

**APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA
COLOMBIANA DE ACEITE DE PALMA PARA LA PRODUCCIÓN
DE UN BIOPOLÍMERO DEL TIPO PHA**

Diana Catalina Arcila Echavarría

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería

Directora:
M.Sc. Natalia Andrea Gómez Vanegas

Línea de Investigación:
Biopolímeros
Grupo de Investigación:
Bioprocesos


Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Medellín, Colombia
2016

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Facultad de Ingeniería

Natalia Andrea Gómez Vanegas (MSc en Biotecnología.) en calidad de director, docente ocasional vinculada al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Antioquia e investigadora del Grupo de Bioprocesos informa que:

La memoria de tesis titulada “**Aprovechamiento de Subproductos de la Industria Colombiana de Aceite de Palma para la Producción de un Biopolímero del Tipo PHA**” presentada por **Diana Catalina Arcila Echavarría**, para optar al título de Magíster en Ingeniería de la Universidad de Antioquia se realizó bajo mi tutela. Para constancia se firma:



Natalia Andrea Gómez Vanegas



Diana Catalina Arcila Echavarría

A Dios por permitirme llegar hasta aquí, a mi madre que siempre me ha apoyado en todos mis retos, a mi hermano que siempre me ha acompañado, a mi esposo por ser mi fuerza y apoyo y a mi hijo, quien en realidad ha sido mi gran maestro durante estos años con su amor, paciencia, apoyo y comprensión.

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia y a la Facultad de Ingeniería por permitirme hacer parte nuevamente del alma mater. A la profesora Mariana Peñuela y al grupo de Bioprocesos por recibirme y brindarme todas las condiciones para realizar mi trabajo de investigación, pero de manera muy especial a mis compañeros del laboratorio, quienes me apoyaron en este proceso de aprendizaje Paola, Catalina, Jefferson, Tatiana, Vanesa.

Al posgrado en Ingeniería, especialmente a mi profesora Natalia Gómez, de quien he recibido grandes enseñanzas y quien me ha apoyado incondicionalmente en este y otros retos de mi vida; y a todos los docentes, por toda su ayuda y enseñanzas. A la profesora Biviana Llano por apoyarme con el desarrollo de los análisis de DSC.

Por último agradezco a las personas que fueron mi motor, mi apoyo y mi fuerza, mi madre, mi hermano, mi esposo y mi hijo.

Resumen

Los polímeros de origen petroquímico tienen una gran cantidad de aplicaciones debido a sus propiedades; sin embargo su disposición final y degradabilidad generan un gran problema de contaminación ambiental. Por esta razón, ha surgido la necesidad de explorar otros materiales alternativos que permitan reemplazarlos; los biopolímeros como la celulosa, polímeros del ácido poliláctico y los polihidroxicanoatos (PHAs) son los de mayor proyección en el momento.

Específicamente los PHAs son los biopolímeros más prometedores, por la similitud de sus propiedades con los de origen petroquímico. Sin embargo, su producción requiere establecer procesos económicamente viables para llegar a ser competitivos. En este sentido, algunos subproductos agroindustriales disponibles en el país, pueden ser valorados para su uso como fuente de carbono económica para la producción de estos biopolímeros.

En este trabajo se evaluó la capacidad de producción de PHA a partir de las bacterias *Ralstonia eutropha* y *Halomonas boliviensis*. Se desarrolló en varias etapas; en la primera se llevó a cabo la activación de los microorganismos, su mantenimiento y propagación; luego en medio de cultivo estándar (glucosa) se establecieron los niveles de concentración de inóculo, fuente de Nitrógeno y relación Carbono/Nitrógeno (C/N), que favorecieran la producción de biopolímero para cada microorganismo. Posteriormente se evaluaron las fuentes de carbono alternativas (hidrolizados de racimos vacíos de frutos de palma (raquis de palma) y glicerol) con las condiciones establecidas en la primera etapa, a partir de esos resultados se seleccionó la fuente de carbono y el microorganismo para evaluar la producción a nivel de biorreactor, donde se estudió el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la producción del polímero. El PHA extraído se caracterizó mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) mediante comparación con un estándar y se evaluaron sus propiedades térmicas con un Análisis Diferencial de Calor (DSC).

Los resultados permitieron establecer que la concentración inicial de inóculo no presentó efecto significativo en el rango evaluado en el proceso. La fuente de Nitrógeno que favoreció la fermentación fue la inorgánica y la relación C/N fue de 20 y 40 (Cmol/Nmol) para *Ralstonia eutropha* y *Halomonas boliviensis*, respectivamente. Al

evaluar las fuentes de carbono no convencionales se encontró que el glicerol residual no favoreció el crecimiento de la *Ralstonia eutropha*, ni la acumulación de biopolímero en la *Halomonas boliviensis*; De acuerdo a los parámetros cinéticos, rendimientos y características del material obtenido se definió como mejor combinación de trabajo el Hidrolizado de raquis con *Ralstonia eutropha*. Al trabajar con estas condiciones en el bioreactor se encontró que el nivel alto de oxígeno disuelto favoreció el crecimiento y la acumulación de biopolímero alcanzando una concentración de biomasa de 6,1g/L y una cantidad total de 0,6998 g de biopolímero.

Los resultados permitieron establecer que los hidrolizados de raquis son un buen sustrato para la biosíntesis de PHA, lo cual permite valorar este subproducto de la industria palmicultora colombiana.

Palabras clave: Polihidroxicanoato (PHAs), Polihidroxibutirato (PHB), glicerol, raquis de palma, *Halomonas boliviensis*, *Ralstonia eutropha*.

Abstract

The polymers of petrochemical origin have a lot of applications due to their properties; however his disposal and degradability generate a huge problem of environmental pollution. For this reason, there has arisen the need to explore alternative materials that allow replace; biopolymers such as cellulose, polymers of polylactic acid and polyhydroxyalkanoates (PHAs) have the greatest projection at the time.

Specifically PHAs are the most promising, because of the similarity of their properties with those of petrochemical origin biopolymers. However, its production requires establishing economically viable processes to become competitive. In this regard, some agro-products available in the country, can be evaluated for use as a source of carbon for economic production of these biopolymers.

In this work the production capacity of PHA from bacteria *Ralstonia eutropha* and *Halomona bolivienses* was evaluated. It was developed in several stages; the first was conducted activation of microorganisms, their maintenance and propagation; then in

standard culture medium (glucose) levels inoculum concentration, nitrogen source and Carbon/Nitrogen (C/N), favoring the production of biopolymer for each microorganism were established. Then alternative sources of carbon (hydrolysates empty fruit bunches of palm fruits (rachis of palm) and glycerol) with the conditions set out in the first stage, from these results the carbon source is selected and the microorganism were evaluated to assess production bioreactor level where the effect of dissolved oxygen on polymer production was studied. The PHA was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) by comparison with a standard and its thermal properties were evaluated with a Differential Scanning Calorimetry (DSC).

The results allowed to establish that the initial concentration of inoculum showed no significant effect on the range evaluated in the process. The inorganic nitrogen source was favoring fermentation and C/N ratio was 20 and 40 (Cmol / Nmol) for *Ralstonia eutropha* and *Halomonas boliviensis* respectively. In evaluating carbon sources unconventional found that the residual glycerol did not favor the growth of *Ralstonia eutropha*, or biopolymer accumulation in *Halomonas boliviensis*; According to the kinetic parameters, yields and characteristics of the material obtained it was defined as the best combination of work Hydrolyzed rachis with *Ralstonia eutropha*. Working with these conditions in the bioreactor was found that the high dissolved oxygen level favored the growth and accumulation of biopolymer reaching a biomass concentration of 6.1g / L and a total amount of 0.6998 g of biopolymer.

The results allowed to establish that hydrolysates rachis are a good substrate for the biosynthesis of PHA, which allows value this product of the Colombian oil palm industry.

Keywords: Polyhydroxyalkanoate (PHAs), polyhydroxybutyrate (PHB), glycerol, palm rachis, *Halomonas boliviensis*, *Ralstonia eutropha*.

