máximos teóricos, obtenidos con el polinomio de segundo grado definido bajo el diseño *Box Benkhen*.

Tabla 10. Factores y niveles diseño *Box Benkhen*

Nivel	Temperatura (°C)	pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)
Alto (1)	34	8	3
Bajo (-1)	28	7	0,2
Central (0)	31	6	1,6

Tabla 11. Corridas del diseño experimental *Box Benkhen*\*

Corrida	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	pH	Temperatura (°C)
1	-1	0	-1
2	1	0	-1
3	0	-1	-1
4	0	1	-1
5	-1	0	1
6	1	0	1
7	0	1	1
8	0	-1	1
9	-1	1	0
10	-1	-1	0
11	1	1	0
12	1	-1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

\*Cada corrida, excepto el punto central, fue realizado por duplicado.

### Validación de valores máximos definidos para el modelo cuadrático

La validación de los valores máximos se realizó en matraz de 500 mL con un volumen de trabajo de 200 mL. Se tomaron muestras cada 12 horas, hasta la 72, para hacer seguimiento a las variables respuesta (biomasa y PHA) y al consumo de nutrientes esenciales, en este

caso, glucosa, nitrógeno y fosfato (los datos de nitrógeno y fosfato no son presentados). Las pruebas se realizaron por triplicado.

### Métodos analíticos

Se evaluaron como variables respuesta biomasa y PHA. El crecimiento de biomasa fue determinado por la diferencia de la concentración de células de *H. boliviensis* al inicio y al final del ensayo. La acumulación de PHA fue determinada luego de extraer el metabolito intracelular y determinar el contenido por el método colorimétrico. Todas las mediciones de las variables fueron ejecutadas siguiendo la metodología descrita y detallada en el capítulo introductorio (págs. 30-32).

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el software R (CRAN R 3.6.0). Un valor de significancia (Alpha) de 0,05 fue considerado. Los análisis de varianza (ANOVA) fueron realizados para cada variable de respuesta, con cada diseño experimental (Plakett Burman, Box Benkehn). Los puntos máximos del modelo se hallaron con el software Matlab (R 2018A).

### Resultados y discusión

#### Evaluación de variables operacionales y nutricionales con mayor significancia en la obtención de PHAs (Diseño *Plakett Burman*)

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos para las variables respuesta en cada una de las corridas de acuerdo con el diseño presentado de *Plakett Burman*. Adicionalmente, en la Tabla 13 y la Tabla 14 se presentan los análisis de varianza (ANOVA) realizados para cada variable respuesta: biomasa y PHA, respectivamente.

Tabla 12. Diseño *Plakett Burman* con sus variables respuestas

Corrida	T (°C)	pH	Agitación (rpm)	Glucosa (g/L)	Nitrógeno (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Biomasa (g/L)	PHA (mg/L)
1	1	-1	-1	1	-1	1	2,41	44,81
2	1	1	-1	-1	1	-1	3,19	150,76
3	1	1	1	-1	-1	1	8,15	51,68
4	-1	1	1	1	-1	-1	9,48	147,90
5	1	-1	1	1	1	-1	0,85	42,84
6	-1	1	-1	1	1	1	7,29	46,47
7	-1	-1	1	-1	1	1	3,28	0
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3,71	0
9	0	0	0	0	0	0	10,31	250,60
9	0	0	0	0	0	0	10,03	245,50
9	0	0	0	0	0	0	10,39	250,40

Tabla 13. ANOVA para Biomasa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temperatura	2	92,54	46,27	80,437	2,72e-07 ***
pH	1	85,83	85,83	149,208	9,69e-08 ***
Agitación	1	5,97	5,97	10,371	0,00815 **
Glucosa	1	3,14	3,14	5,459	0,03943 *
Nitrógeno	1	23,28	23,28	40,471	5,36e-05 ***
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1,91	1,91	3,313	0,09602 '
Residuales	11	6,33	0,58		

Signif. Codes: 0 '\*\*\*'0,001 '\*\*\*'0,01 '\*'0,05 ',0,1 ' '1

Tabla 14. ANOVA para PHA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temperatura	2	91578	45789	48,757	3,41e-06 ***
pH	1	23578	23578	25,106	0,000396 ***
Agitación	1	4	4	0,004	0,947866
Glucosa	1	1321	1321	1,407	0,260548
Nitrógeno	1	5	5	0,005	0,945327
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	9283	9283	9,885	0,009341 **
Residuales	11	10330	939		

Signif. Codes: 0 '\*\*\*'0,001 '\*\*\*'0,01 '\*'0,05 ',0,1 ' '1

De acuerdo con los análisis de varianza, se identifican como factores significativos para la variable respuesta biomasa: temperatura, pH, nitrógeno ( $p = 0,001$ ), agitación ( $p = 0,01$ ), glucosa ( $p = 0,05$ ); mientras que para la variable respuesta PHA, temperatura y pH (ambos con  $p = 0,001$ ) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $p = 0,01$ ) fueron significativos.

Tanto el pH como la temperatura tienen una influencia significativa sobre el PHA y la biomasa, lo cual está en concordancia con el estudio de Quillaguamán, et al. (2007) quienes encontraron una relación directa entre la biomasa y el PHA. Ellos estudiaron la optimización de las condiciones de producción de PHB utilizando *Halomonas boliviensis* con sacarosa como fuente de carbono, donde concluyeron que la productividad de PHB está limitada por las bajas densidades celulares de los microorganismos, obtenidas durante el cultivo. Sin embargo, se espera que cuando se presente el consumo de NH<sub>3</sub>, para el crecimiento celular, se produzca una disminución del pH, que puede afectar de manera directa el rendimiento de *H. boliviensis*. En cuanto a las condiciones nutricionales, el comportamiento para la biomasa y el producto están influenciados por diferentes factores, la biomasa está influenciada por la concentración de nitrógeno, lo cual concuerda con los resultados reportados por Quillaguamán, et al. (2007). Ellos también observaron que el aumento en la

síntesis de PHB fue reflejado en la variación de la concentración de fosfato, lo cual se relaciona en este estudio con la importancia que presenta la concentración de fosfato frente a la variable respuesta del PHA.

De acuerdo con estos resultados, los factores que se definieron para el siguiente diseño experimental fueron: temperatura, pH y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La temperatura y el pH tuvieron significancia alta ( $p < 0,001$ ) para ambas variables respuesta. Para PHA, el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  presentó una significancia de 0,01, mientras que los demás factores no presentaron ningún grado de significancia. Cabe aclarar que, si bien el nitrógeno se presentó como variable significativa para la biomasa, para la obtención de PHB presentó mayor significancia el fósforo, adicionalmente es un factor que ha sido estudiado previamente y se tiene condiciones propuestas que no limitan la producción de biomasa y no afectan negativamente la obtención del biopolímero.

Teniendo en cuenta que el análisis estadístico anterior no valida la significancia por cruce de factores, fue necesario validar que los factores temperatura, pH y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  continúan siendo significativos sin interactuar con los otros factores que fueron evaluados inicialmente. En la Tabla 15 y Tabla 16 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado para biomasa y PHA, respectivamente, analizando solo los factores seleccionados para el siguiente diseño de experimentos.

Tabla 15. ANOVA para biomasa con factores definidos para diseño *Box Benkhen*

	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Temperatura	2	92,542	46,271	16,7327	0,0001942 ***
pH	1	85,831	85,831	31,0387	6,89e-05 ***
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	1,906	1,906	0,6892	0,4203755
Residuales	14	38,714	2,765		
Signif. Codes: 0 '***'0,001 '**'0,01 '*'0,05 ',0,1 ' '1					

Tabla 16. ANOVA para PHA con factores definidos para diseño *Box Benkhen*

	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Temperatura	2	91578	45789	54.975	2.345e-07 ***
pH	1	23578	23578	28.308	0.0001081 ***
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	9283	9283	11.146	0.0048738 **
Residuales	14	11661	833		
Códigos Signif.: 0 '***'0,001 '**'0,01 '*'0,05 ',0,1 ' '1					

Como se observa en la Tabla 15 y en la Tabla 16, los factores seleccionados para continuar el estudio siguieron teniendo una significancia mayor de 0,01, lo cual muestra que su significancia no se debía a la interrelación con los otros factores.

### **Evaluación de variables significativas bajo metodología de superficie de respuesta (Diseño *Box Benkhen*)**

En la Tabla 17 se presenta el diseño *Box Benkhen* con los resultados obtenidos para cada variable respuesta en cada una de las corridas, con su respectivo duplicado.

Tabla 17. Diseño *Box Benkhen* con sus variables respuesta.

Corrida	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	pH	T (°C)	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)
1	-1	0	-1	3,378	0,031
1	-1	0	-1	3,144	0,044
2	1	0	-1	5,69	0,303
2	1	0	-1	5,472	0,268
3	0	-1	-1	4,002	0,107
3	0	-1	-1	4,191	0,13
4	0	1	-1	6,016	0,212
4	0	1	-1	5,312	0,316
5	-1	0	1	3,573	0,054
5	-1	0	1	3,516	0,092
6	1	0	1	5,163	0,091
6	1	0	1	5,209	0,056
7	0	1	1	5,203	0,092
7	0	1	1	6,205	0,092
8	0	-1	1	2,732	0,092
8	0	-1	1	6,205	0,092
9	-1	1	0	5,358	0,242
9	-1	1	0	4,997	0,286
10	-1	-1	0	1,731	0,021
10	-1	-1	0	1,468	0,013
11	1	1	0	5,049	0,064
11	1	1	0	5,398	0,050
12	1	-1	0	5,713	0,092
12	1	-1	0	5,913	0,086
13	0	0	0	2,698	0,074
14	0	0	0	6,119	0,092
15	0	0	0	5,501	0,097
16	0	0	0	6,422	0,095
17	0	0	0	5,695	0,100

Con los resultados de las variables respuesta se realizó el análisis de varianza para obtener los coeficientes del modelo polinomial de segundo orden, que permitieron modelar el comportamiento de las variables respuesta (biomasa y PHA) en función de los factores definidos como significativos (temperatura, pH y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). La Ecuación 1 describe de manera general la ecuación de segundo orden que se definió para cada una de las variables respuesta, con el fin de llegar a obtener los mejores valores de cada variable respuesta en función de los factores.

$$y_j = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i < j=1}^3 \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2$$

Ecuación 1

Dónde x<sub>1</sub> es temperatura, x<sub>2</sub> es pH, x<sub>3</sub> es KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y<sub>1</sub> es biomasa, y<sub>2</sub> es PHA.

Ecuaciones específicas:

$$Y_1 = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2$$

$$Y_2 = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2$$

Tabla 18. ANOVA de los modelos polinomiales de segundo orden ajustados.

<b>Coficiente</b>	<b>Y<sub>1</sub></b>	<b>Y<sub>2</sub></b>
<b>b<sub>0</sub></b>	5,29 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>
<b>b<sub>1</sub></b>	0,04	-0,05 <sup>b</sup>
<b>b<sub>2</sub></b>	0,72 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>
<b>b<sub>3</sub></b>	1,03 <sup>a</sup>	0,01
<b>b<sub>12</sub></b>	-0,08	-0,04 <sup>c</sup>
<b>b<sub>13</sub></b>	-0,17	-0,06 <sup>b</sup>
<b>b<sub>23</sub></b>	-1,04 <sup>a</sup>	-0,07 <sup>a</sup>
<b>b<sub>11</sub></b>	0,18	0,03
<b>b<sub>22</sub></b>	0,12	0,02
<b>b<sub>33</sub></b>	-0,71 <sup>c</sup>	-0,004
<b>R<sup>2</sup></b>	0,834	0,771
<b>F-exp</b>	154,3	17,3
<b>Nivel de significancia (%)</b>	99,998	99,997

<sup>a</sup> Coeficientes significativos con un nivel de confianza del 99,9 %

<sup>b</sup> Coeficientes significativos con un nivel de confianza del 99 %

<sup>c</sup> Coeficientes significativos con un nivel de confianza del 90 %

Como valores máximos para cada una de las variables respuesta se obtuvieron las condiciones presentadas en la Tabla 19.

Tabla 19. Valores de los factores para los máximos de cada variable respuesta.

Variable respuesta	Temperatura (°C)	pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Máximos teóricos (g/L)
Biomasa	31	7	1,6	12,43
PHA	31	7	1,6	6,77

En ensayos anteriores, utilizando glucosa como fuente de carbono y bajo condiciones nutricionales y operacionales seleccionadas desde las referencias bibliográficas, se lograron concentraciones de biomasa y de PHA de 8,4 g/L y 5,05 g/L, respectivamente. Al comparar los valores teóricos predichos por el modelo obtenido bajo este diseño de experimentos, con los mencionados anteriormente; se identifica que puede darse un incremento del 48 % para la biomasa y del 34 % para el PHA, operando bajo las condiciones del modelo predicho.

#### Validación de valores máximos definidos para el modelo cuadrático

Bajo las condiciones presentadas en la Tabla 19 se realizó la validación experimental de los valores predichos por el modelo cuadrático para cada una de las variables respuesta (Figura 4). Se obtuvieron concentraciones de biomasa y PHA de 9,2 g/L y 6,5 g/L, respectivamente, lo que representa un 74 % y 96 % del valor teórico de biomasa y PHA, respectivamente. Esto muestra la validez del modelo definido para la obtención de PHA con *Halomonas boliviensis*, bajo las condiciones propias de este trabajo.

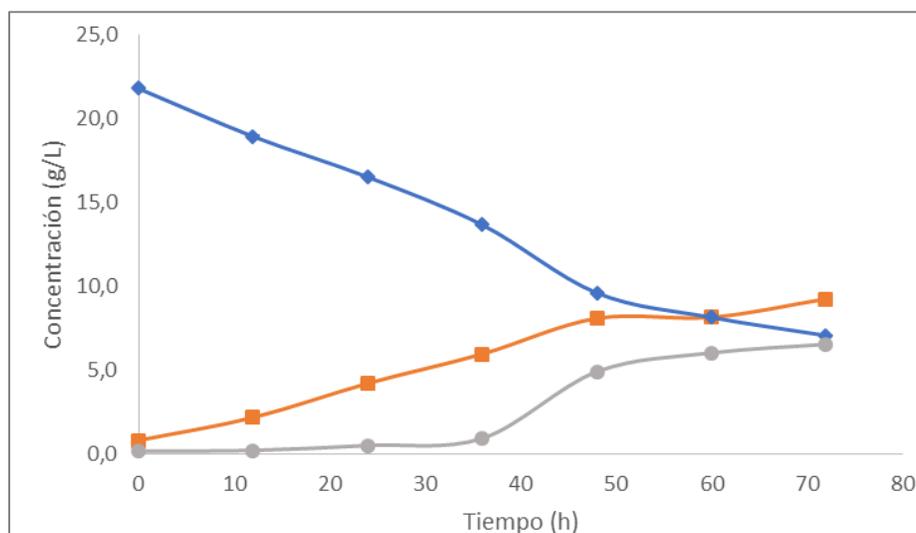


Figura 4. Cinética de fermentación validación de las mejores condiciones en medio estándar. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo).

En la Figura 4 se puede identificar que, en la cinética de validación de las mejores condiciones, se presentó: un consumo de glucosa de 14,4 g/L, una concentración máxima de biomasa de 9,2 g/L y una concentración máxima de PHA de 6,5 g/L, para un porcentaje de acumulación de PHA del 70,6 % (m/m), el cual bajo estas condiciones experimentales presenta un aumento del 21,1 %, con respecto a los resultados presentados en el capítulo 2 de esta tesis. En este caso, con respecto a los estudios presentados como comparativos en el capítulo anterior, se encuentra que el porcentaje de acumulación reportado en este capítulo es mayor.

### **Conclusiones**

El modelo cuadrático definido para las variables respuesta, bajo el diseño *Box Benkhen*, presentó validez una vez se hizo la comparación de los valores predichos por este y los obtenidos con un ensayo experimental bajo las mejores condiciones definidas.

El diseño *Plackett Burman* permitió identificar como factores significativos para la variable respuesta biomasa: la temperatura, el pH y la concentración inicial de nitrógeno y para la variable respuesta PHA la temperatura, el pH y concentración inicial de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

El desarrollo del diseño experimental permitió establecer como mejores condiciones para la obtención de PHA 31°C, 7 y 1.6 g/L para temperatura, pH y concentración inicial de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  respectivamente.

El modelo cuadrático definido para las variables respuesta, bajo el diseño *Box Benkhen*, permitió un aumento en las concentraciones de biomasa y PHA obtenidas bajo otras condiciones de los factores estudiados.

## Capítulo 4 – VALORACIÓN DE SUBPRODUCTOS INDUSTRIALES

## Introducción

A pesar de que los biopolímeros tipo PHA pueden reemplazar de manera efectiva a los polímeros convencionales de origen petroquímico, su producción a gran escala se ve aún limitada por los altos costos de producción, al compararlos con los costos de obtención de los polímeros convencionales, teniendo en cuenta que el costo de los PHAs, dependiendo de la composición del biopolímero, puede estar en un rango de 2,2 a 5,0 €/kg, lo que está alrededor de ser 3 veces mayor a los polímeros convencionales, los cuales tienen un costo de menos de 1,0 €/kg (Sabapathy et al., 2020). En este sentido, se hace importante el uso de fuentes de carbono no convencionales, obtenidas a partir de desechos agroindustriales, lo cual aporta considerablemente en la disminución de estos costos.

Dentro de estos desechos agroindustriales, el material lignocelulósico tiene un gran potencial para la producción de una amplia variedad de productos industriales, entre ellos: papel, maderas, bioetanol, biopolímeros como los PHAs y algunos productos de química fina (Obruca et al., 2015). Específicamente en el caso de los PHAs, se tienen como un sustrato muy promisorio para su producción ya que es un material abundante, económico, no compite con la cadena alimenticia humana, por lo cual aplica para tener un proceso de producción de PHA sostenible, sin embargo, hay que tener presente que el usar el material lignocelulósico para procesos biotecnológicos representa un reto por la necesidad de realizar un pretratamiento para su uso en las fermentaciones. Generalmente este pretratamiento incluye una etapa de remoción de lignina y reducción de la cristalinidad de la celulosa y otra etapa de hidrólisis de la biomasa a azúcares fermentables (Obruca et al., 2015).

De manera específica en Colombia, existe una gran disponibilidad de residuos agroindustriales. Entre ellos, el raquis de palma, el cual se genera en el proceso de extracción del aceite de palma y se calcula que se genera alrededor de 1M ton/año. Desecho que tiene un alto contenido de holocelulosa, la cual es una fuente potencial para obtención de productos de alto valor agregado a partir de procesos biotecnológicos, como pueden ser químicos o precursores de combustible, entre ellos, bioetanol, ácido láctico, nanotubos de biocarbono, furfural y electrodos para supercapacitores (Laverde et al., 2019).

Por otro lado, grandes volúmenes de desechos líquidos provenientes de la industria de cocción de mejillones son producidos en su procesamiento a lo largo de la costa de Galicia en España (lugar de realización de la pasantía). Este desecho, tiene un alto contenido de material orgánico, principalmente glucógeno y proteína, alrededor de 10 y 3,5 g/L, respectivamente. Esto hace que tengan una alta demanda de oxígeno químico (DQO), convirtiendo este residuo en un problema ambiental por su difícil procesamiento de

purificación, pero a su vez, lo convierte en un muy buen candidato para usarlo como medio de cultivo para la obtención de productos de alto valor agregado a partir de procesos biotecnológicos, como son: ácidos orgánicos, hormonas, péptidos antibacteriales y enzimas (Torrado et al., 2013).

## **Metodología**

### **Medios de cultivo**

#### ***Validación de mejores condiciones definidas para la obtención de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma.***

Para validar las mejores condiciones de obtención de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma, se usó como medio de cultivo para la preparación del inóculo el reportado en el capítulo 1 (pág. 28). El medio de cultivo para la obtención de PHA, se preparó con las sales del medio de cultivo reportado en el capítulo 1 (pág. 29), se reemplazó la fuente de nitrógeno por hidrolizado de gluten y la fuente de carbono por hidrolizado de raquis de palma. El raquis de palma utilizado y el procedimiento de obtención del hidrolizado de dicho material se realizó de acuerdo con lo reportado en capítulo 2 (pág. 35). El gluten utilizado y el procedimiento de obtención del hidrolizado de gluten fue realizado de acuerdo con lo reportado capítulo 3 (pág. 44).