CONTENIDO

Resumen.....	
Lista de tablas.....	
Lista de figuras.....	
Lista de símbolos y abreviaciones	
INTRODUCCIÓN.....	15
1. Objetivos.....	17
1.1. OBJETIVO GENERAL	17
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	17
2. Marco teórico	18
2.1 ASPECTOS GENERALES.....	18
2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS:	20
2.2.1 Definición:	20
2.2.2 Propiedades y aplicaciones:	21
2.2.3 Microorganismos productores:	23
2.2.4 Rutas Metabólicas:	24
2.2.5 Aspectos operacionales de la producción:.....	26
2.2 INDUSTRIA DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE DE PALMA:	34
3 Metodología	37
3.1 MICROORGANISMOS:.....	37
3.2 MEDIOS DE CULTIVO:.....	37
3.2.1 Medios utilizados para la <i>Ralstonia eutropha</i> :	37
3.2.2 Medios utilizados para la <i>Halomonas boliviensis</i> :.....	38
3.3 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMERO TIPO PHA:	39
3.3.1 <i>Ralstonia eutropha</i> :.....	40
3.3.2 <i>Halomonas boliviensis</i> :	40
3.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS INICIALES PARA PRODUCCIÓN DE PHB	40
3.4.1. Concentración inicial de inóculo:	41
3.4.2. Evaluación de la fuente de nitrógeno	41
3.4.3 Relación Carbono-Nitrógeno (C/N):.....	41
3.5 EVALUACIÓN DE LAS FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS	42

3.5.1	Producción de PHA con hidrolizados de raquis de palma:	42
3.5.2	Producción de PHA con Glicerol:.....	43
3.6.	EFFECTO DEL OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN DE PHB EN BIORREACTOR	43
3.6.1	Determinación de la Velocidad específica de consumo de oxígeno QO2	44
3.6.2	Determinación del Coeficiente Global de Transferencia de Masa kLa 44	
3.6.3	Evaluación de la acumulación de biopolímero para cada nivel de KLa definido:	45
3.7.	CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO TIPO PHA	45
3.7.1	Extracción del PHA:	45
3.7.2	Caracterización del PHA	46
3.8.	MÉTODOS ANALÍTICOS:	46
3.8.1.	Cuantificación de biomasa:	46
3.8.2.	Cuantificación de fuente de carbono:	46
3.8.4	Identificación y cuantificación del PHA:	47
4.	Resultados y discusión	48
4.1.	DETERMINACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES INICIALES	48
4.2.	EFFECTO DE LA RELACIÓN C/N:	49
4.2.1.	<i>Ralstonia eutropha:</i>	49
4.3	EVALUACIÓN FUENTES DE CARBONO NO CONVENCIONALES CON <i>Ralstonia eutropha:</i>	51
4.3.1	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de biomasa: ...	51
4.3.2	Efecto de la fuente de Carbono en la Obtención del Biopolímero: ...	53
4.4	EVALUACIÓN FUENTES DE CARBONO NO CONVENCIONALES CON <i>Halomonas boliviensis:</i>	55
4.4.1	Efecto de la Fuente de Carbono en el Crecimiento de Biomasa:	55
4.4.2	Efecto de la fuente de Carbono en la Obtención del Biopolímero: ...	58
4.5	CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO TIPO PHA	60
4.5.1	Análisis de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR):	60
4.6	EFFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO EN LA PRODUCCIÓN DE PHB EN BIORREACTOR	63
4.6.2	Cinéticas con las condiciones de Oxígeno seleccionadas:	64
	Bibliografía	67

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura molecular PHB	20
Figura 2. Estructura molecular genérica de los PHAs	21
Figura 3. Ruta metabólica para la producción de polihidroxiburitato (PHB) desde diferentes fuentes de carbono: (I) Glucosa:Ruta de Embden-Meyerhof, (II) Xylosa Ruta vía pentosa, (III) Acido butírico vía acetoacetil CoA y (IV) ácido acético. GAP se refiere a gliceraldehyde-3-fosfato. Ruta para la biosíntesis of PHB desde require 3 enzimas: (I) 3.keto-thiolasa, (II) acetoacetil-CoA reductase y (III) PHB sinthasa. Esquema adaptado de un reporte previo (Braunegg et al 1998; Steinbuchel and Fuchtenbush 1998).	25
Figura 4. Esquema general de producción de PHA, en el que se indican las características de los procesos de fermentación, recuperación y procesamiento del polímero según su uso final (Babel y Steinbuchel 2011).	27
Figura 5. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente. Se aprecia la membrana que lo rodea en la que se encuentran enzimas polimerasas y despolimerasasa (Sudesh et al 2000).	28
Figura 6. Células bacterianas con gránulos de PHA de diferente tamaño y cantidad. Observadas con microscopio óptico (100x)	28
Figura 7. Células bacterianas en etapa de acumulación de PHA, teñido con rojo Nilo y observadas bajo microscopio de fluorescencia (100x). Se aprecia claramente la emisión de fluorescencia que indica la presencia de PHA.	30
Figura 8. Espectro FT-IR de un estándar de P3HB (Fluka). Se aprecia claramente el pico al 1721 cm ⁻¹ correspondiente al enlace éster carbonilo característico de los PHA.	30
Figura 9. Evaluación relación C/N con <i>Ralstonia eutropha</i>	50
Figura 10. Evaluación relación C/N con <i>Halomonas boliviensis</i>	51
Figura 11. Cinéticas de <i>Ralstonia eutropha</i> con las diferentes fuentes de carbono en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP)	53
Figura 12. Concentración de Biopolímero obtenido con las diferentes fuentes de carbono empleadas en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP) para <i>Ralstonia eutropha</i>	55
Figura 13. Cinéticas de <i>Halomonas boliviensis</i> con las diferentes fuentes de carbono en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP)	58
Figura 14. Concentración de Biopolímero obtenido con las diferentes fuentes de carbono empleadas en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP) para <i>Halomonas boliviensis</i>	59

Figura 15. Infrarojos obtenidos con la <i>Ralstonia eutropha</i> con las diferentes fuentes de carbono.....	61
Figura 16. Infrarojos obtenidos con la <i>Halomonas boliviensis</i> con las diferentes fuentes de carbono.....	62
Figura 17. Cinéticas de crecimiento <i>Ralstonia eutropha</i> en bioreactor con fuente de carbono hidrolizado de raquis para un K_{La} alto: 300 RPM - 1,0 VVM y K_{La} bajo:150 RPM – 0,5 VVM.....	65

Lista de tablas

Tabla 1. PHAs Comerciales: nombres, productor, país y productos	22
Tabla 2. Producción de PHA a partir de diversos sustratos y cepas microbianas	24
Tabla 3. Residuos originados en el proceso de extracción de aceite de palma y su destino final	36
Tabla 4. Composición fuentes de carbono no convencionales	36
Tabla 5. Efecto de la concentración inicial de inóculo y de la fuente de nitrógeno sobre la producción de Biomasa (ANOVA)	49
Tabla 6. Propiedades Térmicas del Biopolímero	62
Tabla 7. Valores de K_{la} para los diferentes ensayos realizados.....	64

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
FTIR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
DSC	Análisis diferencial de calor
K _{la}	Coeficiente global de transferencia de masa
Q _{O₂}	Velocidad específica de consumo de oxígeno

INTRODUCCIÓN

La producción de los plásticos data de 1869, pero su mayor desarrollo y crecimiento se presentó desde la década del 60 en el siglo XX. La creciente demanda de este tipo de productos ha permitido generar múltiples aplicaciones para usos cotidianos, como por ejemplo los empaques de alimentos, detergentes, lubricantes, tuberías, tejas, dispositivos de uso hospitalario, autopartes y bolsas, entre muchas otras. Debido al corto tiempo de uso de varios de estos productos (envases de gaseosa, de agua, las bolsas y empaques por ejemplo), se favorece la acumulación: por la mala disposición y su baja velocidad de degradación. Ambas situaciones ocasionan grandes problemas de contaminación que afectan los ecosistemas (Acosta, 2007). La producción de biopolímeros de fuentes microbianas, ofrece una alternativa de solución promisoría, ya que estos productos pueden llegar a usarse para las mismas aplicaciones de los plásticos convencionales, siendo además biodegradables y por tanto menos contaminantes. (Chanprateep, 2010)

Sin embargo, estos biopolímeros de origen microbiano o polihidroxialcanoatos (PHAs) no son competitivos con los polímeros de origen petroquímico debido a sus altos costos de producción. El costo total de producción de los PHAs 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 (Naranjo, Posada, Higueta, & Cardona, 2013). Por lo cual se está trabajando en encontrar fuentes de carbono no convencionales, entre ellos los residuos agroindustriales.

Colombia es el cuarto productor de aceite de palma a nivel mundial, este aceite en un alto porcentaje se utiliza para la obtención de biodiesel. En el proceso productivo del biodiesel se generan 1.2 millones de Toneladas de biomasa lignocelulósica en el proceso de extracción del aceite, representada por los racimos de frutos vacíos o raquis, y aproximadamente 486.000 Toneladas de glicerol en la transesterificación del aceite (Fedepalma, 2012)(Fedepalma, 2015). Dada la disponibilidad de estos residuos agroindustriales en el país y de la posibilidad de ofrecer un mayor valor agregado para ellos, este estudio propone valorar de manera técnica la fracción celulósica del raquis de palma y el glicerol como fuentes de carbono alternativas, renovables y económicas para la obtención de PHAs, partiendo de la hipótesis de que éstos subproductos son

materiales potencialmente utilizables para la obtención de biopolímeros con buenas características térmicas y mecánicas.

De esta manera, con miras a dar respuesta a la pregunta ¿Cómo la *Ralstonia eutropha* y la *Halomonas boliviensis* pueden producir PHA usando como sustrato hidrolizados de raquis de palma y glicerol?, se presenta este informe por sesiones que contienen:

- Objetivos del trabajo de investigación
- Marco teórico
- Metodología desarrollada
- Resultados y Discusión

La evaluación de la capacidad de producción de PHB a partir de las bacterias *Ralstonia eutropha* y *Halomona bolivienses* se desarrolló en varias etapas; en la primera se llevó a cabo la activación de los microorganismos, su mantenimiento y propagación; luego en medio de cultivo estándar (glucosa) se establecieron los niveles de concentración de inóculo, fuente de Nitrógeno y relación Carbono – Nitrógeno (C/N), que favorecieran la producción de biopolímero para cada microorganismo. Posteriormente se evaluaron las fuentes de carbono alternativas (hidrolizados de raquis y glicerol) con las condiciones establecidas en la primera etapa, a partir de esos resultados se seleccionó la fuente de carbono y el microorganismo para evaluar la producción a nivel de biorreactor, donde se estudió el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la producción del polímero. El biopolímero extraído se caracterizó mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) mediante comparación con un estándar y se evaluaron sus propiedades térmicas con un Análisis Diferencial de Calor (DSC).

Finalmente se encontró que: la concentración de inóculo definida para cada microorganismo fue de 1,0 y 0,6 g/L para *Ralstonia eutropha* y *Halomona bolivienses* respectivamente. La fuente de carbono inorgánica fue la que favoreció en mayor medida el crecimiento de la biomasa y la relación C/N que mejores resultados alcanzó en términos de crecimiento y acumulación de biopolímero fueron de 40 y 20 para *Ralstonia eutropha* y *Halomona bolivienses* respectivamente. Se definió como mejor combinación microorganismo sustrato la conformada por *Ralstonia eutropha* e Hidrolizado de raquis, condiciones con las cuales se realizó el trabajo en el bioreactor y se concluyó que el material obtenido fue un Polihidroxitirato (PHB).

1. Objetivos

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de producción de un biopolímero del tipo PHA de dos cepas comerciales (*Ralstonia eutropha* y *Halomona boliviensis*) utilizando como sustratos, raquis de palma y glicerol crudo, subproductos de la industria colombiana de aceite de palma.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Determinar la velocidad de crecimiento de la *Ralstonia eutropha* y *Halomona boliviensis* teniendo como sustrato el hidrolizado de raquis de palma y el glicerol crudo.
- ✓ Seleccionar la cepa que permita alcanzar el más alto rendimiento de PHA a partir de los sustratos evaluados, mediante la cuantificación de los rendimientos sustrato/producto, sustrato/biomasa.
- ✓ Establecer la relación C/N que permita lograr los mayores rendimientos de PHA para el microorganismo de mejor desempeño de acuerdo a los parámetros de rendimientos.
- ✓ Evaluar la producción del biopolímero a escala de biorreactor de 1 L para el microorganismo de mejor desempeño de acuerdo a los parámetros de rendimientos.
- ✓ Determinar algunas propiedades fisicoquímicas del PHA obtenido.

2. Marco teórico

2.1 ASPECTOS GENERALES

El uso de los polímeros sintéticos se ha incrementado en los últimos 50 años. Las múltiples y diversas aplicaciones permiten su uso en la producción de ropa de nylon y poliéster, tapetes de polipropileno, guardafangos de plástico y llantas de hule sintético, corazones y otros órganos artificiales fabricados con polímeros de silicona, además los lapiceros, computadoras, juguetes y televisores, entre otros, están hechos principalmente de plásticos. Debido a toda la demanda en el mercado, la producción global en 2013 alcanzó los 299 millones de toneladas, lo que significa un incremento del 3.9% con respecto al año anterior (PlasticsEurope/ Consultic, 2013).

Los productos plásticos tienen cualidades muy versátiles entre las que destacan su durabilidad y resistencia a la degradación, por lo que tienen un uso extendido en la manufactura de una amplia variedad de productos, los cuales resultan imprescindibles para el estilo de vida actual. Estos productos son también parte esencial de todas las industrias y en muchos casos han reemplazado el uso de vidrio y papel como materiales de empaque. Sin embargo, al ser resistentes a la degradación, su uso excesivo genera desechos que se acumulan en el ambiente a una tasa de 25 millones de toneladas al año, 40 % de las cuales son dispuestas en rellenos sanitarios, mientras que cientos de miles de toneladas son arrojadas a ambientes marinos.

Este hecho ocasiona graves problemas, entre los que se destacan el requerimiento de grandes espacios para su disposición, contaminación visual y muerte de animales que los ingieren accidentalmente, entre otros. Se ha intentado resolver este problema a través de procesos de incineración, reciclaje, fotodegradación o reúso. Sin embargo estas medidas presentan desventajas por lo que no se consideran como soluciones 100% efectivas. En vista de esta situación, la síntesis y uso de plásticos biodegradables en lugar de los derivados del petróleo se presenta como una solución efectiva. (González, Meza, González, & Córdova, 2013)

Se encuentran diferentes definiciones de lo que es un biopolímero o bioplástico presentadas por entidades como el Comité Europeo de Normalización (CEN) o la European Bioplastics (Asociación Europea), las cuales se enfocan en definirlos como: un polímero con propiedades plásticas parecidas a las de un polímero termoplástico pero que en lugar de proceder del petróleo procede de una fuente orgánica renovable o que sea biodegradable bajo el protocolo establecido por la ISO (EN13432).

Para que un polímero biodegradable cumpla con las características o pruebas definidas por la EN 13432 no necesariamente tiene que estar basado en materias primas renovables, ya que la biodegradabilidad está más relacionada con la estructura química que con el origen de las materias primas, es por esto que no todo polímero basado en materias primas renovables es biodegradable. Es así como los polímeros biodegradables se pueden clasificar en, (Federico, 2011):

- Polímeros extraídos o removidos directamente de la biomasa: polisacáridos como almidón y celulosa; Proteínas como caseína, queratina y colágeno.
- Polímeros producidos por síntesis química clásica utilizando monómeros biológicos de fuentes renovables, como polímeros del ácido láctico (PLA)
- Polímeros producidos por microorganismos, bacterias productoras nativas o modificadas genéticamente. Obteniendo Polihidroxicarbonatos (PHAs) conocidos como poliésteres biopoliméricos.

Los PHAs son biopolímeros con propiedades similares a los termoplásticos convencionales y completamente biodegradables (Lee, 1996)(Corre, Bruzard, Audic, & Grohens, 2012). Aunque ocupan un porcentaje del mercado muy limitado, ellos están ganando la atención entre los polímeros biodegradables debido a sus promisorias propiedades tales como: alta biodegradabilidad en diferentes ambientes, no solo en plantas de compostaje. Además los PHAs pueden ser formulados y procesados para usarlos en muchas aplicaciones, incluyendo empaques, recubrimientos, adhesivos, películas, aditivos, entre otros.(Bugnicourt, 2014)

El PHB es el PHA más ampliamente estudiado, posee importantes propiedades de termoplaticidad y biodegradabilidad en compost en diferentes ambientes, la figura 1 muestra su estructura molecular.(Bugnicourt, 2014)

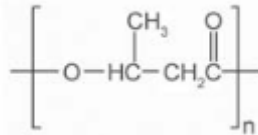


Figura 1. Estructura molecular PHB

Este rango de propiedades interesantes y procesabilidad abren un brillante futuro para el PHB en aplicaciones tales como: suturas quirúrgicas, ingeniería de tejidos, material para liberación controlada de medicamentos y empaques para almacenamiento de productos alimenticios. Como el Policloruro de Vinilo (PVC) y el Polietilentereftalato (PET) el PHB exhibe buenas propiedades de barrera, por lo que puede ser usado en la industria de empaques como un plástico biodegradable para contribuir a resolver los problemas de contaminación ambiental.

Debido a estas interesantes propiedades, el PHB es proyectado para ser un buen candidato para sustituir el Polipropileno (PP), el Polietileno (PE) y también en ciertas aplicaciones del PET. En medicina, el PHB es compatible con la sangre y tejidos de mamíferos, ya que el monómero del PHB es un metabolito normal en la sangre humana. Como el cuerpo reabsorbe el PHB, este puede ser usado como implantes quirúrgicos, en cirugía, como material de sutura para curación de heridas y vasos sanguíneos. En farmacología el PHB puede ser usado como microcápsulas en terapia (Bugnicourt, 2014).

2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS:

2.2.1 Definición:

Son poliésteres alifáticos producidos vía fermentación, se acumula como gránulo dentro del citoplasma de la célula y sirve como material de reserva de energía microbiana, proceso que se da bajo condiciones de limitación de nutrientes como O, N, P, S o elementos traza como Mg, Ca, o Fe, en presencia de exceso de carbono (Van-Thuoc, Quillaguamán, Mamo, & Mattiasson, 2008).

La figura 2 muestra la estructura genérica de los PHAs, donde x es 1 para los polímeros relevantes comercialmente y R puede ser H o una cadena carbonada con

una longitud hasta de 16 carbonos, encontrando así que hasta el momento se han registrado aproximadamente 150 tipos de PHAs que pueden ser obtenidos.