#### ***Valorización del agua de cocción de mejillones como medio de cultivo para obtención de PHA.***

El inóculo se preparó en matraz de 100 mL, con un volumen de trabajo de 20 mL, se usó el medio de activación de *Halomonas boliviensis* el cual se reporta en la Tabla 20. Se dejó en crecimiento por 24 horas en agitador orbital a 30 °C y 165 rpm. Para inocular se adicionaron 10 mL del inóculo en 90 mL de medio definido usando agua de cocción de mejillones hidrolizada.

Tabla 20. Medio de cultivo para inóculo

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaCl	80
Casaminoácidos	7,5
Peptona	5
Extracto de Levadura	1
Citrato de Sodio	3
MgSO <sub>4</sub>	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05

En el trabajo realizado para identificar el potencial del agua de cocción de mejillones para ser valorizado al usarlo como medio de cultivo para la obtención de PHA, el medio utilizado fue agua de cocción de mejillones pretratada, con adición de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , con el fin de garantizar una concentración de fosfatos que no limiten el crecimiento de *Halomonas boliviensis*, ni la obtención de PHA. Esto teniendo en cuenta que es un desecho que cuenta con alto contenido de sales, fuente de carbono (glucógeno) y fuente de nitrógeno (proteína); cómo se puede observar en la Tabla 21, en la cual se presenta la caracterización del material usado.

Tabla 21. Caracterización agua de cocción de mejillones de conservera zona de Galicia (España)

Caracterización general (g/L)		Cuantificación de cationes (mg/L)		Cuantificación de aniones (mg/L)	
Sustancia	Concentración	Catión	Concentración	Anión	Concentración
Sólidos totales	34,8	Na <sup>(+)</sup>	6557,29	Cl <sup>(-)</sup>	11210,59
Cenizas	21,2	NH <sup>(+4)</sup>	185,19	Br <sup>(-)</sup>	80,26
Cationes y aniones	21,7	K <sup>(+)</sup>	720,03	NO <sub>2</sub> <sup>(-)</sup>	27,44
Glucógeno	5,7	Mg <sup>(+2)</sup>	695,13	NO <sub>3</sub> <sup>(-)</sup>	149,46
Proteína	2,2	Ca <sup>(+2)</sup>	321,18	PO <sub>4</sub> <sup>(-3)</sup>	2014,11
				SO <sub>4</sub> <sup>(-2)</sup>	1574,23

El pretratamiento del ACM consistió en dos etapas: clarificación e hidrólisis del glucógeno. Para la clarificación se adicionó HCl 5N hasta obtener un pH de 4,5, luego se dejó sedimentar por 3 horas y finalmente se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos para retirar lodos. El sobrenadante pasaba a la segunda etapa, la cual consistió en la hidrólisis del glucógeno usando glucoamilasa, la cual se adicionó en una concentración de 300  $\mu\text{L}$  de enzima por cada 100 mL de ACM, para luego dejar la mezcla durante una hora a una temperatura de 50 °C y con agitación orbital de 150 rpm. Este procedimiento fue llevado a cabo en una incubadora de agitación orbital. El agua de cocción de mejillones fue esterilizada por medio de filtrado, con el fin de evitar su descomposición al usar autoclave.

### Condiciones operacionales

#### ***Validación de mejores condiciones definidas para la obtención de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma.***

En este caso se mantuvieron las condiciones operacionales definidas en el capítulo 3 (pág. 45) para la etapa de validación de los valores máximos para el modelo cuadrático y en la Tabla 19 para temperatura, pH y concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### ***Valorización del agua de cocción de mejillones como medio de cultivo para obtención de PHA.***

Las condiciones operacionales en este caso, fueron definidas bajo las condiciones utilizadas por García Torreiro (2017) y Arcila Echavarría (2016), así: temperatura: 30 °C, pH 7, agitación 200 rpm. A escala de matraz se trabajó en Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, estos ensayos fueron realizados en incubadoras de agitación orbital; mientras a escala de biorreactor se trabajó con un equipo Biostat Q, usando un recipiente con volumen total de 1 L y usando un volumen de trabajo de 0,5 L. En este caso la agitación interna fue con agitación magnética a 250 rpm, el flujo de oxígeno se inició en 0,1 vvm y se fue aumentando hasta el flujo máximo a medida que el porcentaje de oxígeno disuelto disminuía, se adicionaron 100 µL de antiespumante y el pH se controló con NaOH 1M.

### **Métodos analíticos**

#### ***Validación de mejores condiciones definidas para la obtención de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma.***

La caracterización del hidrolizado de raquis de palma, así como la cuantificación del consumo de azúcares presentes durante la fermentación, fue realizada por HPLC. La caracterización del hidrolizado de gluten, así como la cuantificación del consumo de nitrógeno se realizó por el método de Biuret, descrito en el capítulo 1 (pág. 30). La biomasa y el PHA se cuantificaron utilizando los métodos descritos en el capítulo 1 (págs. 30-31), ambos por métodos colorimétricos. La extracción del PHA se realizó aplicando el protocolo presentado en el capítulo 1 (pág. 31).

### ***Valorización del agua de cocción de mejillones como medio de cultivo para obtención de PHA.***

Para la caracterización del agua de cocción de mejillones y su hidrolizado, se usaron analíticas como: cuantificación de carbono orgánico total y nitrógeno total, cuantificación de aniones y cationes, todos realizados usando la técnica de HPLC.

La cuantificación del consumo de nitrógeno se realizó por el método de cuantificación de nitrógeno amoniacal. El consumo de la fuente de carbono fue cuantificado haciendo uso del Kit de cuantificación de glucosa. El seguimiento al crecimiento de la biomasa fue realizado por espectrofotometría. Todas las analíticas anteriores, se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 1 (págs. 30- 31).

### ***Cuantificación de PHA***

La cuantificación del PHA se realizó por cromatografía de gases, siguiendo el protocolo descrito a continuación. El método se basa en la propanólisis del PHA. Como estándar externo se usó el copolímero P(3HB-co-3HV) de sigma y como estándar interno se utilizaron

20 mg/mL de ácido benzoico en 1-propanol. Las muestras liofilizadas y el estándar de PHA se pesaron usando una balanza analítica en tubos de tapa rosca. 1,5 mL de la solución HCl:1-propanol (1:4), 1,5 mL de dicloroetano y 50 µL de estándar interno fueron adicionados en los tubos, los cuales fueron calentados durante 2 horas a 100 °C. Después de enfriados, se adicionaron 3 mL de agua destilada, 1 mL de fase orgánica, la cual contiene los ésteres del PHA, fue filtrada y analizada en un cromatógrafo de gases HP 6850 Series II G. C. Este equipo estaba equipado con un detector FID y una columna HP-INNOWAX Agilent 19091N-133E. La fase móvil fue helio con un flujo de 1 mL/min, temperatura de inyección 250 °C, temperatura de detección 275 °C, temperatura inicial del horno 60 °C, la cual incrementó hasta 230 °C con una velocidad de 10 °C/min hasta alcanzar los 160 °C, para continuar su incremento de a 20 °C hasta los 230 °C (García Torreiro, 2017).

### **Etapas definidas para la valorización del agua de cocción de mejillones como medio de cultivo para obtención de PHA a partir de *Halomonas boliviensis*.**

#### ***Verificación del crecimiento celular***

Una vez fue validado el procedimiento para el pretratamiento del agua de cocción de mejillones y su hidrólisis, se realizó una fermentación con *Halomonas boliviensis*, usando como medio de cultivo el agua de cocción de mejillones hidrolizada. La cuantificación de los nutrientes presentes en el medio se realizó de acuerdo con lo indicado en el apartado de métodos analíticos de este capítulo (pág. 57).

La preparación del inóculo se realizó de acuerdo con lo reportado en el ítem de medios de cultivo (pág. 55), las condiciones operacionales se mantuvieron acordes con lo descrito previamente (pág. 56). Durante la fermentación se realizó cuantificación de glucosa y de biomasa, con el fin de verificar el crecimiento de la bacteria y el consumo de la fuente de carbono. Se definió mantener la fermentación hasta obtener el consumo total de la fuente de carbono.

#### ***Definición del medio de cultivo para acumulación de PHA***

Teniendo en cuenta que *Halomonas boliviensis* creció sin inconvenientes usando como medio de cultivo el hidrolizado de agua de cocción de mejillones, pero no fue detectado acumulación alguna de PHA, se hace necesario verificar la necesidad de ajustar la concentración inicial de algunos nutrientes, con el fin de direccionar la acumulación de PHA. Adicionalmente, se identifica la necesidad de controlar el pH del medio durante la fermentación (mientras se trabaja a escala de matraz), ya que, al no tener buffer en el medio, esta baja considerablemente, situación que también puede afectar la acumulación de PHA. En ese sentido, se definieron los siguientes ensayos.

- **Control de pH con  $\text{NaHCO}_3$ :** En este ensayo se realizó una fermentación adicionando al hidrolizado del agua de cocción de mejillones  $\text{NaHCO}_3$ , en una relación 1:1 con respecto a la concentración de glucosa inicial. Adicionalmente, se define ajustar la concentración inicial de glucosa a 20 g/L, de acuerdo con los medios trabajados por (López Abelairas, 2013; Arcila Echavarría, 2016), con el fin de lograr una fermentación que dure el tiempo suficiente para la acumulación del PHA. Durante la fermentación se realiza seguimiento al crecimiento de la biomasa, consumo de glucosa y pH, con el fin de verificar el crecimiento de la bacteria y el control del pH.
- **Ajuste de concentración de nutrientes:** La concentración de glucosa inicial se ajusta a 40 g/L, de acuerdo con (López Abelairas, 2013) y de acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa previa. En esta etapa, se planteó un ensayo en el cual se comparó el comportamiento de la bacteria usando como medio de cultivo el hidrolizado de agua de cocción de mejillones ajustando la concentración inicial de NaCl a 45 g/L, de acuerdo con los medios de cultivo usados para *Halomonas boliviensis*, y sin adición de sal. Durante la cinética se hace seguimiento al crecimiento de la biomasa, consumo de glucosa y pH cada 12 horas, mientras a la acumulación de PHA se le realiza cada 24 horas; esto durante las 72 horas que duró el ensayo.

#### **Validación de la acumulación de PHA en biorreactor de 1L.**

Se plantea un ensayo en biorreactor a escala de 1L con el medio de cultivo definido a partir de las etapas previas y con las condiciones operacionales descritas previamente (pág. 56), con el fin de validar a esta escala y con un mayor control de pH, la capacidad de crecimiento y acumulación de PHA de *Halomonas boliviensis*, usando el hidrolizado de agua de cocción de mejillones como medio de cultivo. Durante este ensayo se realiza seguimiento al crecimiento de la biomasa, el consumo de glucosa y a la acumulación de PHA.

### **Resultados y discusión**

#### **Obtención de PHA a escala de matraz usando hidrolizado de raquis de palma.**

Bajo las condiciones operacionales definidas como mejores condiciones, en el rango estudiado para cada uno de los factores de este estudio, usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma, se obtuvieron concentraciones de biomasa y PHA de 6,4 g/L y 2,3 g/L, respectivamente; lo que representa un acercamiento del 70 % y del 35,4 % al valor obtenido con el medio estándar para biomasa y PHA, respectivamente. Lo cual muestra un potencial en el uso de estas fuentes de nutrientes no convencionales, fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma y como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten, para la

obtención de PHA con *Halomonas boliviensis*. Se presenta en la Figura 5 la cinética de la fermentación de este ensayo.

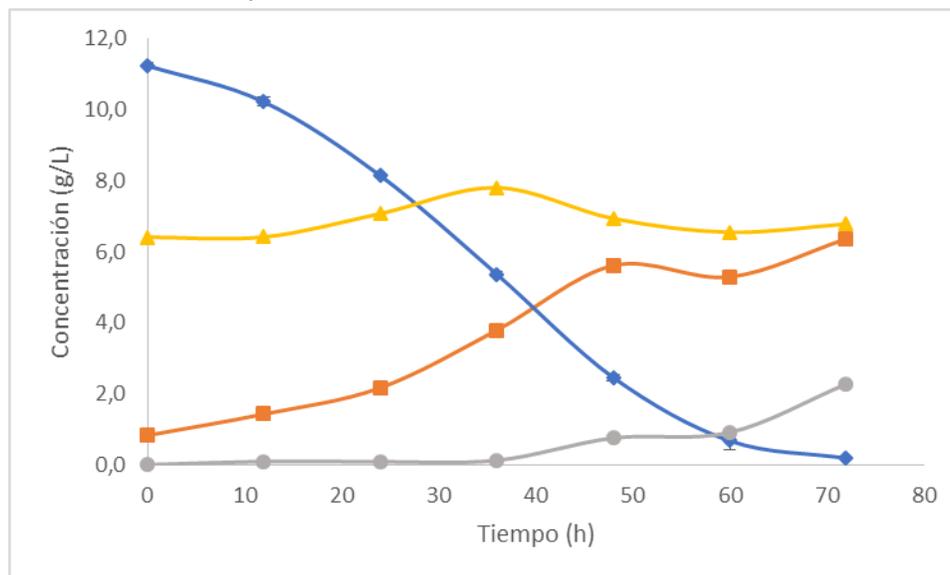


Figura 5. Cinética de fermentación usando las mejores condiciones en medio usando Hidrolizado de Raquis de Palma e Hidrolizado de Gluten como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente, a escala de matraz. Concentración de glucosa (diamante), xilosa (triángulo), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo).

En la Figura 5 se puede identificar, que en la cinética usando fuente de carbono y nitrógeno no convencionales y las mejores condiciones identificadas, se presentó un consumo de glucosa de 11,1 g/L, una concentración máxima de biomasa de 6,4 g/L y una concentración máxima de PHA de 2,3 g/L, para un porcentaje de acumulación de PHA del 35,7 % (m/m).

En la Tabla 22 se presentan los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados en esta investigación a escala de matraz. En ella se puede evidenciar, al comparar los ensayos realizados bajo condiciones basadas en referentes, con respecto a los ensayos realizados usando las mejores condiciones definidas, que el porcentaje de acumulación de PHA aumentó en un 21,1% (m/m) y en un 15,9% (m/m), al usar como fuente de carbono glucosa e hidrolizado de raquis de palma, respectivamente; y usando como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten.

Al comparar con los resultado obtenidos en otros estudios, presentados en la Tabla 7, en los cuales evaluaron la acumulación de PHA a partir de microorganismos productores de este biopolímero y usando como fuente de carbono hidrolizado de material lignocelulósico, se puede evidenciar, que el porcentaje de acumulación de PHA alcanzado en este capítulo continúa por debajo de los demás estudios en un rango de 11,9 y 16,7 % (m/m), porcentaje

que mejoró con respecto a los resultados presentados en el capítulo 2, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, es importante resaltar el uso de hidrolizado de gluten como fuente de nitrógeno, la cual es una fuente no convencional, económica y que pudo interferir en la obtención de un mayor porcentaje de acumulación de PHA.

Tabla 22. Comparación ensayos realizados en este estudio

Microorganismo	Fuente de Carbono	Condiciones de trabajo	PHA (% m/m)	Referencia
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de raquis de palma	Basadas en referentes	30,8	Este estudio, capítulo 2
<i>Halomonas boliviensis</i>	Glucosa pura	Basadas en referentes	58,3	Este estudio, capítulo 2
<i>Halomonas boliviensis</i>	Glucosa pura	Mejores condiciones	70,6*	Este estudio, capítulo 3
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de raquis de palma	Mejores condiciones	35,7*	Este estudio, capítulo 4

\*Resultados obtenidos usando como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten

#### Obtención de PHAs usando agua de cocción de mejillones hidrolizada.

##### Verificación del crecimiento celular

Como se presenta en la Figura 6, al usar el hidrolizado del agua de mejillón como medio de cultivo, se logra un crecimiento de la bacteria alcanzando una concentración de biomasa máxima de 1,9 g/L, la cual se presenta a la hora 24, hora final de la experimentación y en la cual se presenta un consumo total de la fuente de carbono.

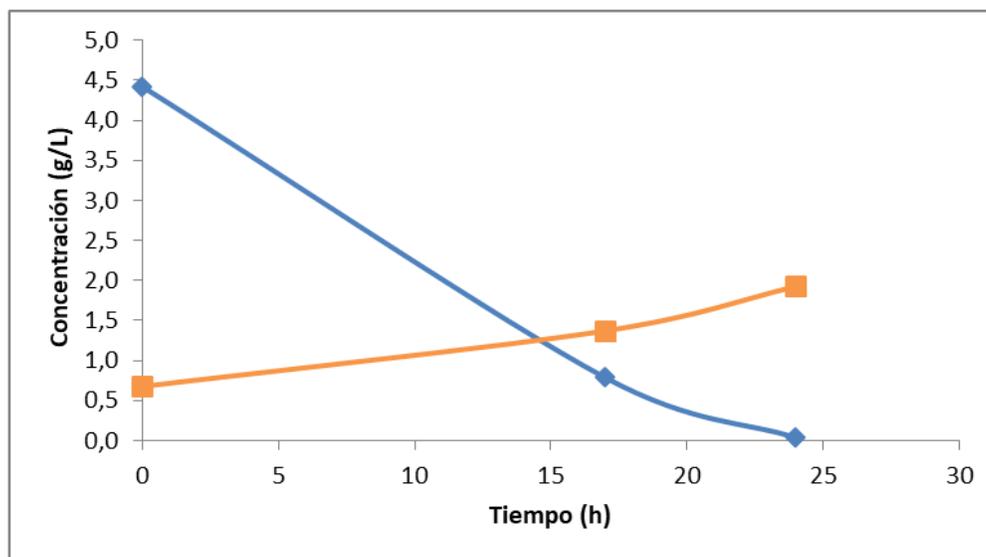


Figura 6. Crecimiento de *H. boliviensis* usando como medio de cultivo agua de cocción de mejillones hidrolizada. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado).

En el punto final de la cinética, se realizó extracción y cuantificación de PHA. Sin embargo, no se detectó acumulación alguna del biopolímero por parte del microorganismo.

Con este ensayo se identifica que este material cuenta con los nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, no se presentó acumulación del PHA, lo cual sugirió que posiblemente la concentración de alguno de los nutrientes no está en la cantidad necesaria para direccionar la acumulación del PHA, que debía tener un mayor tiempo de cultivo o tener un mayor control del pH.

Con los resultados obtenidos con este ensayo se evalúa la necesidad de ajustar la concentración de glucosa en el hidrolizado de agua de cocción de mejillones, de tal manera que la cinética pueda durar más tiempo y no presentar un consumo total de la fuente de carbono, situación importante para lograr acumulación del PHA.

Otro aspecto identificado fue la reducción significativa del pH (valor de 4), por lo cual, mientras se estén realizando ensayos a escala de matraz, se hace necesario adicionar una sustancia al medio que cumpla la función de buffer, con el fin de lograr que el pH no presente valores por debajo de 6, y tener condiciones que permitan la acumulación del PHA. Para este fin se decide adicionar  $\text{NaHCO}_3$ .

#### ***Definición del medio de cultivo para acumulación de PHA***

- **Control de pH con  $\text{NaHCO}_3$ :** en este primer ensayo se usó una concentración inicial de  $\text{NaHCO}_3$  de 3 g/L, la cual no fue suficiente ya que el pH bajó hasta 5 en las primeras 24 horas de la fermentación. Se optó por realizar un ajuste del pH hasta 7 en el momento de la toma de muestra, sin embargo, una vez cumplidas las 48 horas del ensayo el pH se encontraba nuevamente en 5. Este ensayo se inició con una concentración de glucosa de 15 g/L y se realizó un pulso a la hora 27 de 10 g/L. Al finalizar el ensayo en la hora 48 se tenía una concentración de glucosa de 6,9 g/L, lo que representó un consumo de fuente de carbono de 18,1 g/L, con lo cual se presentó crecimiento de la bacteria sin acumulación de PHA.