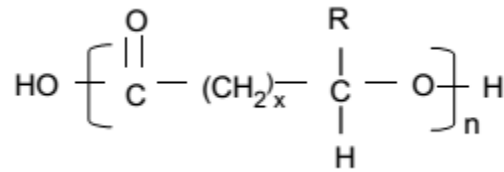


Figura 2. Estructura molecular genérica de los PHAs

Los principales miembros de la familia de los PHA son:

- poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), fórmula genérica con R=1 (metil);
- poly(3-hydroxyvalerate), P(3HV), fórmula genérica con R=2 (etil);
- poly(3-hydroxyhexanoate), P(3HHx), fórmula genérica con R=3 (propil);
- poly(3-hydroxyoctanoate), P(3HO), fórmula genérica con R=5 (pentil);
- poly(3-hydroxydecanoate), P(3HD), fórmula genérica con R=7 (heptil); (Shen, Haufe, Patel, & Science, 2009)

Se trata por tanto de poliésteres lineales de α -3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente.

Se conocen así dos tipos de PHAs según la longitud, o número de carbonos del R: PHAs de cadena corta (short chain length, scl) con cadena alquílica lateral de 3 a 5 carbonos y PHAs de cadena mediana (medium chain length, mcl) con cadena alquílica lateral de 6 a 14 carbonos (González et al., 2013). Las características principales de los PHAs scl son ser demasiado rígidos y frágiles, mientras los PHAs mcl son más elásticos pero con menor fuerza mecánica.

2.2.2 Propiedades y aplicaciones:

Con respecto a las aplicaciones biomédicas, éstas se basan en la propiedad de los PHA de ser biocompatibles con el tejido humano y reabsorbido a una baja velocidad. Cuando este material se implanta en el cuerpo se hidroliza en metabolitos biocompatibles, por lo que se ha usado como hilo para sutura, sustitutos pericárdicos y sistemas de liberación de medicamentos. También se ha propuesto usarlos para

fabricar jeringas desechables y lubricantes para guantes de cirugía. Dentro de las aplicaciones biomédicas, también está su uso como material osteosintético o de fijación para estimular la formación de hueso, así como el uso de sus productos de hidrólisis como materia prima para la industria farmacéutica en la que se requieren moléculas estero específicas (González et al., 2013).

La comercialización de PHAs empieza desde 1959, cuando W.R. Grace y Compañía produjo PHB en U.S. para posibles aplicaciones comerciales (US Patent No. 3225766, 1965). Esta compañía paró el proceso debido a la baja eficiencia de producción e inadecuados métodos de purificación. En 1970, PHBV fue comercializado por Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI/Zeneca BioProducts, Bellingham, UK) con el nombre de Biopol™. En 1996 esta tecnología fue vendida a Monsanto, empresa que generó un proyecto con el fin de hacer el metabolismo de *Escherichia coli* más eficiente para la conversión de azúcares en PHB. Procter and Gamble, en asocio con Kaneka Corporation, Tsinghua Universidad de China y el instituto Riken en Japón, ha desarrollado una amplia gama de aplicaciones para el PHB y PHBH (Nodax™) como fibras, materiales no tejidos, dispersiones acuosas y productos desechables; sin embargo Nodax fue vendido en 1993, en este año, Biomer adquirió la tecnología para producir PHB desde la compañía austriaca Petrochemia Danubia y registró a Biomer™ en 1995. En Brasil, PHB Industrial S.A. (Serrana) usa caña de azúcar para obtener PHB (Biocycle™). En Canadá, Biomatera Inc. se especializa en obtención de PHA por fermentación de residuos agroindustriales; estos biopolímeros son usados en la obtención de geles y cremas que son usados como agentes de liberación lenta en la industria farmacéutica, como agentes cosméticos y matrices de regeneración de tejido. En Japón, Mitsubishi Gas Chemical ha avanzado en la producción de PHB desde la fermentación de metanol (BioGreen™) .(Shen et al., 2009).

Tabla 1. PHAs Comerciales: nombres, productor, país y productos

Nombre comercial	Productor	País	Producto
Biomer	Biomer	Germany	Biomer P209 Biomer P226 Biomer P240
Minerv-PHA	Bion-on	Italy	NIVERV-PHAô
Biogreen	Mitshubishi Gas	Japan	Biogreen
Biocycle	PHB Industrial	Brazil	BIOCYCLE 1000 BIOCYCLE 18BC-1 BIOCYCLE 189C-1

			BIOCYCLE 189D-1
Ecogen	Tianan Biological Material Polyone	China	ENMAT Y 1000 ENMAT Y 1000P ENMAT Y 3000 ENMAT Y 3000P
Mirel	Metabolix	USA	Mirel P4001 Mirel P4010 Mirel P5001 Mirel P5004 Mirel M2100 Mirel M2200 Mirel M4100
Nodax	P&G Chemicals	USA/Japan	Nodaxô
Metabolix	Telles LLC	USA	Mveraô B5011 Mveraô B5010
Jiungsu Nantian	Jiangsu Nantian Group	China	P(3HB)
Goodfellow	Goodfellow Cambridge Ltd	UK	Polyhydroxyalkanoate Biopolymer (PHA) Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxyvalerate 12% Biopolymer (PHB88/PHV12)
Tepha [86]	Tepha Inc	USA	P(4HB)

2.2.3 Microorganismos productores:

Aunque más de 300 diferentes microorganismos tienen la capacidad de sintetizar PHA, solo unos pocos, como: *Cupriavidus Necator* (formalmente conocido como *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Paracoccus denitrificans*, *Protomonas extorquens* y recombinante *E. coli*. son capaces de producir suficiente PHA para la producción a gran escala (Lee, 1996)(Jorge Quillaguamán, Guzmán, Van-Thuoc, & Hatti-Kaul, 2010).

Uno de los microorganismos más ampliamente investigados es el *Cupriavidus necátor* (*Ralstonia eutropha*), tiene la capacidad de producir diferentes tipos de PHA, de acuerdo al sustrato y las condiciones de operación, entre ellos el Polihidroxibutirato (PHB), el cual requiere una limitación de nutrientes en el medio para esta síntesis y

alcanzar un óptimo rendimiento del polímero. Este microorganismo acumula más PHB durante la fase estacionaria de crecimiento; primero el microorganismo se reproduce hasta obtener una concentración celular deseada, sin limitación de nutrientes, y luego un nutriente es removido de la alimentación para empezar la producción de PHB.(Jorge Quillaguamán et al., 2008)(Carvalho, 2012)(Franz, Song, Ramkrishna, & Kienle, 2011).

La *Halomonas boliviensis* es una bacteria halophila moderada que tolera un amplio rango de concentraciones de NaCl (0-25% w/v), temperatura (0- 45°C) y pH (6-11) en el ambiente. La concentración óptima de NaCl para el crecimiento celular es entre 4-5% (w/v). (Jorge Quillaguamán, et al 2010) Se encontró que puede producir PHB durante la fase estacionaria de crecimiento, altos rendimientos de PHB (50-88 wt%) han sido obtenidos en cultivos en batch usando como fuente de carbono glucosa, sucrosa, ácidos grasos volátiles y almidón hidrolizado (Jorge Quillaguamán et al. 2005, 2006)(Van-Thuoc et al., 2008). Además, fue notado que el uso de extracto de levadura como fuente de nitrógeno estimuló el crecimiento celular de *H. boliviensis*, pero cuando se usó una alta concentración el rendimiento de PHB se redujo.(Jorge Quillaguamán et al., 2008).

Tabla 2. Producción de PHA a partir de diversos sustratos y cepas microbianas

Microorganismo	Sustrato	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	PHA (%)	Referencia
Bacterias						
<i>Cupriavidus necator</i>	Glucosa					77 Atlic et al. (2011)
<i>Cupriavidus necator jmp 134</i>	Glicerol crudo		50			48 Mothes et al. (2007)
<i>Ralstonia eutrophoa</i>	Glucosa	50	164	124.6	76	Kim et al. (1994a)
<i>Ralstonia eutrophoa</i>	Glucosa/propiónico	46	158	116.9	74	Kim et al. (1994b)
<i>Ralstonia eutrophoa</i>	Tapioca hidrolizada	59	106	61.4	58	Kin y Chang (1995)
<i>Ralstonia eutrophoa</i>	Glucosa	74	281	230.4	82	Ryu et al. (1997)
<i>Ralstonia eutrophoa</i>	Bagazo caña hidrolizada		11		56.5	Yu et al. (2007)
Bacterias halófilas						
<i>Halomonas boliviensis</i>	Almidón hidrolizado					50 Quilaguaman et al. (2005)
<i>Halomonas TD01</i>	Glucosa	56	80			80 Tan et al. (2011)

(González et al., 2013)

2.2.4 Rutas Metabólicas:

Los microorganismos pueden seguir cuatro tipos de rutas metabólicas diferentes para la biosíntesis de (PHAs), las cuales se presentan dependiendo del tipo de fuente de

carbono utilizada. En la ruta metabólica I se da la glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof la cual degrada carbohidratos (glucosa), la ruta metabólica II es la Pentosa-fosfato la cual sintetiza azúcares (xilosa), la ruta metabólica III es la Acetoacetyl-CoA procedente de la β -oxidación de ácidos grasos (ácido butírico) y la ruta metabólica IV se da por la síntesis de sustratos específicos (ácido acético) (Van-Thuoc et al., 2008).