Con estos resultados se realizó un segundo ensayo con una concentración inicial de  $\text{NaHCO}_3$  de 10 g/L, con la cual se logró que el pH tardara hasta la hora 48 para llegar a 5, momento en el que se realizó un pulso de  $\text{NaHCO}_3$  de 5 g/L luego de ajustar el pH a 7. Esto permitió que el pH estuviera en 6 a la hora 72, hora hasta la cual se buscó llevar la cinética con el fin de lograr un tiempo suficiente que permitiera la acumulación de PHA. En este caso se inició con una concentración de glucosa de 36

g/L y se presentó un consumo de este nutriente de 22 g/L. Sin embargo, al igual que en el ensayo anterior se presentó crecimiento de biomasa sin acumulación de PHA. A partir de los resultados obtenidos se ratificó la importancia del control del pH, buscando evitar valores por debajo de 6. Estando en concordancia con estudios previos, que con la misma bacteria en otros medios de cultivo logran acumulación de PHA con un valor de pH igual o mayor a 6. Se concluyó tener una concentración de inicio de  $\text{NaHCO}_3$  de 10 g/L, con un pulso de  $\text{NaHCO}_3$  de 5 g/L en la hora 40 del ensayo. Además, tener una concentración inicial de fuente de carbono de 30 g/L.

- **Ajuste de concentración de nutrientes:** en la Figura 7 se puede evidenciar un alto consumo de glucosa, 21,2 y 22,1 g/L para a y b, respectivamente. Sin embargo, se presenta un bajo crecimiento de biomasa, 4,34 y 4,46 g/L para a y b, respectivamente. Adicionalmente, para el ensayo a, en el cual no se realizó ajuste de la concentración inicial de NaCl al medio, se detectó acumulación de PHA en un porcentaje del 3,59 %; mientras que en el ensayo b, no se detectó acumulación alguna del biopolímero.

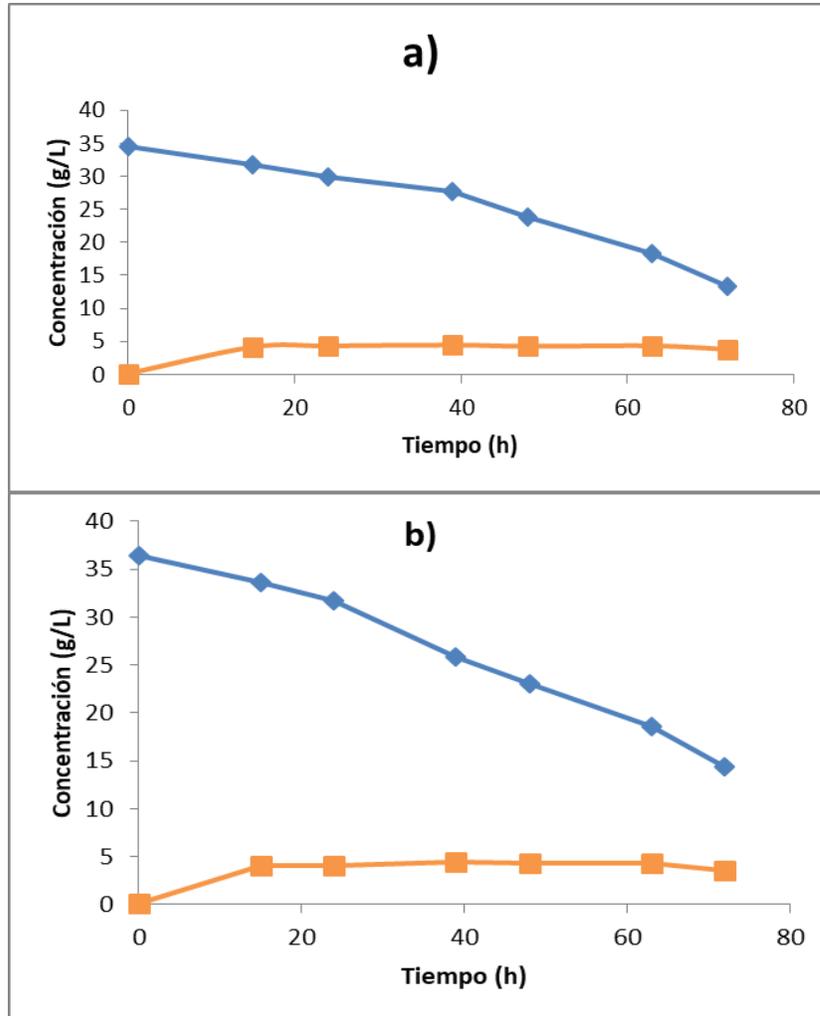


Figura 7. Crecimiento de *H. boliviensis* en agua de cocción de mejillones hidrolizada, con adición de  $\text{NaHCO}_3$  y glucosa. a) Sin ajuste de concentración inicial de  $\text{NaCl}$ . b) Con ajuste de la concentración inicial de  $\text{NaCl}$ . Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado).

En este caso se concluyó que no era necesario hacer ajuste en la concentración de  $\text{NaCl}$  al medio. Con lo cual el siguiente ensayo a escala de biorreactor se trabajó usando como medio de cultivo el agua de cocción de mejillones hidrolizada con ajuste de la concentración inicial de glucosa.

#### **Validación de la acumulación de PHA en biorreactor de 1L.**

Los resultados obtenidos a escala de bioreactor usando como fuente de carbono hidrolizado de agua de cocción de mejillones se presentan en la figura 8.

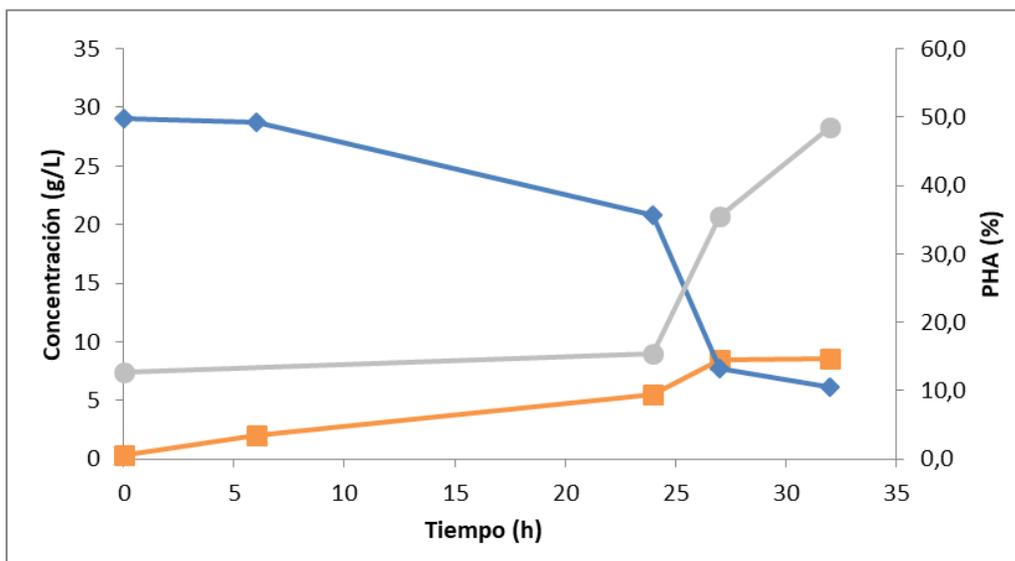


Figura 8. Cinética de fermentación en biorreactor a escala de 1L. Concentración de glucosa (diamante), biomasa (cuadrado) y PHA (círculo).

En este ensayo se presentó un porcentaje de acumulación de PHA del 48,5 % (m/m), con un crecimiento máximo de biomasa de 8,6 g/L y un consumo total de glucosa de 22,9 g/L. Se puede observar que con respecto al uso de fuentes de carbono no convencionales, en el ensayo que se presenta un mayor porcentaje de acumulación de PHA, es en el que se usa agua de cocción de mejillones. Incluso, al comparar este resultado con el obtenido usando como fuente de carbono glucosa pura, se presenta un acercamiento en la acumulación de PHA de un 68,7 % (m/m) y un 83,2 % (m/m) al tener condiciones de trabajo basadas en referentes y las mejores condiciones definidas en este estudio, respectivamente.

De acuerdo con lo presentado en la Tabla 7, el porcentaje de acumulación de PHA obtenido en este capítulo fue del 35,7 y 48,5 % (m/m) utilizando hidrolizado de raquis de palma e hidrolizado de agua de cocción de mejillones, respectivamente, se evidencia que en este estudio se presenta el mayor porcentaje alcanzado con microorganismos halófilos. Con respecto al mayor valor presentado con otra especie (*Bacillus megatreium R11*) sobre hidrolizado de material lignocelulósico, está 3,1 % por debajo.

En este caso el agua de cocción de mejillones se presenta como un desecho de la industria marina, con un alto potencial de ser aprovechado por medio de la producción de biopolímeros tipo PHA. Su mayor viabilidad de uso se presenta, logrando un pretratamiento que permita concentrar bien sea el glucógeno (etapa previa a la hidrólisis) o la glucosa (etapa posterior a la hidrólisis), con el fin de alcanzar la concentración inicial de fuente de carbono necesaria para la acumulación del PHA.

## Conclusiones

El porcentaje de acumulación de PHA al usar como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma, con respecto a los resultados obtenidos en el capítulo 2 (fuentes puras), aumentó (21.1%) al usar las condiciones identificadas como mejores. Esto permitiría presumir, que el uso de la fuente de nitrógeno no convencional puede favorecer esta acumulación.

El porcentaje de acumulación de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma, fue menor al obtenido con glucosa pura, con una diferencia del 35 % aproximadamente.

El agua de cocción de mejillones cuenta con los nutrientes necesarios para el crecimiento de *Halomonas boliviensis*, requiere solo una etapa de pretratamiento y el proceso de hidrólisis es de corto tiempo y sencillo.

Se presenta un comportamiento similar en el crecimiento de *H. boliviensis* con el medio ajustado de NaCl y sin adición de esta, sin embargo, no se presentó acumulación de PHA en la fermentación realizada haciendo uso del medio con adición de NaCl.

El mayor porcentaje de acumulación de PHA se presentó usando como medio de cultivo el hidrolizado del agua de cocción de mejillones, en comparación con los resultados obtenidos usando como fuente de carbono el hidrolizado de raquis de palma.

El agua de cocción de mejillones se identifica como un subproducto con un alto potencial de valorización, al usarlo como medio de cultivo para la obtención de biopolímeros tipo PHA a partir de *Halomonas boliviensis*.

# Capítulo 5 – EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHA EN BIORREACTOR

## Introducción

Los PHAs son biopolímeros degradables que pueden reemplazar los plásticos convencionales de manera efectiva debido a que las propiedades del material son similares a las de los termoplásticos y elastómeros (Al-battashi et al., 2019). Sin embargo, su producción a gran escala es aún limitada por sus altos costos de producción. Entre los aspectos que afectan estos costos y por tanto limitan la comercialización para las compañías productoras de PHAs a escala comercial, se encuentran: la necesidad de esterilización en el proceso, el uso de sustratos puros, en algunos casos por falta del uso de microorganismos que tengan la capacidad de emplear sustratos no convencionales, residuos de otras industrias, que sean mucho más económicos en comparación con los sustratos puros. En este sentido, también se hace importante la evaluación de condiciones de cultivo tales como: pH, temperatura, relaciones C/N/P, factores que inhiban la producción, especificidades de los sustratos utilizados, estrategias de optimización, entre otras (Sabapathy et al., 2020).

Las bacterias halófilas se presentan como una alternativa para la obtención de PHAs. De manera específica se conoce que la bacteria halófila, *Halomonas boliviensis*, tiene la capacidad de consumir fuentes de carbono y nitrógeno no convencionales para la obtención de estos biopolímeros. La condición de halofilidad presenta la ventaja de disminuir o incluso llegar a no requerir esterilización; aspectos que hacen importante su estudio a una mayor escala a la usada en los ensayos previos. En este capítulo se evaluó el comportamiento de *H. boliviensis* en la obtención de PHAs usando fuentes de carbono y nitrógeno no convencionales a escala de biorreactor.

Para el trabajo en biorreactor de fermentación aeróbica, factores operacionales como la agitación y la aireación son de suma importancia, para dar las condiciones apropiadas de crecimiento y obtención de metabolitos al microorganismo utilizado. La aireación tiene un efecto significativo debido a la baja solubilidad del oxígeno en el medio, lo cual afecta el suministro de oxígeno y por tanto podría llegar a no cubrir la demanda de oxígeno requerida por el microorganismo para su crecimiento. La agitación del medio es importante para mantener las condiciones uniformes en todo el biorreactor, en este sentido, el coeficiente global de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) es un parámetro importante para evaluar, ya que está relacionado con la tasa de transferencia de oxígeno, parámetro que fue evaluado por Marsiglia López (2018) con *Halomonas boliviensis* y usando como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten, por lo cual su mejor condición reportada se usa como valor referente para este estudio (Marsiglia López, 2018).

Finalmente, es importante caracterizar el material obtenido, con el fin de validar el tipo de PHA obtenido y proponer posibles aplicaciones de acuerdo con sus propiedades y características. El objetivo de este capítulo fue estudiar la producción de PHA a una mayor escala, partiendo de las mejores condiciones obtenidas en los diseños experimentales a escala de matraz.

## **Metodología**

### **Medio de cultivo**

Para estudiar la producción de PHA a una mayor escala, partiendo de las mejores condiciones de obtención de este, obtenidas en los ensayos previos, se usó como medio de cultivo para la preparación del inóculo el reportado en el capítulo 2 (pág. 28). El medio de cultivo para la obtención de PHA, se preparó con las sales del medio reportado en el capítulo 2 (pág. 29), como fuente de carbono se usó hidrolizado de raquis de palma y se reemplazó la fuente de nitrógeno por hidrolizado de gluten.

### **Condiciones operacionales**

Este ensayo fue realizado en un biorreactor marca Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, Estados Unidos) equipado con sensores de pH, temperatura, oxígeno disuelto y espuma. La temperatura, pH y concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fueron definidos de acuerdo con lo presentado en la Tabla 9, así: temperatura 30 °C la cual fue mantenida usando una chaqueta de calentamiento del biorreactor, pH con un valor de 7,0 fue mantenido usando HCl/NaOH 0,1M y concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en medio de cultivo de 1,6 g/L.

El biorreactor contó con un volumen total de 3L y un volumen de trabajo de 2L, el ensayo se mantuvo por 60 horas y se tomaron muestras de 10 mL cada 12 horas, con el fin de realizar seguimiento a las variables respuesta: concentración de biomasa y de PHA, así como al consumo de nutrientes como azúcares reductores, nitrógeno y fósforo. Se adicionó antiespumante al inicio de la fermentación y se definieron como condiciones para mantener una concentración de oxígeno disuelto apropiada para el ensayo, las reportadas por (Marsiglia López, 2018), así: agitación de 300 rpm y un flujo de oxígeno de 5 vvm. El oxígeno disuelto fue monitoreado, el sensor fue calibrado usando  $\text{N}_2$  y aire para definir el 0 y el 100 % (v/v), respectivamente.

### **Métodos analíticos**

La biomasa y el PHA se cuantificaron bajo los métodos descritos en el capítulo 2 (págs. 30-31), ambos por métodos colorimétricos. La caracterización del hidrolizado de raquis de palma, así como la cuantificación del consumo de azúcares presentes durante la

fermentación, fue realizada por HPLC siguiendo la metodología descrita y detallada en el capítulo introductorio (pág. 31). El raquis de palma utilizado y el procedimiento de obtención del hidrolizado de dicho material, son acordes con lo reportado en el capítulo 2 (pág. 35). El gluten utilizado y el procedimiento de obtención del hidrolizado de gluten se realizaron de acuerdo con lo reportado en el capítulo 3 (pág. 44).

### Recuperación de PHA

En este estudio se realizó la recuperación o extracción del PHA bajo dos técnicas diferentes como se esquematiza en la Figura 9, para su posterior comparación en la caracterización del material. Una de las técnicas usadas fue la extracción por solventes usando cloroformo y la otra fue por extracción con fluidos supercríticos.

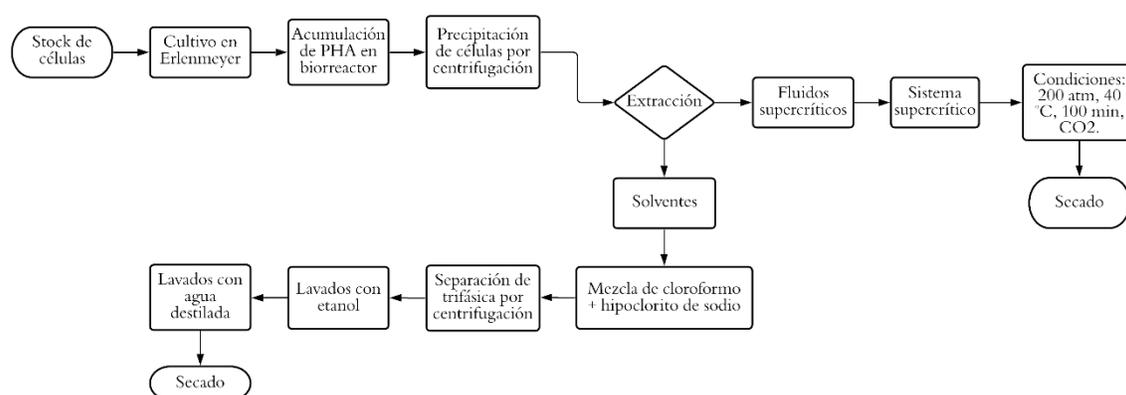


Figura 9. Representación esquemática de las técnicas de extracción de PHA evaluadas en este estudio. Elaborado por el autor.

#### **Extracción por solventes**

En este caso, la extracción de PHA de las células se realizó con la metodología empleada por (Z. Ujang, Salim, & Olsson, 2009) que consiste en mezclar cloroformo e hipoclorito al 5 % (m/v) en una relación 1:2 con las células. Luego se someten a 40 °C y 200 rpm por un tiempo de 180 min. Después se toma la mezcla y centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos de donde se obtiene una mezcla de tres fases. Posteriormente se hacen tres lavados con etanol a la parte sólida obtenida con el procedimiento anterior y se finaliza lavando con agua destilada. Se deja secar a temperatura ambiente.

#### **Extracción con fluidos supercríticos**

En este caso se definieron las condiciones reportadas por (Koller, Niebelschütz, et al., 2013) así: fluido CO<sub>2</sub>, presión 200 atm, temperatura 40 °C y por un tiempo de 100 minutos. Esta extracción se realizó en el equipo Applied separations, modelo Speed SFE-2 Supercritical System.

## Caracterización de PHA

La caracterización del PHA se realizó por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en un equipo marca Thermo Scientific, referencia Nicolet iS10, con detector Smart iTR. Fue llevada a cabo por comparación con un estándar de PHB marca Aldrich, ya que por referencias bibliográficas éste era el tipo de PHA que se esperaba obtener.

## Resultados y discusión

### Obtención de PHA usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma a escala de biorreactor.

Bajo las condiciones operacionales y nutricionales validadas en el capítulo anterior a escala de matraz, usando como fuente de carbono hidrolizado de raquis de palma y como fuente de nitrógeno hidrolizado de gluten, al trabajar a escala de biorreactor se obtuvieron concentraciones finales de biomasa y PHA de 9,0 g/L y 4,1 g/L, respectivamente; lo que representa un porcentaje de acumulación del 45,5 % (m/m). Se presenta en la Figura 10 la cinética de la fermentación de este ensayo.

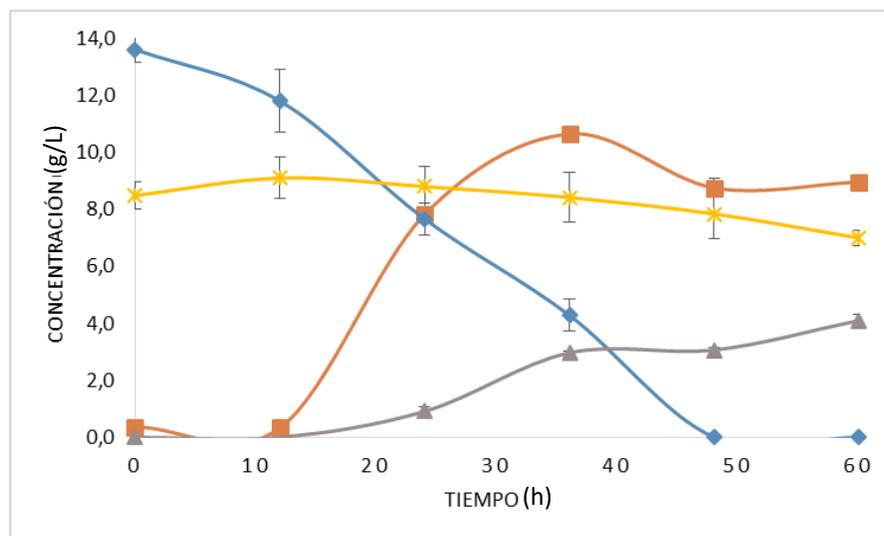


Figura 10. Cinética de fermentación usando las mejores condiciones en medio usando Hidrolizado de Raquis de Palma e Hidrolizado de Gluten como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente, a escala de biorreactor. Concentración de glucosa (diamante), xilosa (estrella), biomasa (cuadrado) y PHA (triángulo).

En la Figura 10 se puede identificar que en la cinética de este ensayo se presentó un consumo de glucosa de 13,1 g/L y de xilosa de 2,0 g/L, una concentración máxima de biomasa de 10,6 g/L y una concentración máxima de PHA de 4,1 g/L, los cuales no se dieron simultáneamente para ambas variables respuesta.

En la Tabla 23 se realiza una comparación de los diferentes ensayos realizados durante el trabajo presentado en este documento usando las fuentes de carbono no convencionales. En ella se puede identificar cómo, al trabajar a escala de biorreactor usando el hidrolizado de raquis de palma como fuente de carbono, se presenta un aumento, con respecto al trabajo realizado a escala de matraz, en el porcentaje de acumulación del PHA del 9,8 % (m/m), posiblemente como consecuencia de las condiciones operacionales controladas con mayor rigor a esta escala, especialmente con respecto al suministro de oxígeno, de acuerdo con Nath et al. (2008) la limitación y optimización del nivel oxígeno disuelto en los fermentadores y el tiempo en que se limita tiene un efecto considerable sobre la concentración celular final y el contenido de PHA. Además, se reconoce un porcentaje de acumulación de PHA muy cercano, en los ensayos usando las dos fuentes de carbono no convencionales estudiadas en este trabajo.

Tabla 23. Comparación ensayos realizados en este estudio con fuentes de carbono no convencionales

<b>Microorganismo</b>	<b>Fuente de Carbono</b>	<b>Condiciones de trabajo</b>	<b>PHA (% m/m)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de raquis de palma	Basadas en referentes – Escala matraz	30,8	Este estudio, capítulo 3
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de raquis de palma	Mejores condiciones – Escala matraz	35,7	Este estudio, capítulo 5
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de agua de cocción de mejillones	Basadas en referentes – Biorreactor 1 L	48,5	Este estudio, capítulo 5
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolizado de raquis de palma	Mejores condiciones – Biorreactor 3 L	45,5	Este estudio, capítulo 6

De acuerdo con los resultados reportados por Múniera (2019), en donde presenta el costo de la glucosa procedente de hidrolizado de raquis de palma y de la glucosa pura, se estimó que el costo de obtención de biopolímero es de 1US/Kg PHA con hidrolizado de raquis de palma y 2,17US/Kg PHA a partir de glucosa pura. A pesar de que en los medios alternativos se presentaron acumulaciones menores respecto al medio estándar, con glucosas pura, se pudo establecer que en estos medios el costo de la fuente de carbono es menor en un 117%, es decir, al usar glucosa pura se tiene el doble del costo.

Adicionalmente, de acuerdo con los costos de diferentes fuentes de nitrógeno reportados por Marsiglia López (2018), se puede identificar para el hidrolizado de gluten, como fuente de nitrógeno no convencional, un costo de 0,021 US/Kg PHA, y para una fuente de nitrógeno orgánico puro, un costo de 0,122 US/Kg PHA, lo que es casi 6 veces más costoso.

### **Caracterización del PHA obtenido**

#### ***Análisis de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)***

La Figura 11, presenta el espectro infrarrojo de las muestras extraídas por los dos métodos usados en este estudio. En comparación con el espectro del estándar (Figura 11 a), la muestra extraída por los solventes cloroformo e hipoclorito de sodio (Figura 11 b) presenta la banda característica a los  $1725\text{ cm}^{-1}$  que representa a la vibración del enlace éster ( $\text{RC}=\text{O}$ ) (Porrás et al., 2014). La intensidad de banda alrededor de los  $2950\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de los grupos alifáticos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$  cuya intensidad se debe al desorden conformacional obtenido en el proceso de cristalización, específicamente la banda de absorción en  $2955\text{ cm}^{-1}$  es asignada al grupo metilo asimétrico, la banda en  $2925\text{ cm}^{-1}$  al  $\text{CH}_2$  asimétrico de las cadenas monoméricas laterales y la absorción a  $2855\text{ cm}^{-1}$  al grupo metilo simétrico (Gumel et al., 2014). La muestra extraída por medio del fluido supercrítico  $\text{CO}_2$  presenta ambas bandas características a los  $1725\text{ cm}^{-1}$  y  $2950\text{ cm}^{-1}$  (Figura 11 c), con lo cual se puede validar que el material obtenido por la extracción supercrítica presenta características mucho más similares a la de la muestra comercial PHB, por lo tanto, se puede sugerir que el biopolímero podría ser polihidroxibutirato (PHB). Comparando estos resultados con los presentados por Narayanan et al., (2021), en ambos espectros, se identifican adicionalmente, bandas residuales en el rango de los  $1000$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del enlace C-O del grupo ester, así como la banda que se presenta a los  $1380\text{ cm}^{-1}$  que representa el estiramiento de  $\text{CH}_3$ ; los cuales apoyan la idea de la similitud del material obtenido con el PHB, teniendo en cuenta que en dicho estudio validaron por análisis con NMR que el material obtenido fue PHB.

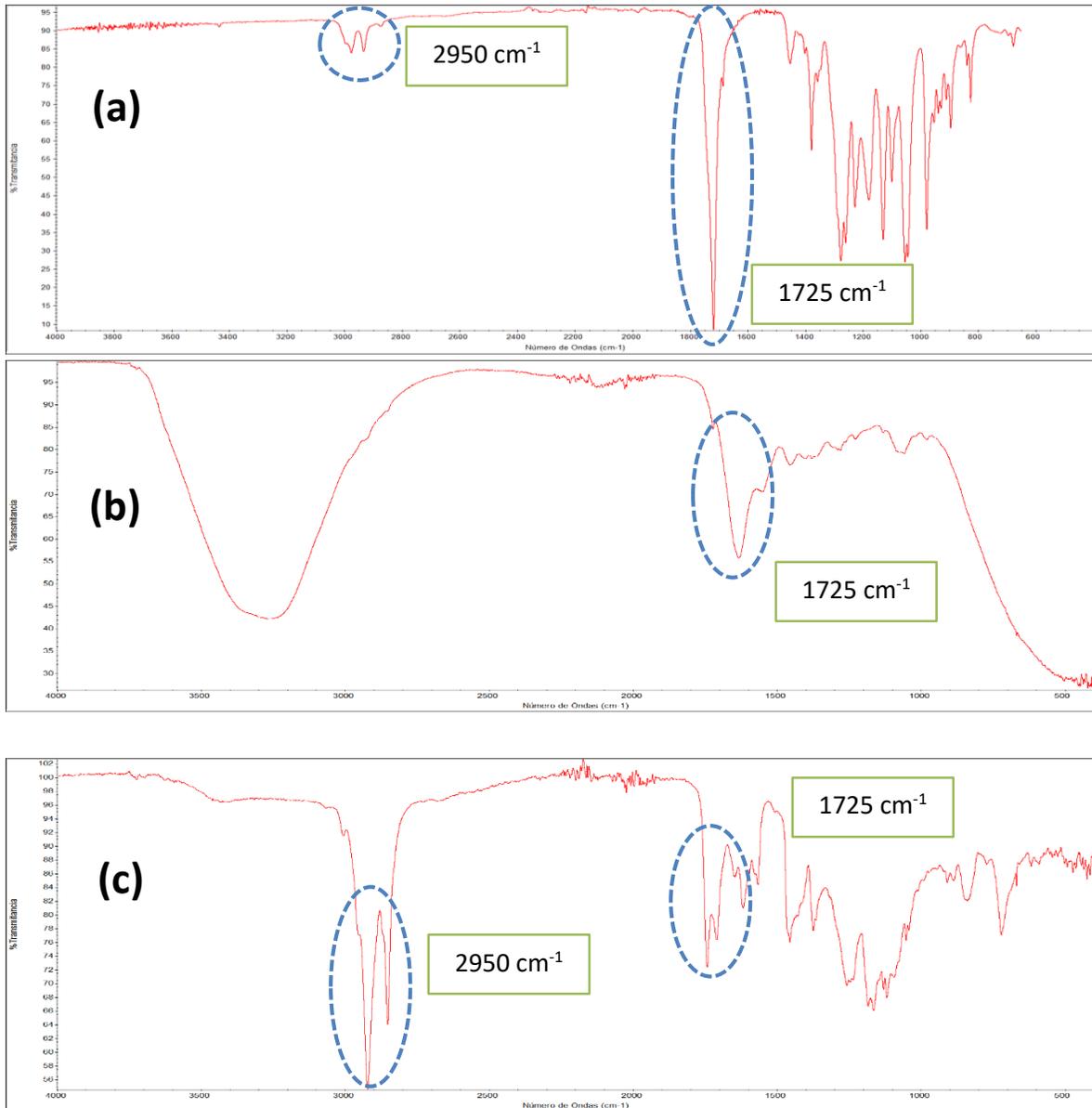


Figura 11. Espectros obtenidos con las pruebas FTIR, (a) Estándar de PHB de Sigma Aldrich, (b) muestra de biopolímero extraído por solventes cloroformo e hipoclorito, (c) muestra de biopolímero extraído por CO<sub>2</sub> supercrítico.

Es importante tener en cuenta que la aplicabilidad del método de extracción depende de diversos factores, como lo menciona Koller et al. (2013), como la fragilidad de la pared celular que dependerá de la especie que se esté utilizando. En este caso *Halomonas boliviensis* es una bacteria gram-negativa, es decir que posee adicionalmente una membrana externa compuesta principalmente por proteínas y lipopolisacáridos, a diferencias de las bacterias gram-positivas. Por lo que es posible que el proceso de recuperación del PHA requiera de un proceso más riguroso de ruptura celular y que contemple una buena remoción de restos celulares. Es vital la selección de solvente

adecuado que sea capaz de atravesar la membrana celular y también remueva la capa de proteínas que envuelven los gránulos de PHA, de tal manera que no se impacte la masa molecular y las propiedades del PHA obtenido finalmente (Mannina et al., 2020). Complementariamente, como se esquematizó en la Figura 9, el método de extracción por solventes requiere una serie de pasos que se deben realizar con especial cuidado y rigurosidad, cualquier dificultad técnica en la ejecución de la purificación del material también podría arrojar resultados no esperados.

### **Conclusiones**

Al trabajar usando como fuente de carbono no convencional, hidrolizado de raquis de palma, a escala de biorreactor de 3L, se logró un aumento en el porcentaje de acumulación de biopolímero con respecto al trabajo realizado a escala matraz.

Se puede sugerir que el biopolímero extraído por el método de extracción de fluidos supercríticos, podría ser polihidroxibutirato (PHB), ya que presenta características mucho más similares a las de la muestra comercial de este material.

Se valida que el hidrolizado de raquis de palma es un material con gran potencial de valorización al usarlo como materia prima para la obtención de PHB a partir de *Halomonas boliviensis*, y que representa una disminución significativa en los costos del proceso de obtención de dicho material.

## Capítulo 6 – **CAPÍTULO FINAL**

## Discusión final

### Conclusiones generales

La industria del aceite de palma en Colombia actualmente está generando alrededor de 1M ton/año de raquis de palma como residuo agroindustrial del proceso de extracción. Este residuo cuenta con un alto contenido de holocelulosa, fuente importante de azúcares reductores, que puede ser usada para obtener productos de alto valor agregado que permitan añadir valor a la agroindustria del aceite de palma. Es así como este estudio se planteó con el interés de reconocer la posibilidad de obtener PHA, usando como sustrato el hidrolizado del raquis de palma, como otra opción de producto de valor agregado que pueda vincularse a la valorización de dicha industria. A partir de la experimentación realizada, se logró llegar a las siguientes conclusiones generales, en el camino de dar cumplimiento a los objetivos y dar respuesta a las hipótesis planteadas.

Teniendo en cuenta que los principales azúcares reductores encontrados en el hidrolizado de raquis de palma son glucosa, xilosa y arabinosa, se demostró que el microorganismo seleccionado para este estudio (*Halomonas boliviensis*) tiene la capacidad de crecer y acumular PHA usando estos azúcares como fuente de carbono. Sin embargo, *H. boliviensis* prefiere consumir glucosa frente a xilosa y arabinosa, y el mayor crecimiento y acumulación de PHA se obtiene con esta fuente de carbono.

El modelo cuadrático planteado para predecir el comportamiento de los factores significativos que afectan la obtención de biomasa y de PHA, bajo el diseño *Box Benkhen*, permitió un aumento en las concentraciones de biomasa y PHA obtenidas bajo otras condiciones de los factores estudiados. Con lo cual, también se logró reconocer la validez del modelo al realizar la comparación de los valores predichos por este y los obtenidos bajo el ensayo experimental.

Al realizar el estudio a escala de bioreactor usando las mejores condiciones predichas por el modelo, se logró un aumento en el porcentaje de acumulación del biopolímero con respecto al trabajo realizado a escala de matraz. Con la caracterización del biopolímero obtenido se confirmó que el material es un PHA y se puede sugerir que podría ser del tipo PHB, teniendo mayor similitud con éste, el extraído con la técnica de fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub>.

El incluir en el estudio una fuente de nitrógeno no convencional, hidrolizado de gluten, se pudo concluir que el porcentaje de acumulación de PHA fue inferior al obtenido usando el medio estándar. Sin embargo, a pesar de la acumulación lograda, al evaluar los costos aportados al proceso de obtención de PHA por ambas fuentes no convencionales, bajo los rendimientos de este estudio, se obtiene una disminución en los mismos, con respecto al costo aportado por las fuentes convencionales en el medio estándar. Lo que permite concluir que ambas fuentes no convencionales de nutrientes, presentan un gran potencial para ser utilizados conjuntamente para obtener este biopolímero disminuyendo sus costos de producción.

Con todo lo anterior, se valida que el hidrolizado de raquis de palma es un material con gran potencial de valorización al usarlo como materia prima para la obtención de PHB a partir de *Halomonas boliviensis*, y que representa una disminución en los costos del proceso de obtención de dicho material.

Las condiciones predichas bajo el modelo definido con el diseño de experimentos permitieron aumentar la productividad de obtención de PHB usando hidrolizado de raquis de palma como fuente de carbono; en comparación con los resultados obtenidos bajo otras condiciones.

Finalmente, se hizo un esfuerzo por comparar al menos dos procesos de extracción para el tipo de PHA obtenido en este trabajo, encontrando que el proceso de extracción por fluidos súper críticos, al ser más específico, logra entregar un producto más puro, lo cual se evidencia en el análisis FTIR, aunque su porcentaje de recuperación es muy bajo. Mientras en la extracción por solventes con cloroformo e hipoclorito de sodio, se tiene un mayor porcentaje de recuperación, sin embargo, se obtiene una muestra que puede estar aún con presencia de biomasa, lo que se refleja en el espectro obtenido por FTIR. Estas condiciones muestran que la selección del proceso de extracción dependerá de la aplicación que se le dará al material obtenido, ya que esto indicará que es de mayor importancia, el porcentaje de recuperación o la pureza.

Como ejercicio adicional, se buscó evaluar otra fuente de carbono no convencional, residuo de la industria alimentaria, como lo es el agua de cocción de mejillones, como parte del trabajo de pasantía en la Universidad Santiago de Compostela. Usando como microorganismo *Halomonas boliviensis* se comparó su uso para la obtención de biopolímeros con diferentes fuentes de carbono no convencionales. En este sentido, se logró validar que el agua de cocción de mejillones cuenta con los nutrientes necesarios para el crecimiento de *H. boliviensis*, que requiere solo una etapa de pretratamiento y que el proceso de hidrólisis es de corto tiempo y sencillo.

Adicionalmente, al comparar con los resultados obtenidos usando el hidrolizado de raquis de palma, se encontró que el mayor porcentaje de acumulación de PHA se presentó usando como medio de cultivo el hidrolizado del agua de cocción de mejillones. Finalmente, el agua de cocción de mejillones se identifica como un subproducto con un alto potencial de valorización, al usarlo como medio de cultivo para la obtención de biopolímeros tipo PHA a partir de *Halomonas boliviensis*.

### **Recomendaciones**

Ampliar el estudio de caracterización del material obtenido, con el fin de encontrar diferentes posibilidades de aplicaciones, de tal manera que se logre mejorar aún más su viabilidad económica como producto de alta comercialización y facilitar su incorporación al mercado.

Realizar un estudio amplio de los procesos de extracción posibles del biopolímero, con el fin de continuar en el ejercicio de disminuir costos de producción de PHAs, así como el direccionamiento del proceso de extracción a usar de acuerdo con la aplicación que tendrá el material.

Realizar un análisis económico de integración de la obtención de PHAs en el proceso de valorización de los residuos generados en la industria de aceite de palma, como un estudio tipo biorrefinería.

# COMPLEMENTARIOS

## Bibliografía

- Al-battashi, S. H., Annamalai, N., Sivakumar, N., Al-bahry, S., Tripathi, B. N., Nguyen, Q. D., & Gupta, V. K. (2019). Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 18(1), 183–205. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-09488-4>
- Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. (2017). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016a). Microbial production of polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) and its copolymers : A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016b). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- APHA. (1998). APHA, A. P. H. A. : Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. *American Physical Education Review*.
- Aramvash, A., Akbari Shahabi, Z., Dashti Aghjeh, S., & Ghafari, M. D. (2015). Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>
- Arcila Echavarría, D. C. (2016). *Aprovechamiento de subproductos de la industria colombiana de aceite de palma para la producción de un biopolímero del tipo PHA*. Tesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Carvajal, P. D. C, (2013). *Diseños factoriales fraccionarios y metodología del diseño robusto de parámetros*. Tesis. Universidad de Granada, España.
- Colprensa. (2018, June 6). “Colombia es el cuarto productor de aceite de palma del mundo y el primero en América.” *Agronegocios*. <https://www.agronegocios.co/agricultura/colombia-es-el-cuarto-productor-de-aceite-de-palma-del-mundo-y-el-primer-productor-en-america-2735403>
- Davis, R., Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., Kenny, S., O’Donovan, A., Guzik, M., Shaikh, H., Duane, G., Gupta, V. K., Tuohy, M. G., Padamatti, R. B., Casey, E., & O’Connor, K. E. (2013). Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology*, 150, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.001>
- Fedepalma. (2017). Anuario Estadístico 2017: Principales cifras de la agroindustria de la palma de aceite en Colombia 2012-2016. *Centro de Información y Documentación Palmero CID*.
- García Torreiro, M. (2017). *Biopolymers production by Halomonas boliviensis in an integrated biorefinery*. Tesis. Universidade de Santiago de Compostela, España.

- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. In *Applied Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Ghosh, S., Gnaim, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Michael, G., & Golberg, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource Technology*, 271, 166–173.
- Gnanasekhar, J. D. (2012). *Production and analysis of polyhydroxybutyrate from Halomonas boliviensis*. Tesis. KTH Royal Institute of Technology. Estocolmo, Suecia.
- Gómez Vanegas, N. A. (2015). *Aprovechamiento del subproducto lignocelulósico raquis, procedente de la extracción de aceite de palma para la producción de bioetanol*. Tesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., & Heidelberg, T. (2014). Growth kinetics , effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(February), 427–438.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., & Casos, I. (2017). Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Research*, 44(7), 2141–2152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.031>
- Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Vlysidis, A., Consuelo, M., Rondán, E., & Koutinas, A. A. (2016). Downstream separation of poly ( hydroxyalkanoates ) using crude enzyme consortia produced via solid state fermentation integrated in a biorefinery concept. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.08.002>
- Kachrimanidou, V., Ioannidou, S. M., Ladakis, D., Papapostolou, H., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Kookos, I. K. (2021). Techno-economic evaluation and life-cycle assessment of poly(3-hydroxybutyrate) production within a biorefinery concept using sunflower based biodiesel industry by-products. *Bioresource Technology*, 326.
- Kalia, V. C., Prakash, J., & Koul, S. (2016). Biorefinery for Glycerol Rich Biodiesel Industry Waste. *Indian Journal of Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0583-7>
- Kaur, G., & Roy, I. (2015). Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 157–172. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>
- Koller, M., Niebelschütz, H., & Braunegg, G. (2013). Strategies for recovery and purification of poly [( R ) -3-hydroxyalkanoates ] ( PHA ) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences*, 13, 549–562. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300021>
- Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., & Narodoslawsky, M. (2013). Biopolymer from industrial residues : Life cycle assessment of poly ( hydroxyalkanoates ) from whey. *“Resources, Conservation & Recycling,”* 73, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.01.017>

- Kucera, D., Pernicová, I., Kovalcik, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., Mravec, F., Nebesarova, J., Kalina, M., Marova, I., Krzyzanek, V., & Obruca, S. (2018). Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>
- Laverde, J., Pino, N., Escobar, A., Peñuela, M., Gallego, J., Titirici, M., & López, D. (2019). Productos de alto valor agregado a apartir de la tusa de palma de aceite. *Revista Palmas, 40 Tomo II(No Especial)*, 119–128.
- Leong, Y. K., Show, P. L., Ooi, C. W., Ling, T. C., & Lan, J. C. (2014). Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.020>
- López-Abelairas, M., García-Torreiro, M., Lú-Chau, T., Lema, J. M., & Steinbüchel, A. (2015). Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.018>
- López Abelairas, M. (2013). *Bioprocesses for production of Fuels, Chemicals and Polymers from Lignocellulosic Materials*. Tesis. Universidade de Santiago de Compostela. España.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly ( 3- Hydroxyalkanoates ): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology*, 63(1), 21–53.
- Malán Courdín, A. K. (2015). *Estudio de la producción de Poli-3-Hidroxibutirato en Herbaspirillum seropedicae Z69 a partir de los azúcares presentes en la hemicelulosa*. Universidad de la República (Uruguay).
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., & Suárez-Ojeda, M. E. (2020). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 297(October 2019), 122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478>
- Marsiglia López, D. E. (2018). *Determination of nutritional and operational conditions for the production of polyhydroxybutyrate by Halomonas boliviensis*. Thesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Marsiglia López, D. E., Villegas Quiceno, A. P., & Gómez Vanegas, N. A. (2019). Producción de polihidroxibutirato (PHB) a partir de *Halomonas boliviensis* utilizando hidrolizado de gluten de trigo a escala biorreactor. In F. J. Vélez Hoyos, M. C. Moreno Orrego, A. P. Villegas Quiceno, C. A. Montoya Agudelo, & E. A. Acevedo Marín (Eds.), *Congreso Internacional de Ingeniería con Impacto Social CIIISOL 2019* (pp. 64–68). Universidad Cooperativa de Colombia. <https://doi.org/https://doi.org/10.16925/ecam.02>
- Masood, F., Yasin, T., & Hameed, A. (2015). Polyhydroxyalkanoates – what are the uses ? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 514–521. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.913548>
- Melanie, S., Winterburn, J. B., & Devianto, H. (2018). Production of Biopolymer

- Polyhydroxyalkanoates ( PHA ) by Extreme Halophilic Marine Archaea *Haloferax mediterranei* in Medium with Varying Phosphorus Concentration. *Journal of Engineering of Technology Science*, 50(2), 255–271. <https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2017.50.2.7>
- Mokhtari-hosseini, Z. B., Vasheghani-farahani, E., Heidarzadeh-vazifekhoran, A., Shojaosadati, S. A., Karimzadeh, R., & Khosravi, K. (2009). Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium. *Bioresource Technology*, 100, 2436–2443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.024>
- Moorkoth, D., & Nampoothiri, K. M. (2016). Production and characterization of polyhydroxy butyrate-co-valerate (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 201, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.046>
- Moreno, P., Yañez, C., Medeiros, N., Escalante, H., Combariza, M. Y., & Guzman, C. (2015). Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*, 32(6):682–689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.003>
- Munera Soto, R. D. (2019). *Production of Docosahexaenoic Acid from Aurantiochytrium limacinum SR21 using NonConventional Carbon Sources*. Thesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Narayanan, M., Kandasamy, G., Murali, P., Kandasamy, S., Ashokkumar, V., Nasif, O., & Pugazhendhi, A. (2021). Optimization and production of polyhydroxybutyrate from sludge by *Bacillus cereus* categorized through FT-IR and NMR analyses. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104908>
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., & Desai, A. J. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, 99(13):5749–5755. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.017>
- Nielsen, C., Rahman, A., Rehman, A. U., Walsh, M. K., & Miller, C. D. (2017). Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microbial Biotechnology*, 0(0), 000–000. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12776>
- Obruca, S., Benesova, P., Marsalek, L., & Marova, I. (2015). Use of Lignocellulosic Materials for PHA Production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 135–144. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2253>
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., & Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 11(1), 79–90.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33(4):305–325. <https://doi.org/10.2307/2332195>
- Porras, M. A., Cubitto, M. A., & Villar, M. A. (2014). Quantitative Determination of intracellular PHA in *Bacillus megaterium* BBST4 strain Using Mid FTIR Spectroscopy . *XIV Latin American Symposium on Polymers / XII Ibero American Congress on Polymers*, 1–4. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3920.2407>

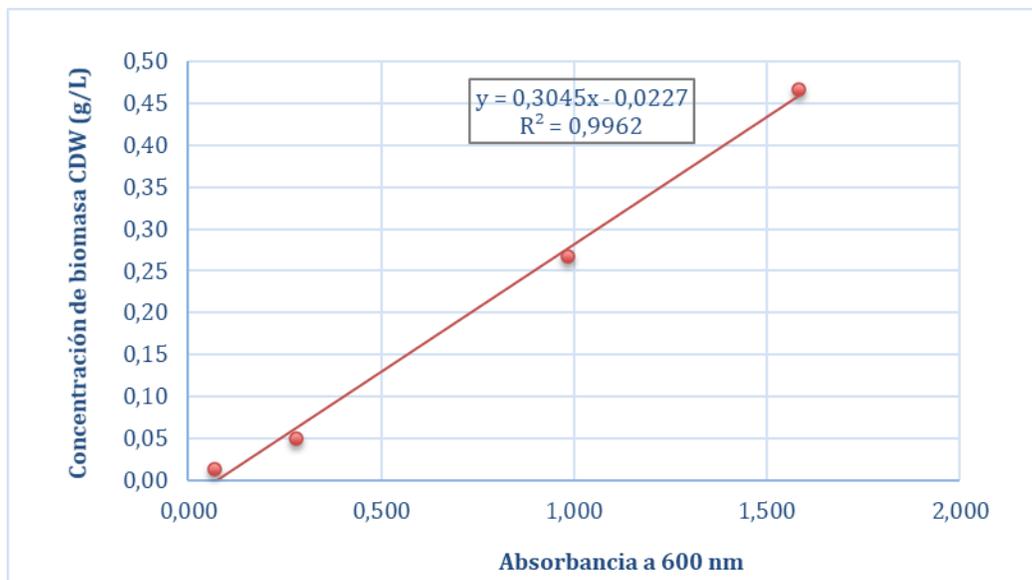
- Quillaguaman, J., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2004). Biopolyester Production: Halophilic Microorganisms as an Attractive Source. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Book section. 355-367. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7\\_24](https://doi.org/10.1007/1-4020-3633-7_24).
- Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2006). Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.013>
- Quillaguamán J, Muñoz M, Mattiasson B, Hatti-Kaul R (2007) Optimizing conditions for poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(5): 981–986. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0754-2>
- Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., & Hatti-Kaul, R. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1297-x>
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., & Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1687–1696. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2397-6>
- Ray, S., & Kalia, V. C. (2017). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0651-7>
- Ray, S., Kalia, V. C., & Gram, Á. P. Á. G. Á. (2016). Microbial Cometabolism and Polyhydroxyalkanoate Co-polymers. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0622-4>
- Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Pantión, A. A., Alonso-Fariñas, B., Biology, M., Olavide, U. P. De, Ctra, E., Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Pantión, A. A., & Alonso-Fariñas, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams . A review Bernab e. *Journal of Environmental Management*, 205, 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- Rosengart, A., Cesário, M. T., Almeida, M. C. M. D. De, Raposo, R. S., Espert, A., Días de Apodaca, E., & Fonseca, M. M. R. Da. (2015). Efficient P(3HB ) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.06.013>
- Sabapathy, P. C., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Zbed, H. M., & Qi, X. (2020). Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*, 306(February), 123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
- Salmiati, Ujang, Z., Salim, M. R., & Olsson, G. (2009). Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification. *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE Conference and Exhibition*.
- Sharma, P., & Bajaj, B. K. (2015). Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81,

241–248.

- Sharma, V., Misra, S., & Srivastava, A. K. (2017). Developing a green and sustainable process for enhanced PHB production by *Azohydromonas australica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10(February), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.014>
- Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., & Pandey, A. (2013). Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.015>
- Singh, A. K., Srivastava, J. K., Chandel, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Singh, S. P. (2019). Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates : an insight into recent advances , bottlenecks , and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Singh, M., Kumar, P., Ray, S., & Kalia, V. C. (2015). Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0528-6>
- Torrado, A., Angel, M.-, Fuci, P., & Pastrana, L. (2013). Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a solid-state bioreactor with fed-batch operation using mussel processing wastewaters ´ b and Miguel- Angel LIST OF ABBREVIATIONS , SYMBOLS. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(January 2012), 226–236. <https://doi.org/10.1002/jctb.3813>
- Van-Thuoc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G., & Mattiasson, B. (2008). Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x>
- Wang, S., Chen, W., Xiang, H., Yang, J., Zhou, Z., & Zhu, M. (2016). Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). *Polymers*, 8(8), 273–301. <https://doi.org/10.3390/polym8080273>
- Yin, J., Chen, J., Wu, Q., & Chen, G. (2014). Halophiles, Coming Stars for Industrial Biotechnology. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>
- Yustinah, Hidayat, N., Alamsyah, R., Roslan, A. M., Hermansyah, H., & Gozan, M. (2019). Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.057>
- Z. Ujang, S., Salim, M. R., & Olsson, G. (2009). Recovery of Polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification. *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE, Octubre 2009*, 8–15.
- Zhang, Y., Sun, W., Wang, H., & Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology*, 147, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.029>

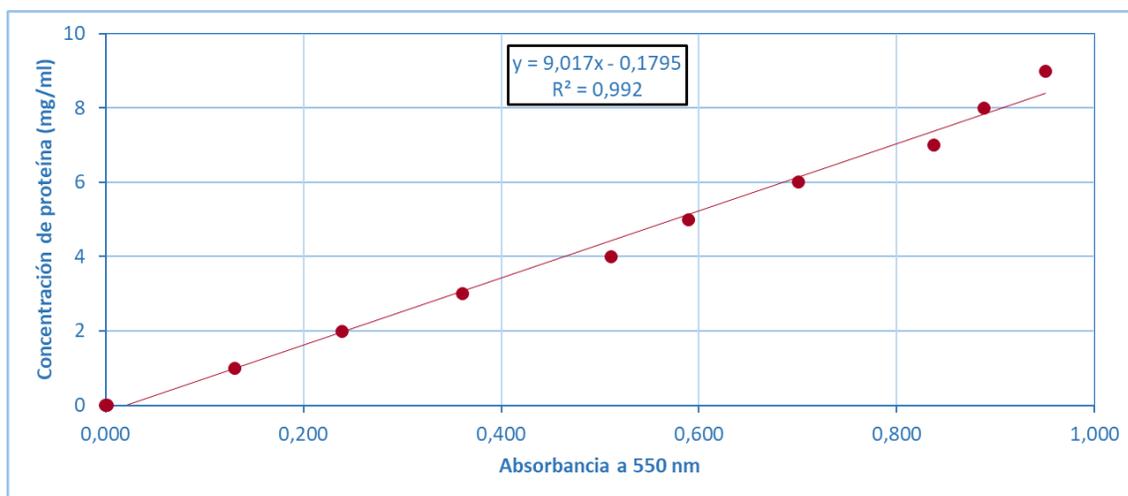
## Anexos

### Anexo 1. Curva de calibración para cuantificación de biomasa *Halomonas boliviensis*



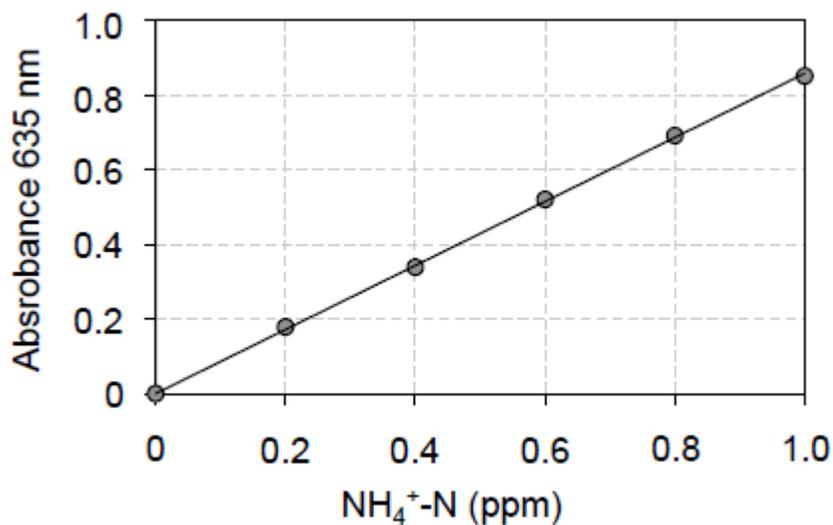
Para realizar la curva de calibración para cuantificar concentración de biomasa de *Halomonas boliviensis* se partió de una solución madre con una absorbancia mayor a uno, luego a partir de ella se prepararon 5 soluciones con diferentes concentraciones de biomasa y volumen total de 25 ml. Se leyó absorbancia a 600 nm. Cada solución fue filtrada, para ello, previamente los filtros se secaron y pesaron, luego el filtro con la biomasa se dejó secar en estufa hasta peso seco. Se graficó peso seco de biomasa vs absorbancia.

### Anexo 2. Curva de calibración para cuantificación de proteína método Biuret



Esta curva de calibración fue realizada con Bovine Serum Albumin Proteins (BSA) como proteína estándar.

Anexo 3. Curva de calibración y preparación de reactivos para cuantificación de nitrógeno amoniacal



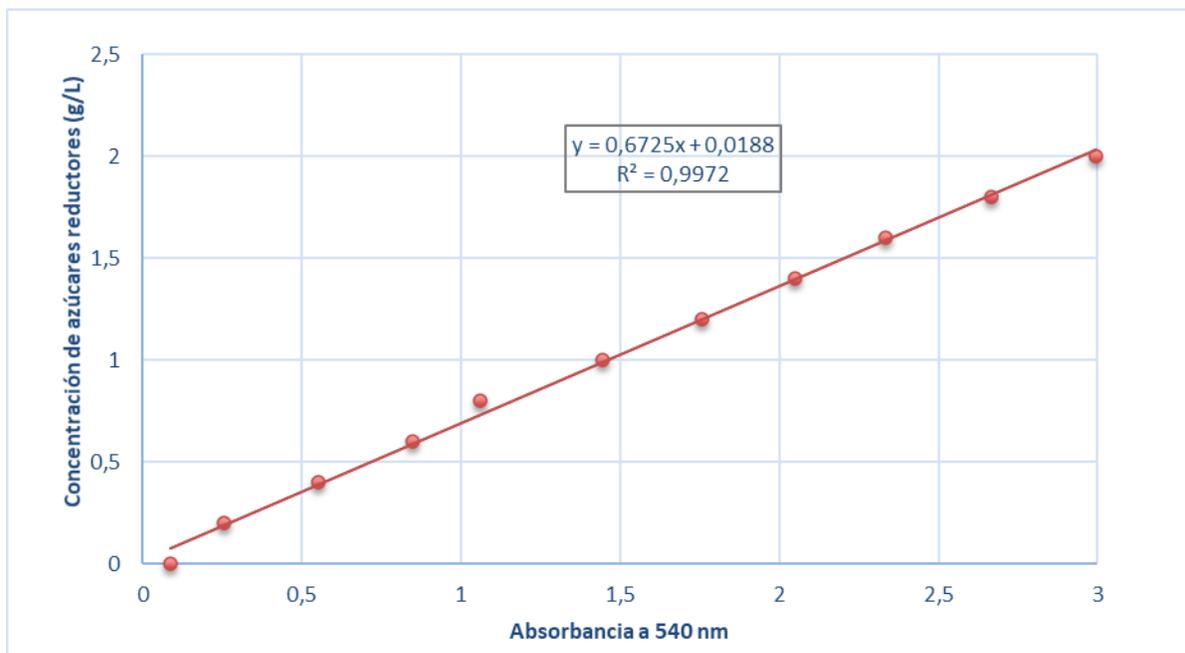
$$\text{Abs} = 0,857 * \text{NH}_4^+ - \text{N}(\text{ppm}) - R^2 = 0,999$$

Solución A, Phenol-nitroprusiate: 15 g de fenol y 0.05 g de nitroprusiate de sodio se adicionan a 250 mL de solución buffer. La solución buffer fue preparada adicionando 30 g de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 30 g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O y 3 g de EDTA por litro y ajustado a pH 12.

Solución B, Hipoclorito: 15 mL de hipoclorito comercial fue mezclado con 200 mL de NaOH 1N, luego ajustado hasta 500 mL con agua destilada.

Procedimiento: El volumen de la muestra fue de 2,5 mL, la cual previamente es diluida para alcanzar una concentración máxima de 1 mg/L. De la solución A y B se toman 1,0 y 1,5 mL, respectivamente, y fueron adicionados a la muestra. Después de 45 minutos a temperatura ambiente la concentración fue medida en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, UV-Visible) a 635 nm.