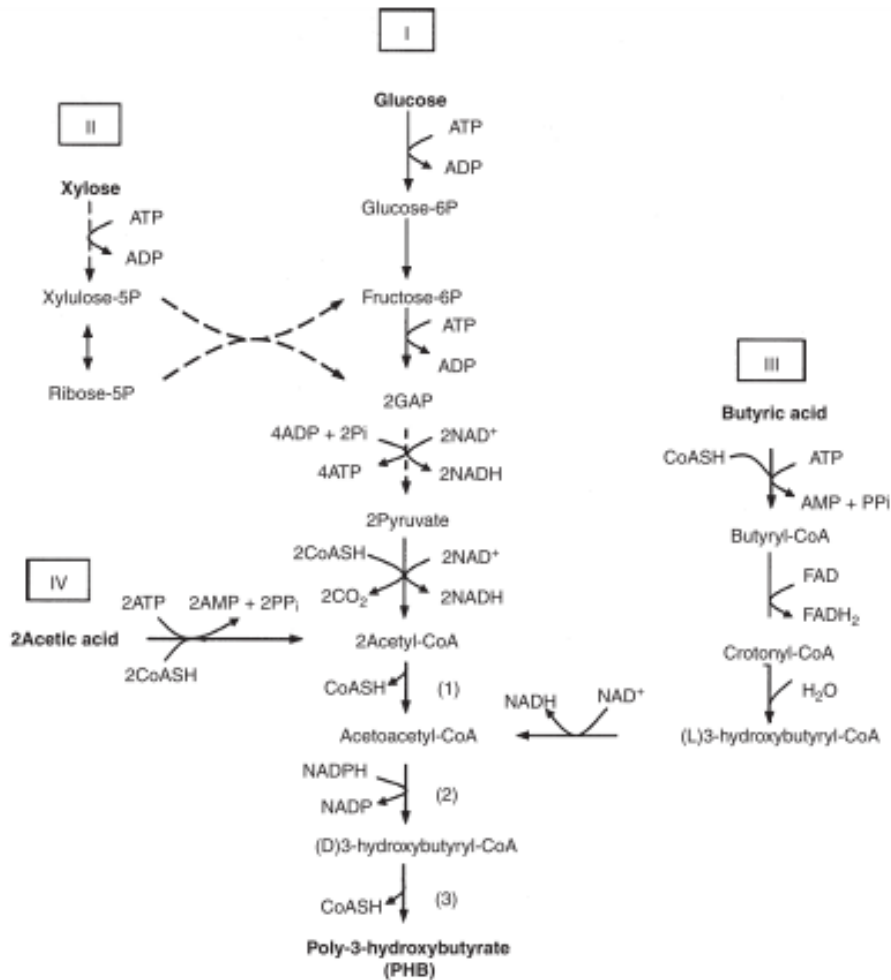


Figura 3. Ruta metabólica para la producción de polihidroxiburitato (PHB) desde diferentes fuentes de carbono: (I) Glucosa: Ruta de Embden-Meyerhof, (II) Xylosa Ruta vía pentosa, (III) Ácido butírico vía acetoacetyl CoA y (IV) ácido acético. GAP se refiere a gliceraldehide-3-fosfato. Ruta para la biosíntesis of PHB desde requiere 3 enzimas: (I) 3.keto-thiolasa, (II) acetoacetyl-CoA reductase y (III) PHB sinthasa. Esquema adaptado de un reporte previo (Braunegg et al 1998; Steinbuchel and Fuchtenbush 1998).

Como se ha mencionado previamente, el PHA más estudiado es el PHB, producido por la bacteria *Ralstonia eutropha* por lo que la ruta de biosíntesis en este microorganismo a partir de carbohidratos ha sido descrita a detalle. En general el proceso metabólico para la producción de PHA de cadena corta comienza a partir de acetyl-CoA, en una secuencia de tres reacciones catalizadas por las enzimas 3-

cetotiolasa (acetil-CoA acetiltransferasa), acetoacetylCoA reductasa (hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa) y la poli(3-hidroxibutirato) sintetasa. Las rutas metabólicas para la biosíntesis de PHB también han sido estudiadas en otras bacterias y las enzimas involucradas en el proceso también han sido caracterizadas. La enzima 3-cetotiolasa de bacterias como *Azotobacter beijerinckii*, *Ralstonia eutropha*, *Zooglea ramigera* y *Rhizobium japonicum* ha sido purificada y estudiada. Esta enzima ha mostrado ser la que controla la biosíntesis de PHB en *R. eutropha*, con la CoA como el metabolito clave. Por su parte la enzima acetoacetyl-CoA reductasa ha sido investigada en las bacterias *Azotobacter beijerinckii*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Streptomyces coelicolor* (González et al., 2013).

Con respecto a la PHB sintetasa, se ha descubierto que en la mayoría de los casos está asociada con los gránulos de PHB, como en el caso de *R. eutropha*, *R. rubrum*, *B. megaterium*, *A. beijerinckii* y *Z. ramigera*. También se ha encontrado que existen cuatro clases principales de PHA sintetasas. Las clases I y II son enzimas que consisten en un solo tipo de subunidad (PhaC). Según su especificidad de sustrato, tanto in vivo como in vitro, la clase I utiliza preferentemente tioésteres-CoA de α -3-hidroxiácidos grasos de 3 a 5 átomos de carbono; mientras que las sintetasas clase II usan tioésteres-CoA de α -3-hidroxiácidos grasos de entre 6 y 14 átomos de carbono. La clase III de PHA sintetasas son enzimas que tienen dos tipos diferentes de subunidades, la PhaC y la PhaE. Las PHA sintetasas de la clase IV se parecen a las de la clase III pero en lugar de la subunidad PhaE tienen una subunidad PhaR. La polimerasa tipo III existe en *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa pfennigii* y *Synechocystis sp.* Este tipo de enzima polimeriza principalmente hidroxiácidos de cadena corta, pero también puede polimerizar a los de cadena media (González et al., 2013).

En la ruta metabólica que sigue la *Ralstonia eutropha* para la obtención de PHAs a partir de glicerol hay que considerar la gluconogénesis, ruta mediante la cual se produce glucosa a partir de precursores no-carbohidratos, tales como: el acetato, lactato, malato y glicerol, esta ruta provee la cantidad de azúcares necesarios para la biosíntesis de componentes celulares. (Tanadchangsang & Yu, 2012).

2.2.5 Aspectos operacionales de la producción:

El proceso para la producción de PHAs mediante fermentación bacteriana consiste de tres etapas básicas: fermentación, extracción y purificación:

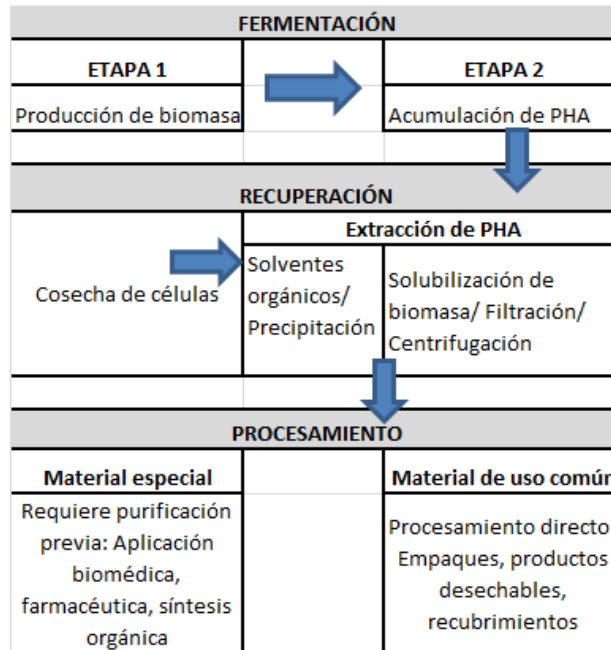


Figura 4. Esquema general de producción de PHA, en el que se indican las características de los procesos de fermentación, recuperación y procesamiento del polímero según su uso final (Babel y Steinbuchel 2011).

Para la fermentación a escala bioreactor se prepara un inóculo el cual está activado para la producción del PHA y permite un proceso de fermentación más corto. La fuente de carbono se alimenta en diferentes momentos buscando dar las condiciones necesarias para el crecimiento celular y para la producción del biopolímero. Este proceso puede llevar entre 38 a 48 horas (Shen et al., 2009).