#### Anexo 4. Curva de calibración para cuantificación de azúcares reductores por DNS

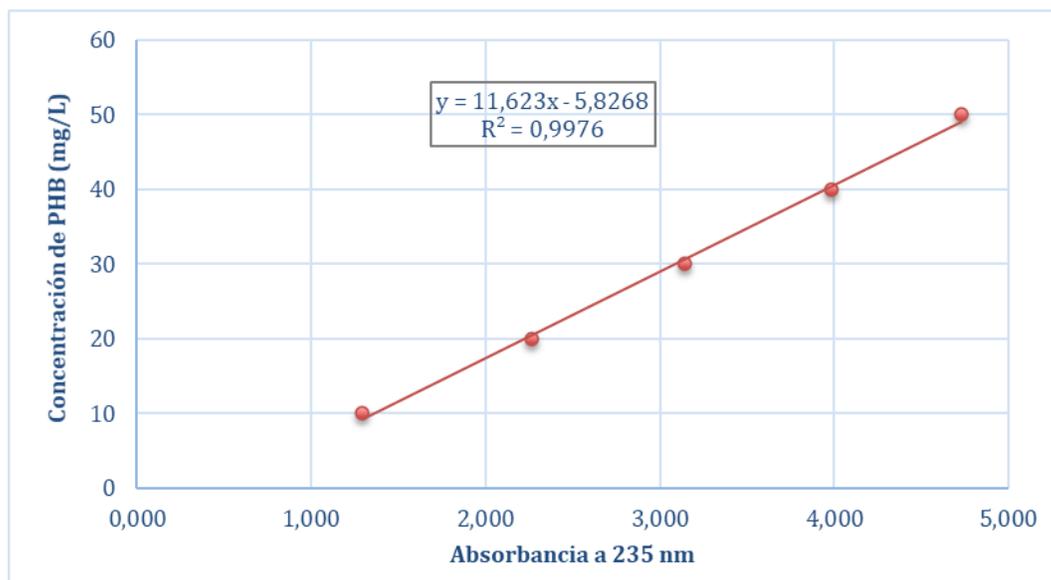


#### Anexo 5. Protocolo para realizar la curva de calibración de cuantificación de PHB por espectrofotometría

1. Se pesa 0.01 g de PHB comercial en un tubo de vidrio, se le añade 10 mL de cloroformo.
2. La solución se calienta en un baño de agua a 60 °C por 15 minutos o hasta solubilización completa. Aquí se obtiene una solución madre de 1 mg/mL de PHB-cloroformo.
3. Se añaden 9 mL de cloroformo a un nuevo tubo y se le adiciona 1 mL de la solución madre (previamente agitada) para obtener una solución sub-madre de 100 µg/mL de PHB-cloroformo, y se calienta en un baño de agua a 60 °C por 15 minutos.
4. Para tener puntos a varias concentraciones, de la solución sub-madre se toman alícuotas de diferente volumen y se colocan en nuevos tubos, donde 1 mL corresponde a 100 µg PHB, 900 µL corresponde a 90 µg y así sucesivamente.
5. Los tubos sin tapa se calientan a 60 °C hasta evaporación completa del cloroformo.
6. Luego se añaden 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a los tubos, se tapan y cubren con cinta adhesiva para evitar humedecimiento interno de los tubos.
7. Los tubos se calientan en un baño de agua a 95 °C por 20 minutos para la conversión completa del PHB a ácido crotónico.
8. Los tubos se enfrían a temperatura ambiente, se agitan en vórtex antes de transferir 1 mL a celdas de cuarzo para la lectura en el espectrofotómetro.

9. La absorbancia se lee a 235 nm, pico correspondiente del ácido crotónico. Ácido sulfúrico concentrado se usa como blanco.

#### Anexo 6. Curva de calibración para cuantificación de PHB



#### Anexo 7. Artículo sometido a revista Waste and Biomass Valorization

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

Optimization of nutritional and operational conditions for producing PHA by the halophilic bacterium *Halomonas boliviensis* from oil palm empty fruit bunch and gluten hydrolysates

Diana Catalina Arcila Echavarría<sup>1</sup>, Thelmo Alejandro Lu-Chau<sup>2</sup>, Natalia Andrea Gómez Vanegas<sup>1</sup>,  
Mariana Peñuela Vasquez<sup>1</sup>, Dalma Elizabeth Marsiglia López<sup>1</sup>

✉ catalina.arcila@udea.edu.co

<sup>1</sup> Grupo de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia

<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, CRETUS Institute, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

<https://orcid.org/0000-0002-5379-0291> (DC Arcila-Echavarría)

<https://orcid.org/0000-0002-4447-3729> (NA Gómez-Venegas)

<https://orcid.org/0000-0003-4394-7432> (TA Lu-Chau)

<https://orcid.org/0000-0002-5453-2171> (M Peñuela-Vasquez)

<https://orcid.org/0000-0002-5256-4241> (DE Marsiglia-López)

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

## Acknowledgements

D.C. Arcila-Echavarría would like to thank the grant 647. T.A. Lu-Chau belongs to the Galician Competitive Research Group GRC-ED431C 2017/29 and to the CRETUS Strategic Partnership (AGRUP2015/02). All these programs are co-funded by FEDER (EU).

## Funding Information

Not applicable

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

## Abstract

The optimization of nutritional and operational conditions that favor the production of the biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA) by the halophilic bacterium *Halomonas boliviensis* was carried out in this study. In a Plackett Burman design the significance of six factors was evaluated: agitation, temperature, pH, initial concentration of glucose, nitrogen and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . In a second experimental design the factors with high significance (temperature, pH and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) were further studied applying the response surface methodology (Box Benken design). This design allowed obtaining a second order polynomial that modeled the response variables (biomass and PHA) to predict the values of the factors that maximizes biomass and PHA in the studied range, which were: 31 °C, 7.0 and 1.6 g/L for temperature, pH and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , respectively.

The optimal values were validated in fermentations using synthetic culture medium and a complex medium based on oil palm empty fruit bunch and gluten hydrolysates as carbon and nitrogen sources, respectively. Biomass and PHA concentrations of 9.2 and 6.5 g/L, respectively, were reached in the synthetic medium, which represent deviations of 26 and 4% with respect to the values predicted by the model. On the other hand, the biomass and PHA concentrations obtained with the hydrolysate-based medium was 70 and 35.4% that reached with the synthetic culture medium.

**Key words:** *Halomonas boliviensis*, polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, hydrolysate of oil palm empty fruit bunch, Plackett Burman, Box Benken.

## Declarations

Not applicable

## Statement of Novelty

This research focused on evaluating the growth and accumulation of PHA from a halophilic bacterium such as *Halomonas boliviensis*, using a non-conventional and inexpensive carbon source such as the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch, which has not been previously reported. The aim of this study was to contribute to the valorization of oil palm empty fruit bunch, a lignocellulosic residue that is generated in high quantities as an agro-industrial waste in the production of palm oil in Colombia, using it as a raw material to obtain products with high added value such as polyhydroxyalkanoates. This residue is difficult to treat and represents an environmental challenge to the producing industries.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

## Introduction

PHAs are a family of natural polyesters stored by bacteria as an energy reserve and carbon source. There are about 100 different types of PHAs, which can be classified as scl- and mcl-PHA, composed of monomers with 3-5 and 6-14 carbon atoms, respectively; or copolymers of both. The composition of PHA is determined by the type of bacteria used to obtain it and also by the carbon source used in the fermentation, for example sugars, acids, alcohols, gases such as methane and CO<sub>2</sub>, among others (Shogren et al. 2019).

PHAs as a biodegradable, non-toxic and bio-based material, have the potential to contribute to the growing of a sustainable industry, besides being the most promising biopolymers as substitutes for polymers from petrochemical sources. From the concept of circular economy, one of the advantages of PHAs is the reduction of waste, as well as being biodegradable. PHA can be converted into compost and mineralized to CO<sub>2</sub>, which is reabsorbed in the photosynthesis by the plants that in turn serve as a substrate for obtaining the PHAs, that closing the carbon cycle (Adeleye et al. 2020).

Waste streams such as used frying oil, discarded food, agricultural waste, domestic wastewater, glycerin from biodiesel production and landfill gas have been used as low-cost substrates to produce PHAs (Shogren et al. 2019). In Colombia, the palm oil industry produces 1 Mt/year of oil palm empty fruit bunch (EFB), material that has a high content of cellulose and hemicellulose. EFB can be valorized when reintegrated into a productive process to obtain value-added products, among them PHAs (Laverde et al. 2019).

The ability of different bacteria to use this type of pre-treated material as a carbon source is an important part of the process of recovering by-products and obtaining value-added materials. For example, the halophilic bacteria *Halomonas boliviensis* is able to accumulate between 70% and 90% of their dry weight as PHA (Kucera et al. 2018; Guzmán et al. 2017). Additionally, these bacteria are able to use inexpensive substrates derived from lignocellulosic biomass as a carbon source, and the high salinity of the culture media can contribute to reduce sterilization requirements (Ghosh et al. 2019; Oliart-Ros et al. 2016; Moorkoth and Nampoothiri 2016).

In the valorization of by-products and the reduction of costs of biotechnological processes, operational conditions play a very important role, which allow to increase productivity. In this sense, taking into account that there is a wide range of variables that can affect the production of PHA (e.g. concentration of essential nutrients and inoculum, agitation, temperature, pH, etc) it is necessary to study them systematically by using experimental designs.

In this study, the experimental designs carried out to select the best conditions for obtaining PHA, within the defined study range, will be presented. These were based on a Plackett Burman design applied for selecting the significant factors, followed by a Box Benkhen design which allowed to find the optimal conditions that maximize the response variables. Finally, the optimal predicted conditions were experimentally validated and compared using as a carbon source the hydrolyzate of oil palm empty fruit bunch.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56

## Materials and methods

### Bacterial strain and culture media

The moderate halophilic bacteria *Halomonas boliviensis* ATCC BAA-759 was used in this study. *H. boliviensis* is a Gram-negative bacillus. The inoculum was prepared using the medium reported by Quillaguamán et al. (2006), whose composition in g/L is: glucose 1.0, NaCl 80, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.13, KCl 0.75, NaBr 0.20, peptone 2.0, yeast extract 2.0 (Quillaguamán et al. 2006). The inoculum was maintained at 30 °C and 200 rpm for 14 h in an orbital shaker. Then, the culture medium was centrifuged at 5000 rpm to recover the cells that were later used as inoculum in the production medium. The culture medium reported by Quillaguamán et al. (2008) was used as production medium. The composition of this medium in g/L is: glucose 20, NaCl 45, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.38, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.6, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.13, KCl 0.75, NaBr 0.20. This was the standard culture medium used to evaluate the different operational and nutrient conditions. Gluten hydrolyzate was used as nitrogen source.

### Preparation of hydrolysate of gluten

The gluten used was obtained from Itacol. For the preparation of the hydrolysate of gluten, 10 g of gluten and 1 mL of protease (Savinase 16L, Novozymes) were added to 1 L of distilled water. The procedure was carried out on a heating plate, with internal stirring of 500 rpm at 60 °C for 24 hours. Then, it was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes to remove the sludge and finally the supernatant was filtered for sterilization. Nitrogen quantification was done by the Biuret method (Marsiglia López 2018).

### Preparation of hydrolysate of oil palm empty fruti bunch

The oil palm empty fruit bunch (EFB) was supplied by *Bioplanta Palmera para el Desarrollo S.A* from a palm oil extraction factory (Urabá, Colombia). Before being used as carbon source, EFB was pretreated by applying mechanical size reduction and lignin removal with NaOH using a solid:NaOH (0.225 M) ratio of 1:10. The mixture was left in an autoclave for 180 minutes at 121 °C. Then, it was washed with water (Gómez-Vanegas 2016). The enzymatic hydrolysis was performed in an orbital shaker at 180 rpm and 50 °C for 120 hours. The hydrolysis was performed with the commercial enzymatic cocktail CEB3L (Sinobios, Shanghai), using an enzymatic load of 30 FPU/g pretreated material, as reported by Gomez-Vanegas (2016).

### Design of experiments Plackett Burtman

In this study six factors were evaluated, three nutritional and three operational. Table 1 presents the factors and levels defined for this experimental design. Likewise, Table 2 presents the design of the experiments to be carried out.

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

Table 1. Factors and levels to evaluate the incidence in obtaining PHA from *Halomonas boliviensis* under a Plackett - Burman design

Factor	High (1)	Low (-1)	Central factor
Temperature °C (T)	34	28	31
pH	8	6	7
Agitation rpm	250	150	200
Glucose (FC) g/L	15	5	10
Nitrogen source (FN) g/L	3	0.5	1.75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g/L	3	0.2	1.6

The experimental range of these values was taken from: a) Aramvash et al. (2015), b) Moreno et al. 2015, c) Quillaguamán et al. 2004 and d) Sindhu et al. 2013.

Table 2. Plackett Burman experimental design runs

Trial	run	T (°C)	pH	Agitation (rpm)	Glucose (g/L)	Nitrogen (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)
1	1	34	6	150	15	0.5	3
1	2	34	8	150	5	3	0.2
2	3	34	8	250	5	0.5	3
3	4	28	8	250	15	0.5	0.2
2	5	34	6	250	15	3	0.2
4	6	28	8	150	15	3	3
3	7	28	6	250	5	3	3
4	8	28	6	150	5	0.5	0.2
5	9	31	7	200	10	1.75	1.6

The design of experiments was based on: a) Carvajal 2013 and b) Plackett and Burman 2018.

### Design of experiments Box Benkhen

After evaluating the Plackett Burman design, it was decided to continue using a Box Benkhen design, which would allow to define the best conditions of the significant factors. In this case, it was designed with three factors, three levels and five replicas in the central point. Table 3 presents the factors and levels defined for the experimental design, while Table 4 presents the experiments defined for this design.

Table 3. Box Benkhen design factors and levels

Level	Temperature (°C)	pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)
High (1)	34	8	3
Low (-1)	28	7	0.2
Central (0)	31	6	1.6

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 4. Box Benken experimental design runs (\*)

Run	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	pH	T (°C)
1	-1	0	-1
2	1	0	-1
3	0	-1	-1
4	0	1	-1
5	-1	0	1
6	1	0	1
7	0	1	1
8	0	-1	1
9	-1	1	0
10	-1	-1	0
11	1	1	0
12	1	-1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

\* Each run, except the central point, was carried out in duplicate.

#### Validation of maximum values for the quadratic model

The validation of the maximum values was carried out in 500 mL flasks with a working volume of 200 mL. Samples were taken every 12 hours, up to 72 hours, to follow up the response variables (biomass and PHA) and the consumption of essential nutrients, in this case glucose, nitrogen and phosphate (nitrogen and phosphate data not shown). The test was performed in triplicate. Additionally, an experiment was carried out under the same conditions, but using hydrolysate of oil palm empty fruit bunch as a carbon source instead of glucose.

#### PHA production in Erlenmeyers flasks

To carry out this design of experiments, 250 ml flasks with a working volume of 100 ml were used. The end point was taken at 72 hours and agitation was maintained at 200 rpm. Biomass and PHA were evaluated as response variables. The statistical analysis was carried out in R.

#### Analytical methods

##### Biomass

The biomass concentration was determined by spectrophotometry in a Synergy H1 microplate reader (Biotek) by reading the absorbance at 600 nm. The biomass was resuspended in distilled water, washed and separated by centrifugation at 9500 rpm for 5 minutes. This wash was carried out twice. The calibration curve was

4 determined from a series of dissolutions of different concentrations prepared by adding known weights of  
5 bacterial biomass to water (Quillaguamán et al. 2008).

#### 7 Polyhydroxyalkanoate

8 PHA content was determined by applying a colorimetric method based on the protocol reported by Gnanasekhar  
9 (2012). The sample was mixed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated at 95 °C for 20 minutes for converting PHB into crotonic  
10 acid, a substance that presents a characteristic absorbance peak at 235 nm. The absorbance of the sample was  
11 related to a calibration curve prepared using commercial PHB (Sigma-Aldrich) as standard. The absorbance  
12 was measured in a Thermo Fischer Scientific EVO300 LC brand spectrophotometer (Gnanasekhar 2012).

#### 17 Polyhydroxyalkanoate extraction

18 The extraction of PHB from the cells was carried out by following the method reported by Ujang et al. (2009),  
19 which consists of mixing chloroform and hypochlorite at 5% in a ratio of 1:2 with the sample. The mixture was  
20 maintained at 40 °C and 200 rpm for 180 min. Then, it was centrifuged at 15000 rpm for 10 minutes, separating  
21 the sample in three phases. The solid phase was washed two times with methanol, once with distilled water,  
22 and finally it was dried at room temperature (Ujang et al. 2009).

#### 27 Quantification of glucose

28 Glucose consumption was determined by measuring the concentration of glucose over time. For its  
29 quantification, a commercial kit (Biosistem S.A.) based on the glucose oxidase method was used. This is a  
30 colorimetric method, which relates the absorbance at 500 nm with the glucose concentration. One mL of reagent  
31 is taken and mixed with 10 µL of sample or glucose standard (1 g/L). After 20 minutes of incubation at room  
32 temperature the absorbance was measured in a spectrophotometer (Synergy H1 microplate reader, Biotek).

#### 38 Protein quantification

39 The protein nitrogen was quantified by the Biuret test. The change of color to violet during the reaction occurs  
40 due to the formation of the Cu complex with the peptide bonds of the protein in an alkaline medium. The biuret  
41 reagent was mixed with the sample and left to react for 20 minutes. Then the absorbance was measured at 540  
42 nm in the spectrophotometer.

#### 47 Reducing sugars

48 The quantification of glucose, xylose and arabinose was performed by HPLC using an Agilent Technologies  
49 1200 series equipment and an IR detector with a Transgenomic ICsep COREGEL-87-H3 column. The  
50 analytical conditions used were: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01 N as mobile phase with a flow of 0.6 mL/min, sample injection of  
51 20 µL, and the temperatures of the column and the detector were set at 80 °C and 55 °C, respectively.

#### 56 Statistical analysis

57 The statistical analysis was carried out with the software R (CRAN R 3.6.0). A significance value (alpha) of  
58 0.05 was considered. Analysis of variance (ANOVA) was performed for each response variable, with each  
59  
60  
61  
62

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

experiment design (Plackett Burman, Box Benkehn). The maximum points of the model were found with the software Matlab (R 2018a).

## Results and discussion

### Design of experiments Plackett Burtman

Table 5 shows the results obtained for the response variables in each of the runs. In addition, Tables 6 and 7 present the analysis of variance (ANOVA) carried out for each response variable: biomass and PHA, respectively.

Table 5. Plackett Burman design with the response variables

Run	T (°C)	pH	Agitation (rpm)	Glucose (g/L)	Nitrogen (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Biomass (g/L)	PHA (g/L)
1	1	-1	-1	1	-1	1	2.41	0.045
2	1	1	-1	-1	1	-1	3.19	0.151
3	1	1	1	-1	-1	1	8.15	0.052
4	-1	1	1	1	-1	-1	9.48	0.148
5	1	-1	1	1	1	-1	0.85	0.041
6	-1	1	-1	1	1	1	7.29	0.046
7	-1	-1	1	-1	1	1	3.28	0
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.71	0
9	0	0	0	0	0	0	10.31	0.251
9	0	0	0	0	0	0	10.03	0.245
9	0	0	0	0	0	0	10.39	0.250

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

Table 6. ANOVA for Biomass

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temperature	2	92.54	46.27	80.437	2.72e-07 ***
pH	1	85.83	85.83	149.208	9.69e-08 ***
Agitation	1	5.97	5.97	10.371	0.00815 **
Glucose	1	3.14	3.14	5.459	0.03943 *
Nitrogen	1	23.28	23.28	40.471	5.36e-05 ***
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1.91	1.91	3.313	0.09602
Residuals	11	6.33	0.58		

Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Table 7. ANOVA for PHA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temperature	2	91578	45789	48.757	3.41e-06 ***
pH	1	23578	23578	25.106	0.000396 ***
Agitation	1	4	4	0.004	0.947866
Glucose	1	1321	1321	1.407	0.260548
Nitrogen	1	5	5	0.005	0.945327
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	9283	9283	9.885	0.009341 **
Residuals	11	10330	939		

Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

According to the analysis of variance, the following factors were identified as significant for the biomass response variable: temperature, pH, nitrogen ( $p = 0.0010$ ), agitation ( $p = 0.010$ ), glucose ( $p = 0.05$ ); while for the PHA response variable, temperature and pH (both with  $p = 0.001$ ) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $p = 0.01$ ) were significant.

Both pH and T have a significant influence on PHA and biomass which is in accordance with the study of Quillaguamán et al. (2007) who found a direct relationship between biomass and PHA. They studied the

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

optimization of PHB production conditions by *Halomonas boliviensis* with sucrose as a carbon source, concluding that PHB productivity is limited by low cell densities obtained during the cultivation. However, it is expected that the consumption of  $\text{NH}_3$  for cellular growth, would decrease the pH, which can affect in a direct way the performance of *Halomonas boliviensis*. As for the nutritional conditions, the behavior for biomass and product are influenced by different factors. The biomass is influenced by nitrogen concentration, which agrees with the results reported by Quillaguaman et al. (2007). They found that high concentrations of yeast extract were necessary to achieve a high cell growth. They also observed that the increase in the synthesis of PHB was reflected in the variation of phosphate concentration, variable that was found significant on the PHA response in this study.

Taking into account these results, the factors defined for the following experimental design were temperature, pH and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Temperature and pH have high significant effects ( $p < 0.001$ ) on both response variables and on PHA,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  presents a significance of 0.01, while the other factors are not significant. It should be noted that although nitrogen is a significant variable for biomass, phosphorus is more significant for obtaining PHA. In addition, it is a factor that has been previously studied and there are proposed conditions that neither limit the production of biomass, nor negatively affect the production of the biopolymer.

Taking into account that the previous statistical analysis does not validate the significance of the crossing factors, it was necessary to confirm that the temperature, pH and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  continue to be significant without interacting with the other factors that were initially evaluated. Tables 8 and 9 present the results of the analysis of variance carried out for biomass and PHA, respectively, analyzing only the factors selected for the following design of experiments.

Table 8. ANOVA for biomass with defined factors for Box Benkhen design

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temperature	2	92.542	46.271	16.733	1.94e-04 ***
pH	1	85.831	85.831	31.039	6.89e-05 ***
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	1.906	1.906	0.689	0.420
Residuals	14	38.714	2.765		

Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62

Table 9. ANOVA for PHB with defined factors for Box Benkhen design

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temperature	2	91578	45789	54.975	2.345e-07 ***
pH	1	23578	23578	28.308	1.08e-04 ***
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	9283	9283	11.146	0.0048738 **
Residuals	14	11661	833		

Signif. Codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

As shown in Tables 8 and 9, the factors selected to continue the study still are significant ( $p < 0.01$ ), which shows that their significance was not due to the interrelationship with the other factors.

### Design of experiments Box Benkhen

Table 10 shows the Box Benkhen design with the results obtained for each response variable and their respective duplication.

Table 10. Design Box Benkhen with its response variables.

Run	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	pH	T (°C)	Biomass (g/L)	PHA (g/L)
1	-1	0	-1	3.39	0.031
1	-1	0	-1	3.14	0.044
2	1	0	-1	5.69	0.303
2	1	0	-1	5.47	0.268
3	0	-1	-1	4.00	0.107
3	0	-1	-1	4.19	0.130
4	0	1	-1	6.05	0.212
4	0	1	-1	5.31	0.316
5	-1	0	1	3.57	0.054
5	-1	0	1	3.52	0.092
6	1	0	1	5.16	0.091
6	1	0	1	5.21	0.056
7	0	1	1	5.20	0.092
7	0	1	1	6.20	0.092
8	0	-1	1	2.73	0.092
8	0	-1	1	6.20	0.092

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

9	-1	1	0	5.36	0.242
9	-1	1	0	5.00	0.286
10	-1	-1	0	1.73	0.021
10	-1	-1	0	1.47	0.013
11	1	1	0	5.05	0.064
11	1	1	0	5.40	0.050
12	1	-1	0	5.71	0.092
12	1	-1	0	5.91	0.086
13	0	0	0	2.70	0.074
14	0	0	0	6.12	0.092
15	0	0	0	5.50	0.097
16	0	0	0	6.42	0.095
17	0	0	0	5.70	0.100

With the results of the response variables, the analysis of variance was carried out to obtain the coefficients of the second order polynomial, which allowed to model the behaviour of the response variables (biomass and PHA) as a function of the significant factors (temperature, pH and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Equation 1 describes in general terms the second order equation that was defined for each of the response variables, in order to obtain the best values of each response variable as a function of the factors.

$$y_j = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i < j = 1}^3 \sum_{i < j = 1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

Where:

- $x_1$  Temperature
- $x_2$  pH
- $x_3$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $y_1$  Biomass
- $y_2$  PHA

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

**Table 11.** Analysis of variance (ANOVA) of the fitted second-order polynomial models.

Coefficient	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>
b <sub>0</sub>	5.29 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>
b <sub>1</sub>	0.04	-0.05 <sup>b</sup>
b <sub>2</sub>	0.72 <sup>a</sup>	0.04 <sup>b</sup>
b <sub>3</sub>	1.03 <sup>a</sup>	0.01
b <sub>12</sub>	-0.08	-0.04 <sup>c</sup>
b <sub>13</sub>	-0.17	-0.06 <sup>b</sup>
b <sub>23</sub>	-1.04 <sup>a</sup>	-0.07 <sup>a</sup>
b <sub>11</sub>	0.18	0.03
b <sub>22</sub>	0.12	0.02
b <sub>33</sub>	-0.71 <sup>c</sup>	-0.004
R <sup>2</sup>	0.834	0.771
F-exp	154.3	17.3
Significance level (%)	99.998	99.997

<sup>a</sup> Significant coefficients at the 99.9% confidence level

<sup>b</sup> Significant coefficients at the 99% confidence level

<sup>c</sup> Significant coefficients at the 90% confidence level

As maximum values for each of the response variables, the conditions presented in Table 12 were obtained:

**Table 12** Factor values for the maxima of each response variable.

Response variable	Temperature (°C)	pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Theoretical maximum values (g/L)
Biomass	31	7	1.6	12.43
PHA	31	7	1.6	6.77

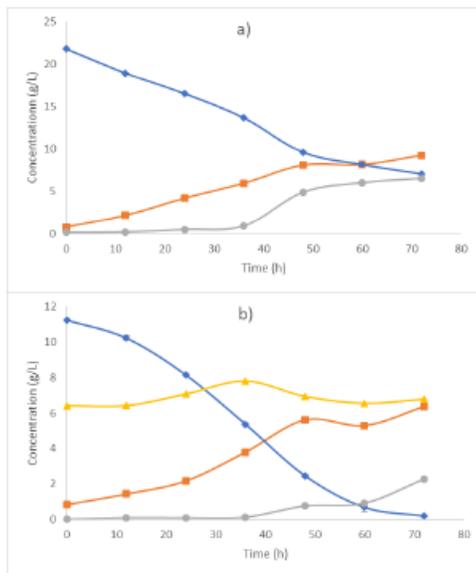
In previous trials, using glucose as a carbon source and under different nutritional and operational conditions selected from bibliographic references, biomass and PHA concentrations of 8.4 g/L and 5.05 g/L, respectively, were achieved. This allows identifying an increase of 48% for biomass and 34% for PHA compared with the theoretical values predicted by the model.

**Validation of maximum values defined for the quadratic model**

Under the conditions presented in Table 12, the experimental validation of the values predicted by the quadratic model was carried out for each of the response variables (Figure 1, a). Biomass and PHA concentrations of 9.2

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

g/L and 6.5 g/L, respectively, were obtained, which represents a 74% and 96% of the theoretical value of biomass and PHA, respectively. This shows the validity of the model defined for obtaining PHA with *Halomonas boliviensis*, under the conditions of this work.



**Fig 1.** Kinetics of the fermentation to validate the best conditions in a) standard medium, and b) with hydrolysate of oil palm empty fruit bunch. The concentrations of glucose (rhombus), biomass (square), PHA (circle) and xylose (triangle) are shown.

When the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch was used a carbon source, under the same conditions, (Figure 1, a), a maximum biomass and PHA concentration of 6.4 g/L and 2.3 g/L, respectively, was obtained, representing a PHA accumulation of 35.7%, while in the fermentation with the standard medium (glucose as carbon source) a PHA accumulation of 70.6% was reached.

After obtaining the best conditions, within the range defined in this study, the percentage of PHA accumulation was improved by 4.9%, using hydrolysate of oil palm empty fruit bunch as a carbon source and hydrolysate of gluten as a nitrogen source, both being economical and unconventional nutritional sources.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

Table 13. Comparison of the results obtained in this study with values reported in the literature

Microorganism	Carbon source	Conditions	%PHA	Reference
<i>Halomonas boliviensis</i>	EFB hydrolysate	30 °C/pH 7/200 rpm, 10 g/L FC <sub>i</sub> , 2.5 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , flask	30.8	Arcila Echavarría 2016
<i>Halomonas boliviensis</i>	Glucose	30 °C/pH 7/200 rpm, 10g/L FC <sub>i</sub> , 2.5g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , flask	58.3	Arcila Echavarría 2016
<i>Haloferrax mediterranei</i>	Macroalgal hydrolysate	42 °C/pH 7.2/ Reactor 40.4 L	48.1	Ghosh et al. 2019
<i>Halomonas halophila</i>	Sawdust hydrolysate	30 °C/200 rpm/72 h, 20 g/L FC <sub>i</sub> , flask	46.8	Kucera et al. 2018
<i>Bacillus megaterium</i> R11	EFB hydrolysate	30 °C/150 rpm, 15 g/L FC <sub>i</sub> , flask	51.6	Zhang et al. 2013
<i>Bacillus cereus suaeda</i> B-001	EFB hydrolysate	30 °C/150 rpm/96 h, flask	55.4	Yustinah et al. 2019
<i>Halomonas boliviensis</i>	Glucose	31 °C/pH 7/200 rpm, 20 g/L FC <sub>i</sub> , 1.6 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , flask	70.6	This study
<i>Halomonas boliviensis</i>	EFB hydrolysate	31 °C/pH 7/200 rpm, 20g/L FC <sub>i</sub> , 1.6 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , flask	35.7	This study

When compared with the results obtained in other studies (Table 14), in which PHA was accumulated by microorganisms using lignocellulosic material as a carbon source, it can be seen that the percentage of PHA accumulation achieved in this study is lower in a range between 11.9 and 16.7 %. However, it is important to highlight that the use of hydrolysate of gluten as a source of nitrogen, which is an unconventional and economical substrate, could have interfered in obtaining a higher percentage of PHA accumulation.

In this sense, the use of economic and non-conventional sources for the two most significant nutrients in the production of PHAs, carbon and nitrogen, can be favorably recognized. This also allows to propose a process with a closed carbon cycle that is more environmentally friendly, with a potential for cost reduction to make PHA a more competitive biopolymer in the marketplace compared to plastics of petrochemical origin.

It should be noted that although the percentage of PHA accumulation can be affected by the use of non-conventional sources for both carbon and nitrogen, and it is lower to that obtained with the standard medium, the cost of the culture medium for this process is much lower. According to Malan (2011), the cost of the carbon

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

source for producing PHA using pure glucose as substrate is 0.822 US/Kg PHA. In this study, this cost was reduced four-fold, to 0.216 US/Kg PHA by changing the carbon source to hydrolysate of oil palm empty fruit bunch. In the case of the use of hydrolysate of gluten as a non-conventional nitrogen source, a cost of 0.021 US/Kg PHA is identified, while using a pure organic nitrogen source, the cost is 0.122 US/Kg PHA, which is almost 6 times more expensive.

### Conclusions

Temperature, pH and initial KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration were found to be significant factors in PHA accumulation.

The model obtained allowed to increase the percentage of PHA accumulation significantly using the standard medium, and only slightly when non-conventional sources of carbon and nitrogen were used. When using hydrolysate of oil palm empty fruit bunch as a carbon source and hydrolysate of gluten as a nitrogen source in the culture medium, the percentage of PHA accumulation was significantly lower than that obtained using the standard medium, with pure glucose as a carbon source. However, despite the accumulation achieved, the PHA production cost is significantly reduced, which presents both non-conventional sources of nutrients as promising substrates with a great potential to be used jointly to obtain this biopolymer at a much lower cost.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
--

## Bibliographic references

- Adeleye A. T, Kenneth C, Christian O, Oluwabunmi O, Oludare O, Toluwalope E, Louis H (2020). Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry*. 96:174–193. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>
- Aramvash A, Shahabi Z A, Aghjeh S D, Ghafari, M D (2015) Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15: 2307–2316. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>
- Arcila Echavarría D C (2016) Aprovechamiento de Subproductos de la Industria Colombiana de Aceite de Palma para la Producción de un Biopolímero del tipo PHA. Thesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia
- Carvajal P D C, (2013). Diseños Factoriales Fraccionados y Metodología del Diseño Robusto de Parámetros. Thesis. Universidad de Granada. Granada, España.
- Ghosh S, Gnaim R, Greiserman S, Fadeev L, Michael G. Golberg A (2019) Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloflex mediterranei*. *Bioresource Technology*. 271: 166–173.
- Gnanasekhar J D, (2012) Production and analysis of polyhydroxybutyrate from *Halomonas boliviensis*. Thesis. KTH Royal Institute of Technology. Stockholm, Sweden.
- Gómez-Vanegas N (2016) Aprovechamiento del subproducto lignocelulósico raquis, procedente de la extracción de aceite de palma para la producción de bioetanol. Thesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Guzmán C, Hurtado A, Carreño C, Casas I (2017) Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*. 8(2): 109–118. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- Kucera D, Pernicová I, Kovalčík, A, Koller M, Müllerová L, Sedláček P, Obruca S (2018) Characterization of the promising poly (3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*. 256: 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>
- Laverde J, Pino N, Escobar A, Peñuela M, Gallego J, Titirici M, López D (2019) Productos de alto valor agregado a partir de la tusa de palma de aceite. *Revista Palmas*. 40 Tomo II(No Especial): 119–128.
- Malán Courdín AK (2011) Estudio de la Producción de Poli-3-Hidroxibutirato en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 a partir de azúcares presentes en la hemicelulosa. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Tesis. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Marsiglia López D E (2018) Determination of nutritional and operational conditions for the production of

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

polyhydroxybutyrate by *Halomonas boliviensis*. Thesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Moorloth D, Nampoothiri K M (2016) Production and characterization of polyhydroxy butyrate-co-valerate (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *Bioresource Technology*. 201: 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.046>

Moreno P, Yañez C, Medeiros N, Escalante H, Combariza M. Y, Guzman C (2015) Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*. 32(6):682-689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.04.003>

Oliart-Ros R M, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero M G (2016) Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*. 11(1): 79–90. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v11i1.556>

Plackett R L, Burman J P (2018) The design of optimum multifactorial experiments. *April*: 305–325.

Quillaguamán J, Delgado O, Mattiasson B, Hatti-Kaul R (2006) Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.013>

Quillaguamán J, Doan-Van T, Guzmán H, Guzmán D, Martín J, Everest A, Hatti-Kaul R (2008) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78(2): 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1297-x>

Quillaguamán J M. (2004) Biopolyester Production: Halophilic Microorganisms as an Attractive Source. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Book section. 355–367.

Quillaguamán J, Muñoz M, Mattiasson B, Hatti-Kaul R (2007) Optimizing conditions for poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(5): 981–986. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0754-2>

Shogren R, Wood D, Orts W, Glenn G (2019) Plant-based materials and transitioning to a circular economy. *Sustainable Production and Consumption*. 22: 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2019.04.007>

Sindhu R, Silviya N, Binod P, Pandey A (2013) Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*. 78: 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.015>

Yustinah Hidayat N, Alamsyah R, Roslan A M, Hermansyah H, Gozan M (2019) Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

B-001. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 18: 101 - 109. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.057>

Ujang S, Salim M R, Olsson G (2009) Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification. In *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE*. 8–15.

Zhang Y, Sun W, Wang H, Geng A (2013) Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource technology*. 147: 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.029>

## Anexo 8. Artículo sometido a la revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### Production of polyhydroxyalkanoates from oil palm empty fruit bunch by *Halomonas boliviensis*

Diana Catalina Arcila Echavarría<sup>1</sup>, Thelmo Alejandro Lu-Chau<sup>2</sup>, Natalia Andrea Gómez Vanegas<sup>1</sup>

✉ catalina.arcila@udea.edu.co

<sup>1</sup> Grupo de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia

<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, CRETUS Institute, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

<https://orcid.org/0000-0002-5379-0291> (DC Arcila-Echavarría)

<https://orcid.org/0000-0002-4447-3729> (NA Gómez-Vanegas)

<https://orcid.org/0000-0003-4394-7432> (TA Lu-Chau)

5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### Abstract

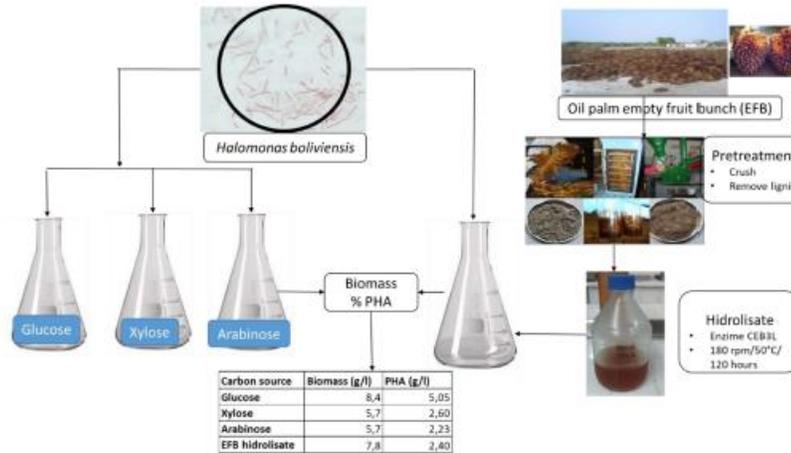
Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable natural polyester that has been proposed as a substitute of petroleum-based plastics. However, its high production cost hinders its entry into the market. In this study, the ability of the halophilic bacteria *Halomonas boliviensis* to grow and accumulate PHB using as substrate hydrolysate of the agricultural residue oil palm empty fruit bunch (EFB) was evaluated at flask scale. First, glucose, xylose and arabinose, the tree main sugars of EFB hydrolysate, were used independently to determine the fermentation profiles and maximal PHB accumulations. Then, at the same operational conditions, the EFB hydrolysate was assayed as substrate for producing PHB. *H. boliviensis* was able to use all three sugars to grow and accumulate PHB, presenting similar fermentation profiles. PHB accumulations of 60.1, 45.6 and 39.1% were reached in the fermentations with glucose, xylose and arabinose, respectively. However, the consumption of glucose was 32% higher than that of xylose or arabinose. In the EFB hydrolysate fermentation, 74.2% of the carbon source was consumed (corresponding to 86.6% glucose and 13.4% xylose) reaching a final PHB accumulation of 30.8%. These results demonstrate the potential of EFB as substrate for producing PHB in halophilic cultures.

Key words: *Halomonas boliviensis*, polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, hydrolysate of oil palm empty fruit bunch, xylose, arabinose.

#### Declarations

Not applicable

Graphical abstract



Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a family of biopolyesters, made up of about 150 different types of monomers. PHAs are thermoplastic polyesters produced by some bacteria as a reserve of carbon source and energy and are accumulated as inclusion bodies in the cytoplasm under conditions of limitation of essential nutrients such as nitrogen, phosphorus, oxygen, sulfur, but with excess of carbon source [1-3]. PHAs are biodegradable, with thermal, physicochemical and mechanical properties similar to those of polymers of petrochemical origin. They are also biocompatible, non-toxic and environmentally friendly. These properties make them a promising material to be used in different applications, including medical devices [4, 5].

However, a limiting factor for the commercialization of PHAs is their high production cost, compared to that of polymers of petrochemical origin. About 40-48% of the total production cost of PHAs is due to the cost of the raw material. From which 70 to 80% is attributed to the carbon source. In this sense, given the high availability, its economy and that they do not compete with the food chain, the use of organic waste from different industries as a carbon source has been presented as an alternative for reducing costs in the production of PHAs [6, 7]. To this goal, and according to the different existing metabolic pathways in which sugars and/or volatile fatty acids are used as carbon source, non-conventional carbon-rich economic substrates from waste or by-products of agriculture, horticulture, food industry, among others, known as lignocellulosic biomass, have been studied [4, 8, 9].

Halophilic bacteria are heterotrophic microorganisms with high potential to produce PHAs at industrial scale, due to their ability to store between 70 and 90% of their dry weight as PHA [10, 11]. These bacteria are able to use economic substrates derived from lignocellulosic biomass. Besides, the high salinity of the culture medium may contribute to reduce the sterilization requirements and its halophilic nature could favor cell lysis during the PHA extraction process [12-14].