La polimerización de estos ácidos se da por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster, de allí que también se les conozca como biopolíésteres. Se acumulan como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma microbiano rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas (Figura 5). (González et al., 2013)

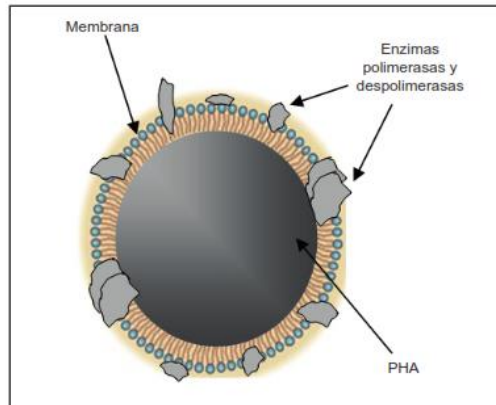


Figura 5. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente. Se aprecia la membrana que lo rodea en la que se encuentran enzimas polimerasas y despolimerasasa (Sudesh et al 2000)

Las investigaciones sobre el proceso de acumulación de PHA indican que el número de gránulos por célula se define en las primeras etapas de acumulación y que la producción del polímero cesa cuando su contenido alcanza cerca del 80 % del peso celular en base seca. Este fenómeno ha llevado a la conclusión de que existen restricciones físicas que impiden a la célula acumular más polímero, a pesar de la disponibilidad de sustrato y actividad de la enzima PHA polimerasa. Estas inclusiones se observan bajo el microscopio como gránulos esféricos de diferentes tamaños tal como se muestra en la figura 6. (González et al., 2013)

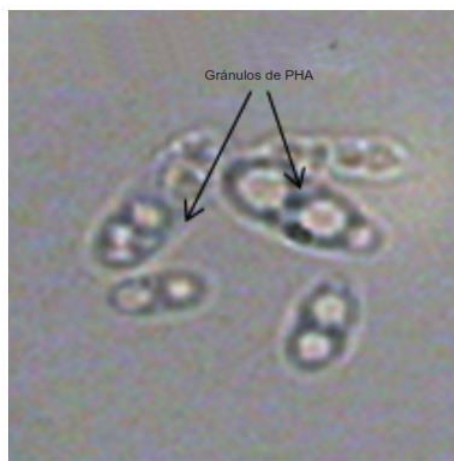


Figura 6. Células bacterianas con gránulos de PHA de diferente tamaño y cantidad. Observadas con microscopio óptico (100x)

Para la extracción y purificación se utilizan diferentes métodos, entre los cuales se encuentran, la extracción con solventes, la digestión química o enzimática, la

disrupción mecánica, el uso de fluidos supercríticos. Con estas técnicas se busca romper la membrana celular para extraer el PHA y luego recuperarlo con la adición de metanol o etanol. Los métodos más utilizados son la extracción con solventes y la digestión química, por costos y nivel de pureza obtenidos, aunque para usarlo a escala industrial presenta inconvenientes desde el punto de vista ambiental (Jacquel, Lo, Wei, Wu, & Wang, 2008).

La metodología reportada más frecuentemente para la extracción de PHA de la biomasa microbiana ha sido el uso de hidrocarburos clorados, especialmente la técnica utilizando reflujo con cloroformo. La solución de PHA resultante se filtra para remover restos de células, luego se concentra y el PHA se precipita en metanol o etanol. Con esta técnica los lípidos de bajo peso molecular se quedan en solución y no interfieren con la determinación. El uso de solventes clorados es más utilizado para la extracción de PHA de cadena corta como el PHB, sin embargo los PHA de cadena media son solubles en un rango de solventes más amplio. Debido a que el uso a gran escala de los solventes mencionados anteriormente puede ser costoso, también se han desarrollado otros procesos de extracción con base en el uso de etilen y propilen carbonato, así como metodologías que se basan en la liberación del polímero de las células mediante la ruptura de las mismas usando soluciones de hipoclorito de sodio, ácidos o bases (González et al., 2013).

Tradicionalmente la detección de gránulos de PHA en células microbianas se ha llevado a cabo por medio de la tinción con el colorante lipofílico negro Sudán B, debido a la naturaleza lipídica de los PHA. Sin embargo actualmente existen otros colorantes que tienen mayor afinidad y especificidad por compuestos de naturaleza lipídica entre los que se destaca el azul Nilo A (cloruro de 5-amino-9-dietilamino-benzo [alfa] fe nazonio), que pertenece a la familia de las oxazinas y que presenta una fluorescencia naranja a una longitud de onda de 460 nm (Ostle y Holt, 1992). El rojo Nilo (7-diethylamino-3,4benzofenoxazina-2-ona) es también un colorante excelente para la detección de inclusiones intracelulares de este tipo como se muestra en la figura 7. Los gránulos de PHA una vez teñidos presentan una fluorescencia que va del amarillo-dorado (excitación de 450-500 nm) al rosa-rojo (excitación de 515-560 nm).

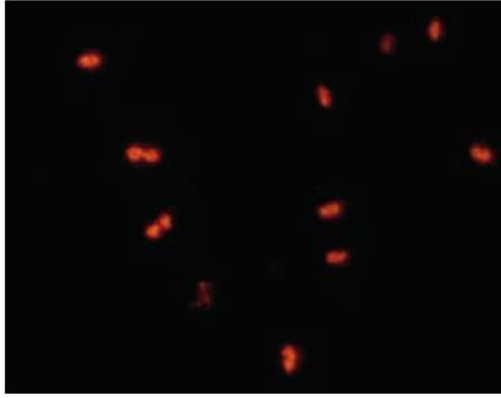


Figura 7. Células bacterianas en etapa de acumulación de PHA, teñido con rojo Nilo y observadas bajo microscopio de fluorescencia (100x). Se aprecia claramente la emisión de fluorescencia que indica la presencia de PHA.

Por otro lado, la detección de PHA intracelular también puede llevarse a cabo mediante espectroscopia de infrarrojo (FT-IR). Los espectros de PHA con esta técnica exhiben un pico alrededor de los 1730 nanómetros correspondiente al enlace éster carbonilo característico de los PHA (Fig. 8) (González et al., 2013).

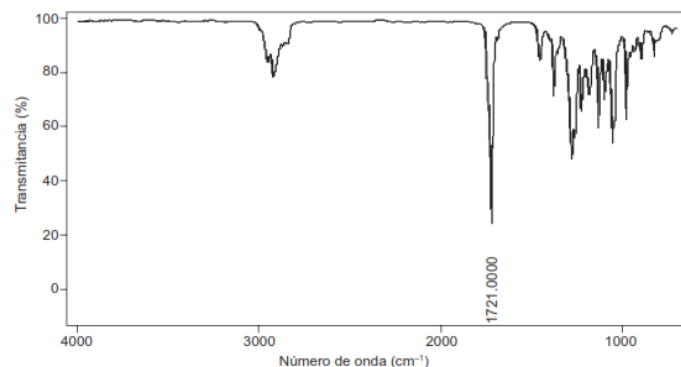


Figura 8. Espectro FT-IR de un estándar de P3HB (Fluka). Se aprecia claramente el pico al 1721 cm-1 correspondiente al enlace éster carbonilo característico de los PHA.

2.2.5.1 Relación Carbono- Nitrógeno:

Para mejorar la productividad en la fermentación es necesario controlar la relación carbono nitrógeno, ya que el microorganismo debe tener condiciones óptimas de todos los nutrientes para el crecimiento celular, de tal manera que se pueda obtener una cantidad adecuada de biomasa. Luego para la síntesis del PHA se requiere que tenga un déficit de nitrógeno y un exceso de carbono, que debe ser sostenido para la

acumulación del biopolímero ya que de tener completa escases el microorganismo cubre sus necesidades nutricionales con el material almacenado (Johnson, Kleerebezem, & van Loosdrecht, 2010)(Tanadchangsaeng & Yu, 2012).

Los cultivos limitados por Nitrógeno ofrecen la ventaja de un alto contenido de PHB en el punto de producción máximo de biomasa, y puede subsecuentemente necesitar menos tiempo en la fase de acumulación de PHA en el proceso de producción. Sin embargo los cultivos limitados por Nitrógeno tienen en muchos casos un decrecimiento en la capacidad para almacenar PHB o incluso pierden esta capacidad casi completamente cuando se mantienen por un largo tiempo bajo condiciones limitantes de Nitrógeno. No puede ser excluido que también otros parámetros operacionales pueden jugar un rol en obtener las diferentes capacidades de producción de PHB, pero la limitación de nitrógeno juega un rol clave. (Johnson et al., 2010)

2.2.5.2 Tipos de Biorreactores y condiciones de oxígeno:

Un fermentador o biorreactor es un recipiente donde ocurren diferentes reacciones biológicas, que tiene como función principal mantener el medio y el microorganismo en las condiciones adecuadas para lograr la mayor producción de los compuestos de interés. Idealmente debe cumplir los siguientes requisitos: Bajo consumo de energía, mezclado uniforme, fácil adaptación a los diferentes procesos, óptima transferencia de calor, facilidad para la toma de muestra, diseño mecánico simple, controles de pH, oxígeno disuelto y temperatura (Hernández A., 2003).