Guzman et al. (2017) evaluated the production capacity of native halophilic PHA producing bacteria and identified *Halomonas* sp. as the strain with the highest yield using glucose and starch as carbon sources (0.889 g/g and 0.144 g/g, respectively) [11]. *Haloferax mediterranei* reached PHA contents of 33.4% and 17.3%, using xylose and arabinose, respectively [12]. *H. mediterranei* has been also evaluated with other different substrates such as: hydrolyzed macroalgal biomass, sugarcane vinasse, rice-based ethanol chair and whey, reporting PHA contents of 48%, 70%, 71% and 66%, respectively [12, 15]. *Halomonas halophila*, obtained maximal PHA accumulations of 49.4% and 61.4% when grown using xylose and arabinose as C-source, respectively. This strain was also evaluated with sawdust, corn stover and spent coffee grounds hydrolysates yielding maximal PHA contents of 46.8%, 38.6% and 61.9%, respectively [10].

Hydrolysates from different sources of lignocellulosic biomass have been assayed as substrates to produce PHAs by non-halophilic bacteria, reaching PHA accumulations between 21.6% and 72.5% [4]. Among them, the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch with *Bacillus megaterium* R11 has been reported to accumulate 51.6% of PHA with a productivity of 12.5 g/L [16]. The objective of this study is to evaluate the ability of *Halomonas boliviensis* to obtain PHA from glucose, xylose and/or arabinose as carbon sources, and also from the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch, an economic raw material that contains these sugars.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

## Materials and methods

### Bacterial strain and culture media

The moderate halophilic bacteria *Halomonas boliviensis* ATCC BAA-759 was used in this study. *H. boliviensis* is a Gram-negative bacillus. The inoculum was prepared using the medium reported by Quillaguamán et al. [17], whose composition in g/L is: glucose 1.0, NaCl 80, MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.13, KCl 0.75, NaBr 0.20, peptone 2.0, yeast extract 2.0. The inoculum was maintained at 30 °C and 200 rpm for 14 h in an orbital shaker. Then, the culture broth was centrifuged at 5000 rpm to recover the cells that were later used as inoculum in the production medium. The culture medium reported by Quillaguamán et al. [18] was used as production medium. This was the standard culture medium used to evaluate the different carbon sources. When xylose or arabinose was assayed in substitution of glucose, their concentration was the same as that used with glucose.

### Preparation of hydrolysate of oil palm empty fruit bunch

The oil palm empty fruit bunch (EFB) was supplied by *Bioplanta Palmera para el Desarrollo S.A* from a palm oil extraction plant (Urabá, Colombia). Before being used as carbon source, EFB was pretreated by applying mechanical size reduction and lignin removal through NaOH using ratio 1:10 (solid: NaOH 0.225 M), the mixture was left in an autoclave for 180 minutes at 121 °C. Then, it was washed with water [19]. The enzymatic hydrolysis was performed in an orbital shaker at 180 rpm and 50 °C for 120 hours. The hydrolysis was performed with the commercial enzymatic cocktail CEB3L (Sinobios, Shanghai), using an enzymatic load of 30 FPU/g pretreated material, as reported by Gomez-Vanegas [19].

### Production of PHA with pure substrates

For the evaluation of glucose, xylose and arabinose as carbon sources for the production of PHA, pure reagents supplied by Sigma-Aldrich, Acros Organics and Alfa Aesar, respectively, were used. Fermentations were performed for 72 hours at 30 °C, 200 rpm and pH 7. This test was carried out in 500 mL flasks with a working volume of 200 mL. The initial carbon source concentration was 10 g/L. Carbon source consumption, biomass growth and PHA accumulation were evaluated. Each assay was performed in triplicate.

### Production of PHA with hydrolysate of oil palm empty fruit bunch

The content of glucose, xylose and arabinose in the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch were quantified by HPLC. In this case it was taken as substrate the sum of glucose and xylose concentrations in the hydrolysate of oil palm EFB. Fermentations were performed for 72 hours at 30 °C, 200 rpm and pH 7. This test was carried out in 500 mL flasks with a working volume of 200 mL. The initial carbon source concentration was 10 g/L. Carbon source consumption, biomass growth and PHA accumulation were evaluated. Each assay was performed in triplicate.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

## **Analytical methods**

### **Biomass**

The biomass concentration was determined by spectrophotometry in a Synergy H1 microplate reader (Biotek) by reading the absorbance at 600 nm. The biomass was resuspended in distilled water, after two washes, and separated by centrifugation at 9500 rpm for 5 minutes. The calibration curve was determined from a series of dissolutions of different concentrations prepared by adding known weights of bacterial biomass to water [18].

### **Reducing sugars**

The quantification of glucose, xylose and arabinose was performed by HPLC using an Agilent Technologies 1200 series equipment and an IR detector with a Transgenomic ICsep COREGEL-87-H3 column. The analytical conditions used were: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01 N as mobile phase with a flow of 0.6 mL/min, sample injection of 20 µL, and the temperatures of the column and the detector were set at 80 °C and 55 °C, respectively.

### **Polyhydroxyalkanoate**

PHA content was determined by applying a colorimetric method based on the protocol reported by Gnanasekhar [20]. The sample, the centrifuged biomass from a 1 ml of medium, was mixed with 1 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated at 95 °C for 20 minutes for converting PHB into crotonic acid, a substance that presents a characteristic absorbance peak at 235 nm. The absorbance of the sample was related to a calibration curve prepared using commercial PHB (Sigma-Aldrich) as standard. The absorbance was measured in a Thermo Fischer Scientific EVO300 LC brand spectrophotometer.

### **Polyhydroxyalkanoate extraction**

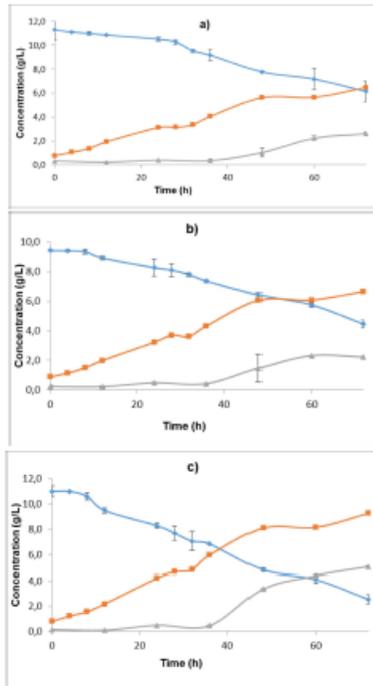
The extraction of PHB from the cells was carried out by following the method reported by Ujang et al. [21], which consists of mixing chloroform and hypochlorite at 5% in a ratio of 1:2 with the sample. The mixture was maintained at 40 °C and 200 rpm for 180 min. Then, it was centrifuged at 15000 rpm for 10 minutes, separating the sample in three phases. The solid phase was washed two times with methanol, once with distilled water, and finally it was dried at room temperature.

## **Results and Discussion**

### **Production of PHB with pure substrates**

Fig. 1 presents the fermentation profile of *Halomonas boliviensis* for PHA accumulation using xylose, arabinose and glucose. Glucose was the substrate used as standard, and it was the one that presented the best results of substrate consumption, growth and accumulation of PHA. The results demonstrate that *H. boliviensis* can use both, xylose and arabinose, as carbon source for growth and accumulation of PHA, presenting a similar behavior with both substrates.

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
--



**Fig. 1** Fermentation kinetics using pure carbon sources: a) xylose, b) arabinose and c) glucose. Concentration of carbon source (diamonds), biomass (squares) and PHB (triangles).

**Table 1** Kinetic parameters and results obtained in the kinetics presented in Figures 1 and 2

Carbon source	FC initial (g/L)	Consumption FC (g/L)	Biomass (g/L)	PHA (g/L)	$Y_{X/S}$	$Y_{PHB/S}$	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	% PHA
Glucose	11.0±0.438	8.5	8.4±0.007	5.05±0.075	0.99	0.59	0.0841	60.11
Xylose	11.3±0.822	5.1	5.7±0.015	2.60±0.165	1.12	0.51	0.0750	45.61

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62

Arabinose	9.4±0.045	5	5.7±0.016	2.23±0.042	1.14	0.45	0.0701	39.07
EFB hidrolizate	10.1±0.168	7.5	7.8±0.093	2.40±0.103	1.04	0.32	0.0540	30.77

Table 1 shows the yields for biomass and PHA, as well as the maximal growth rate ( $\mu_{max}$ ) calculated for the fermentations with the pure carbon sources. The calculation of the kinetic parameters was performed by the integral method of analysis of the Monod model, which is used to calculate these parameters from experimental data. The yields were calculated from experimental data on the amount of substrate consumed, the biomass obtained and the accumulated PHA, taking into account the biomass-substrate yield as the quotient between the increase in cell mass obtained and the consumption of substrate, and the PHA-substrate yield as the quotient between the increase in PHA obtained and the consumption of substrate. The three fermentations presented similar growth rates and yields for biomass ( $Y_{X/S}$ ), which were in the range of 0.99–1.14. The maximal growth rate was in the order glucose > xylose > arabinose, order that is consistent with the velocities reported by Weissgram et al. [22], being higher when glucose is used, a point that stands out when comparing *H.boliviensis* with the other microorganisms.

The results obtained in this study are consistent with those reported by Van-Thuoc et al. [23] and López-Abelairas [24] who used xylose as carbon source and reported growth of *Halomonas boliviensis*, as well as accumulation of PHA. Although, the catabolism of pentoses may affect the growth of some Gram-negative bacteria, it has been reported that *Halomonas boliviensis* follows the xylose via pentose-P pathway for growth and subsequent accumulation of PHA [23].

Table 2 Comparison of halophilic microorganisms producing PHB using xylose and arabinose as the only carbon source.

Microorganism	% PHA		Reference
	Xylose	Arabinose	
<i>Haloferax mediterranei</i>	33.4	17.3	[12]
<i>Halomonas halophila</i>	49.4	61.4	[10]
<i>Halomonas boliviensis</i>	23.1	N.E	[23]
<i>Halomonas boliviensis</i>	45.6	39.1	This study

\*N.E "Not calculated"

According to the data presented in Table 2, the % of PHA achieved in this study is higher than that obtained by Van-Thuoc et al. [23] with *Halomonas boliviensis*, using xylose as a carbon source. At the same time, in this study, higher percentages of PHA accumulation were obtained compared with those reported by Ghosh et al.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
..

[12], when evaluating *Haloferax mediterranei* using xylose and arabinose as a carbon source. Meanwhile, Kucera et al. [10] obtained PHA accumulations 10 and 28% higher than those reached in this study with *Halomonas halophila* using as carbon sources xylose and arabinose, respectively.

#### Production of PHB with hydrolysate of oil palm empty fruit bunch

The hydrolysate obtained had a sugar concentration of 48.89 g/L glucose, 31.98 g/L xylose and 1.04 g/L arabinose. After being diluted to achieve the required concentration for the test, the arabinose concentration became negligible, with an initial concentration of 0.13 g/L, so the initial carbon source was composed mainly of glucose and xylose.

The fermentation kinetics of *Halomonas boliviensis* for PHA accumulation using as a carbon source the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch is presented in Fig. 2. These results show that although the microorganism can use the two main sugars of the hydrolysate, glucose is consumed completely, while xylose was only partially consumed.

In this regard, Fig. 2 does not clearly show whether xylose was consumed for biomass growth or PHA accumulation. It is also evident that although there is some consumption of xylose, this was lower than that reached when it was used as the only carbon source. Considering that the initial and final concentrations of xylose were 4.15 and 3.10 g/L, respectively, this represents a xylose consumption of 25.3%, while it was 45.1% when used as the only carbon source.

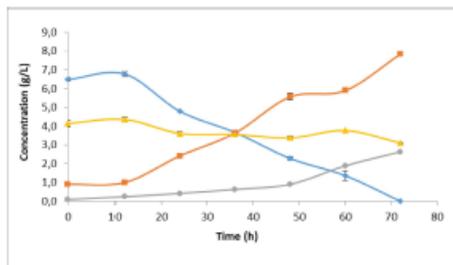


Fig. 2 Fermentation kinetics using hydrolysate of oil palm EFB as a carbon source. Glucose (diamonds), xylose (triangles), biomass (square) and PHB (circle).

In the EFB hydrolysate fermentation, *H. boliviensis* consumed 6.5 g/L and 1.0 g/L of glucose and xylose, respectively. A total biomass concentration of 7.8 g/L was reached after 72 of fermentation, from which 2.4 g/L corresponded to PHA accumulation (30.8%).

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Considering the composition of the hydrolysate of oil palm EFB, the consumptions and yields presented in Table 1 for each sugar, a PHB production of 3.92 g/L was expected. However, in the hydrolysate fermentation only 2.4 g/L of PHB were achieved, which indicates that the sharing in the mixture is different. The highest PHB productivity was obtained with glucose (0.0701 g/L·h), which almost doubled that reached with xylose (0.0361 g/L·h). Slightly lower productivities were obtained with the hydrolysate of oil palm EFB and arabinose (0.0334 g/L·h and 0.0310 g/L·h, respectively).

**Table 3.** Comparison of PHB producing microorganisms using different biomass hydrolysates as a carbon source

Microorganism	Carbon source	%PHB	Reference
<i>Haloflex mediterranei</i>	Macroalgal hydrolysate	48.1	[12]
<i>Halomonas halophila</i>	Sawdust hydrolysate	46.8	[10]
<i>Bacillus megaterium R11</i>	EFB hydrolysate	51.6	[16]
<i>Bacillus cereus suaeda B-001</i>	EFB hydrolysate	55.4	[25]
<i>Halomonas boliviensis</i>	EFB hydrolysate	30.8	This study

According to the reports presented in Table 3, in which the percentage of PHA accumulation obtained with different microorganisms is compared, using as a source of carbon biomass hydrolysates, the result obtained in this study is the lowest. However, although a hydrolysate of the same material was used, the PHA producing microorganism was different and the operational conditions were not the optimal. As far as we know, this is the first study that reports the production of PHA by halophilic bacteria using as substrate the hydrolysate of EFB. On the other hand, it should be clarified that the hydrolysate of EFB used in this study was obtained by enzymatic hydrolysis unlike the ones reported, since these were obtained by acid hydrolysis, besides, in this study was used an initial concentration of FC (10 g/l) lower than the one used in the other reports.

The hydrolysate of oil palm EFB is an economical carbon source, with a price significantly lower than the pure substrates evaluated in this study [26]. However, the comparative analysis shown in Table 1 demonstrates that it presents a yield and accumulation of PHA close to those obtained with glucose.

### Conclusions

*Halomonas boliviensis* is able to use glucose, xylose and arabinose, the three main reducing sugars present in the EFB hydrolysate, as a carbon source. However, *H. boliviensis* prefers glucose over xylose and arabinose, and the greatest growth and PHA accumulation occurs also with glucose. The kinetic parameters of the fermentations with the hydrolysate of oil palm empty fruit bunch supplemented with salts, were very similar to those obtained with the synthetic culture media using xylose and arabinose as a carbon source, which makes EFB hydrolysate a promising low-cost non-conventional substrate for producing PHA. However, to fully exploit its potential the optimal fermentations conditions need to be determined.

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

## **Acknowledgements**

"D.C. Arcila-Echavarría would like to thank the grant 647. T.A. Lu-Chau belongs to the Galician Competitive Research Group GRC-ED431C 2017/29 and to the CRETUS Strategic Partnership (AGRUP2015/02). All these programs are co-funded by FEDER (EU)."

## **Declarations**

### **•Ethical Approval**

Not applicable

### **•Consent to Participate**

Not applicable

### **•Consent to Publish**

Not applicable

### **•Authors Contributions**

Conceptualization: D.C.A.E., T.A.L.C., and N.A.G.V. Methodology: D.C.A.E., T.A.L.C., and N.A.G.V. Formal analysis and investigation: D.C.A.E. Writing—original draft preparation: D.C.A.E. Writing—review and editing: D.C.A.E., T.A.L.C., and N.A.G.V. All authors read and approved the final manuscript. All authors contributed significantly to the work.

### **•Funding**

Not applicable

### **-Competing Interests**

The authors have no conflicts of interest

### **•Availability of data and materials**

The datasets generated or analyzed during the current study are available from the corresponding author on a reasonable request.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

1. Kaur, G., Roy, I.: Strategies for large-scale production of polyhydroxyalkanoates. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29(2), 157-172 (2015). <http://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>
2. Grage, K., Jahns, A. C., Parlani, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H.A.: Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules* 10(4), 660-669 (2009). <https://doi.org/10.1021/bm801394s>
3. Leong, Y.K., Show, P. L., Ooi, C. W., Ling, T.C., Lan, J. C.: Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: insights from the recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 180, 52-65 (2014). <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.020>
4. Al-Battashi, H.S., et al.: Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 18(1), 183-205 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11157-018-09488-4>
5. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S.: Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161-174 (2016). <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
6. Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Panti6n, A. A., & Alonso-Fari6as, B. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J. Environ. Manage.* 205, 215-230 (2018). <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
7. Kalia, V. C., Prakash, J., & Koul, S. Biorefinery for Glycerol Rich Biodiesel Industry Waste. *Indian J. Microbiol.*, (2016). <http://doi.org/10.1007/s12088-016-0583-7>
8. Koller, M., Mar6alek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunneg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *N Biotechnol.* 37, 24-38. (2017) <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
9. Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol.* (2017) <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>
10. Kucera, D., Pernicov6, I., Kovalcik, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., Obruca, S. Characterization of the promising poly (3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*, 256 (December 2017), 552-556. (2018). <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.062>

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
..

11. Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., & Casas, I. Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de Solanum tuberosum L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109–118. (2017). <http://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
12. Ghosh, S., Gnaïm, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Michael, G., & Golberg, A. Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresour. Technol.*, 271, 166–173. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.108>
13. Oliari-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., & Sánchez-Otero, M. G. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 11(1), 79–90. (2016).
14. Moorikoth, D., & Nampoothiri, K. M. Production and characterization of polyhydroxy butyrate-co-valerate (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *Bioresour. Technol.*, 201, 253–260. (2016). <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.046>
15. Nielsen, C., Rahman, A., Rehman, A. U., Walsh, M. K., & Miller, C. D. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. *Microb. Biotechnol.*, 10(6), 1338–1352. (2017). <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12776>
16. Zhang, Y., Sun, W., Wang, H., & Geng, A. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresour. Technol.* 147, 307–314. (2013). <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.029>
17. Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme Microb. Technol.*, 38(1–2), 148–154. (2006). <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.013>
18. Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., & Hatti-Kaul, R. Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(2), 227–32. (2008). <http://doi.org/10.1007/s00253-007-1297-x>
19. Gómez-Vanegas N. Aprovechamiento del subproducto lignocelulósico raquis, procedente de la extracción de aceite de palma para la producción de bioetanol. Universidad de Antioquia; 2016.
20. Gnanasekhar, J. D. Production and analysis of polyhydroxybutyrate from *Halomonas boliviensis*. KTH Royal Institute of Technology, 2012.
21. Z. Ujang, S., Salim, M. R., & Olsson, G. (2009). Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification. In *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE* (pp. 8–15).
22. Weissgram, M., Gstöttner, J., Lorantfy, B., Tenhaken, R., Herwig, C., & Weber, H. Generation of PHB from Spent Sulfite Liquor Using Halophilic Microorganisms. *Microorganisms*, 3(2), 268–289. (2015). <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020268>
23. Van-Thuoc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G., & Mattiasson, B. Utilization of agricultural residues for poly (3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *J. Appl. Microbiol.*, 104(2), 420–8. (2008). <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x>
24. López Abelairas M. Bioprocesses for production of Fuels, Chemicals and Polymers from Lignocellulosic Materials. Universidade de Santiago de Compostela; 2013.
25. Yustinah, Hidayat, N., Alamsyah, R., Muhaimin, A., Hermansyah, H., Gozan, M. Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, 18, (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.057>
26. Malán Courdin AK. Estudio de la Producción de Poli-3-Hidroxibutirato en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 a partir de Azúcares Presentes en la Hemicelulosa. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable; 2011.

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30