Generalmente, un biorreactor se construye de vidrio o acero inoxidable con una capacidad máxima aproximada de 50 Litros a nivel de laboratorio y de 300 Litros a nivel industrial, utilizando un volumen de trabajo que no exceda el 80% del volumen total. Según la geometría, capacidad y modo de funcionamiento, existen diversos tipos de reactores para cultivos biológicos.

- Fenómeno de Transferencia de oxígeno

Los biorreactores en los cuales se desarrollan procesos aerobios deben manejar un mecanismo conjunto aireación-agitación ajustable, para homogenizar las condiciones

en su interior y proporcionar la cantidad de oxígeno adecuada para mantener la población de microorganismos activa, permitir la oxidación de la materia orgánica y/o la producción de metabolitos según el objetivo final del mismo (Martínez Delgadillo S. A., 2005).

Debido a la baja solubilidad del oxígeno en el agua (medio de cultivo), disponer de estos componentes mecánicos no es garantía para evitar una limitación de oxígeno durante el proceso productivo. Por eso, es de vital importancia conocer el proceso, las propiedades de transporte del gas dentro del mismo y la cinética de la respiración celular.

La transferencia de oxígeno puede ser descrita mediante la teoría de las dos películas; una gaseosa y la otra líquida, acopladas por la interfase gas-líquido (Martínez Delgadillo S. A., 2005). Suponiendo que las películas son placas estacionarias y están rodeadas por las fases en régimen turbulento, se define:

Etapa I, ocurre la saturación de la interfase mediante el paso del oxígeno por la película de gas. La resistencia al flujo en esta etapa es muy pequeña.

Etapa II, el paso de las moléculas de oxígeno de la interfase, desde la película del líquido hasta el seno del mismo, debido a la gran resistencia del medio a la difusión del gas, este paso controla y determina el resultado del proceso.

Las propiedades de transporte de oxígeno en un reactor, se caracterizan al postular una relación matemática de primer orden entre la cinética de transferencia y la fuerza motriz, es decir, realizar un balance de materia en estado estacionario con las simplificaciones correspondientes al fenómeno descrito, obteniendo así la expresión básica de la Ley de Fick:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - Q_{O_2} x \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde,

k_L : Coeficiente de transferencia de masa interfacial gas/líquido

a : Área específica de contacto de fases por unidad de volumen del reactor

$C_{O_2}^*$: Concentración de oxígeno disuelto en el líquido en condiciones de saturación

C_{O_2} : Concentración de oxígeno disuelto en el líquido en cualquier instante

$Q_{O_2}x$: Velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen del reactor

El área específica de contacto entre fases (a) es la suma total de las áreas de las burbujas y el área de contacto de la superficie del líquido con la atmósfera superior del reactor dividido por el volumen en reacción; debido a la dificultad técnica para estimar esta relación a una tasa de agitación y de aireación específicas, se utiliza como constante el producto de k_L por a término reconocido como el k_{La} del sistema.

Los valores de la velocidad específica de consumo de oxígeno, el coeficiente global de transferencia de masa y la concentración de saturación de oxígeno disuelto en el sistema, pueden calcularse a partir del modelo matemático que se deriva de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, si se tienen disponibles datos de la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo cuando ocurre una modificación de la tasa de transferencia.

- Velocidad específica de consumo de oxígeno (Q_{O_2})

La velocidad de consumo de oxígeno disuelto en los sistemas aerobios depende de la cinética de respiración celular en el reactor, el cual depende linealmente del producto de la densidad celular y de la concentración del sustrato; es decir, la necesidad concreta para la producción de la biomasa, que está relacionada con las características del microorganismo y su velocidad específica de crecimiento.

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se simplifica al dividirla por $C_{O_2}^*$ y hacer el término k_{La} prácticamente cero, suponiendo que la admisión de aire al reactor es interrumpida y la ausencia de burbujas provoque una disminución en el área de contacto entre fases sólo a la superficie delimitada por el nivel de líquido en el reactor (Torres López, 2008^a).

$$\frac{d(C_{O_2}/C_{O_2}^*)}{dt} = -\frac{Q_{O_2}x}{C_{O_2}^*} \quad (\text{Ec. 2})$$

La pendiente de la curva dinámica, $(C_{i,O_2}/C_{O_2}^*)$ vs. t_i , generada exclusivamente por la respiración de los microorganismos, permite estimar el Q_{O_2} conociendo la cantidad de biomasa seca, y la solubilidad del oxígeno en el medio del cultivo.

- Coeficiente global de transferencia de masa (K_{La})

De la misma forma, suponiendo la ausencia de consumo de oxígeno y manteniendo constantes tanto las condiciones de operación como las propiedades del líquido, K_{La} es invariable en el tiempo, lo que permite simplificar e integrar la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** entre t_0 y t_1 .

$$k_{La} = \frac{\ln\left(\frac{C_{O_2}^* - C_{0,O_2}}{C_{O_2}^* - C_{1,O_2}}\right)}{t_1 - t_0} \quad (\text{Ec.3})$$

El K_{La} del biorreactor se define con un par de valores puntuales o con mayor precisión aún, como la pendiente de la recta resultante al graficar $\ln\left(\frac{C_{O_2}^* - C_{0,O_2}}{C_{O_2}^* - C_{i,O_2}}\right)$ frente a $t_i - t_0$.

La importancia de hallar ésta variable de diseño radica en su relación directa con la capacidad del equipo para transferir el oxígeno desde la fase gaseosa original hacia la fase líquida y permitirle ser usado por los microorganismos.

2.2 INDUSTRIA DE PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE ACEITE DE PALMA:

El biodiesel es un biocombustible sintético líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, nuevos o usados. El prefijo bio hace referencia a su naturaleza renovable y biológica en contraste con el combustible diesel tradicional derivado del petróleo; mientras que diesel se refiere a su uso en motores de este tipo. Como combustible, el biodiesel puede ser usado en forma pura o mezclado con diesel de petróleo. La obtención del biodiesel consiste en una reacción de transesterificación, este tipo de reacción es el proceso de intercambiar el grupo alcoxi (grupo alquilo unido a un átomo de oxígeno, es decir, RO) de un éster por otro

alcohol, son frecuentemente catalizadas mediante la adición de un ácido o una base. Cuando el glicerol se sustituye por el alcohol se obtienen tres moléculas de metiléster (biodiesel) y una molécula de glicerina. (Vivas Castaño, 2010)

Colombia siendo el primer productor en América y cuarto productor a nivel mundial de aceite de palma, por disponibilidad utiliza esta materia prima en un alto porcentaje para la obtención del biodiesel. El aceite de palma es obtenido a partir del fruto de la palmera, específicamente de la cubierta carnosa, para llegar a este producto final el fruto debe someterse al siguiente proceso: esterilización, desfrutación, digestión, prensado y clarificación. En la etapa de desfrutación se genera el primer residuo que consiste en racimos vacíos (50% de racimos de fruta fresca), que se emplean como combustible en las fábricas de extracción de aceite, a este residuo se le conoce como raquis de palma (o EFB, empty fruit bunch) (Peñuela, 2013).

En el proceso de extracción de aceite de palma se generan 1.2 millones de Toneladas de biomasa lignocelulósica representada por los racimos de frutos vacíos o raquis, y aproximadamente 486.000 Toneladas de glicerol en la transesterificación del aceite (Fedepalma, 2012)(Fedepalma, 2015). Esto representa una alta cantidad de residuos potencialmente aprovechables.

Los residuos generados en el proceso de extracción de aceite de palma se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Residuos originados en el proceso de extracción de aceite de palma y su destino final

Etapas del proceso	Efluentes	Destino o tratamiento
Recepción de la fruta	Nº 1 Impureza de la fruta	Plantaciones, como abono.
Esterilización	Nº 2 Líquidos por condensación	Planta de tratamiento de aguas
Desfrutado	Nº 3 Raquis vacías	Se almacenan a campo abierto y luego se envían a las plantaciones como control de malezas
Prensado	-	-
Clarificación	Nº 4 Aguas y lodos residuales	Planta de tratamiento de aguas
Desfibrado	Nº 6 Fibra de la palma	Combustible para la caldera
Palmistería	Nº 7 Cáscara de la nuez	Combustible para la caldera
	Nº 8 Líquido por secado de la nuez	Planta de tratamiento de aguas
Extracción del aceite de nuez	-	-
Almacenamiento del aceite de palma y nuez	Nº 5 y Nº 9 Sedimentos del tanque	Planta de tratamiento de aguas
Empacado de la torta o harina de nuez	-	-
Generación de vapor	Nº 10 Cenizas	Se almacena en campo abierto

(Reinosa Pulido, 2009)

Los materiales utilizados como fuente de carbono reportan la siguiente composición:

Tabla 4. Composición fuentes de carbono no convencionales

Composición del Glicerol Residual		Composición del Raquis de Palma	
Compuesto	Composición wt%	Compuesto	Composición wt%
Metanol	32.59	Celulosa	36.8
Glicerol	60.05	Lignina total	17.9
NaOCH ₃	2.62	Extractivos	2.2
Ácidos grasos	1.94	Xilano	19.3
Cenizas	2.8		

(Posada, Naranjo, López, Higueta, & Cardona, 2011)(Tan et al., 2013)

3 Metodología

La evaluación de la capacidad de producción de PHA a partir de las bacterias *Ralstonia eutropha* y *Halomonas bolivienses* se desarrolló en varias etapas; en la primera se llevó a cabo la activación de los microorganismos, su mantenimiento y propagación; luego en medio de cultivo estándar (glucosa) se establecieron los niveles de concentración de inóculo, fuente de Nitrógeno y relación Carbono – Nitrógeno (C/N), que favorecieran la producción de biopolímero para cada microorganismo. Posteriormente se evaluaron las fuentes de carbono alternativas (hidrolizados de raquis y glicerol) con las condiciones establecidas en la primera etapa, a partir de esos resultados se seleccionó la fuente de carbono y el microorganismo para evaluar la producción a nivel de biorreactor, donde se estudió el efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la producción del polímero. El PHB extraído se caracterizó mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) mediante comparación con un estándar y se evaluaron sus propiedades térmicas con un Análisis Diferencial de Calor (DSC).

3.1 MICROORGANISMOS:

Las bacterias comerciales utilizadas fueron:

- *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 que es un bacilo Gram negativo, mide entre 1-2 μm , no fermenta la lactosa y es considerada fitopatógena.
- *Halomonas boliviensis* ATCC BAA-759, bacteria halofila moderada, bacilo Gram negativo.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO:

3.2.1 Medios utilizados para la *Ralstonia eutropha*:

3.2.1.1 Medio de activación y mantenimiento:

Para la activación de la cepa *Ralstonia eutropha* se siguió la metodología recomendada por la ATCC y fue cultivada en medio agar nutriente compuesto por:

peptona (3g/L); extracto de malta (5g/L); agar-agar (15g/L). El método de siembra fue en estría por agotamiento y fue incubado a una temperatura de 30°C/12h. Luego de esto, para su mantenimiento la bacteria previamente crecida en agar nutriente es almacenada en placa Petri a 4°C, durante un mes; tiempo en el que se realiza 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.

3.2.1.2 Medio de crioconservación y conformación del banco semilla:

Se realizó el procedimiento descrito en Current protocols in microbiology 2007. A partir de un medio sólido con una asada se incubó la bacteria en caldo enriquecido Tripticasa soya (TSB, marca-scharlau), 30°C/200rpm/16h en un volumen total de 100ml. Transcurrido este tiempo se procedió a la conservación de las células de *R. eutropha* para lo cual se tomaron 500µl de glicerol al 40% y 500µl de medio TSB con células cultivadas obteniendo una solución 1:1 de células y glicerol para un volumen total de 1ml en viales estériles de 2ml. Estos viales fueron almacenados en nevera a -20°C.

3.2.1.3 Medio para producción de inóculo:

Para la preparación del inóculo se utilizó medio TSB el cual favorece un alto crecimiento de la biomasa. Luego de 14 h/30°C/ 200rpm el medio de cultivo se centrifuga a 5000 rpm, para recuperar las células que posteriormente se usan como inóculo para el medio de producción.

3.2.2 Medios utilizados para la *Halomonas boliviensis*:

3.2.2.1 Medio de activación y mantenimiento:

Para la activación de la cepa *Halomonas boliviensis* se siguió la metodología recomendada por la ATCC y fue cultivada en medio descrito por Quillaguaman, 2006 compuesto por (%w/v): NaCl 4.45, MgSO₄.7H₂O 0.025, CaCl₂.2H₂O 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/24h. Luego de esto, para su mantenimiento la bacteria previamente crecida en este medio es almacenada en placa Petri a 4°C, durante un mes; tiempo en el que se realiza 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.

3.2.2.2 Medio de crioconservación y conformación del banco semilla:

Se realizó el procedimiento descrito en Current protocols in microbiology 2007. A partir de un medio sólido con una asada se incubó la bacteria en medio reportado por Quillaguaman, 2006, el cual contiene (%w/v): NaCl 4.45, MgSO₄.7H₂O 0.025, CaCl₂.2H₂O 0.009, KCl 0.05, NaBr 0.006, Peptona 0.5, Extracto de levadura 1.0, glucosa 0,1, agar granulado 2.0, a unas condiciones de 30°C/200/rpm/16h en un volumen total de 100ml. Transcurrido este tiempo se procedió a la conservación de las células de *Halomonas boliviensis* para lo cual se tomaron 500µl de glicerol al 40% y 500µl de medio descrito anteriormente con células cultivadas obteniendo una solución 1:1 de células y glicerol para un volumen total de 1ml en viales estériles de 2ml. Estos viales fueron almacenados en nevera a -20°C.

3.2.2.3 Medio para producción de inóculo:

Para la preparación del inóculo se utilizó medio reportado por Quillaguaman, el cual contiene (%w/v): NaCl 4.5, MgSO₄.7H₂O 0.038, CaCl₂.2H₂O 0.013, KCl 0.075, NaBr 0.02, Peptona 0.2, Extracto de levadura 0.2, glucosa (maltosa) 1.0. Luego de 14 h/30°C/ 200rpm el medio de cultivo se centrifuga a 5000 rpm, para recuperar las células que posteriormente se usan como inóculo para el medio de producción.

3.3 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMERO TIPO PHA:

Para evaluar la producción de PHA, con cada microorganismo, utilizando los medios no convencionales planteados en el estudio: hidrolizado de raquis de palma y glicerol residual. Primero se evaluó su capacidad de producción utilizando un medio estándar

con glucosa y el requerimiento mínimo de sales para cada microorganismo como se indica a continuación:

3.3.1 *Ralstonia eutropha*:

El medio mineral mínimo de sales que se utilizó como medio estándar tiene una composición por litro de: glucosa (20,0g); Na₂HPO₄ 7H₂O (6,7g); KH₂PO₄ (1,5g); (NH₄)₂SO₄ (5g); MgSO₄ 7H₂O (1g); citrato de hierro y amonio (60mg); CaCl 2H₂O (10mg) y soluciones trazas para 800ml H₃BO₃ (0,24g); CoCl 6H₂O (0,16); MnCl₂ 4H₂O (24mg); ZnSO₄ 7H₂O (0,08mg); NaMoO₄ 2H₂O (24mg); NiCl₂ 6H₂O (16mg); CuSO₄5H₂O. (Tanadchangsaeng & Yu, 2012)

3.3.2 *Halomonas boliviensis*:

El medio para producción reportado por Quillaguaman, 2008 se utilizó como medio estándar, el cual tiene una composición (%w/v) de: NaCl 4.5, MgSO₄.7H₂O 0.038, CaCl₂.2H₂O 0.013, KCl 0.075, NaBr 0.02, Peptona 0.2, Extracto de levadura 0.15, (NH₄)₂SO₄ 0.15, KH₂PO₄ 0.20, glucosa 1.0.

Las fermentaciones fueron realizadas bajo condiciones de temperatura, agitación y pH, definidas basados en los reportes de la literatura, acerca de cada microorganismo. Con ambos se trabajó a 30°C, 200rpm y pH 6.8 – 7.0, durante 48 horas. La variable respuesta medida fue la concentración de biomasa para cada uno de los parámetros evaluados con cada microorganismo.

3.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS INICIALES PARA PRODUCCIÓN DE PHB

Se determinó el efecto de la concentración inicial de inóculo, la fuente de Nitrógeno y la relación Carbono-Nitrógeno, para ello se realizó en cada uno de los experimentos que se indicaran una prueba ANOVA para establecer la significancia de cada uno de los parámetros estudiados.

3.4.1. Concentración inicial de inóculo:

Para esta variable se evaluaron tres concentraciones de inóculo diferentes para cada microorganismo, definidas en el rango de trabajo reportado en la literatura, así: *Ralstonia eutropha* 0.5, 1.0 y 1.5 g/l y para *Halomonas boliviensis* 0.3, 0.6 y 1.0 g/l. El inóculo fue preparado en medio TSB para *Ralstonia eutropha* y en el medio de preparación de inóculo reportado por Quillaguaman para *Halomonas boliviensis*, fue cultivado por 14 horas a 30°C, 200 rpm. Luego se centrifugó por 12 minutos a 5000 rpm para obtener la biomasa, la cual fue resuspendida en solución isotónica hasta alcanzar la concentración requerida, ésta fue medida por espectrofotometría haciendo uso de la curva de calibración, de tal manera que la fermentación iniciara con la concentración de inóculo definida.

3.4.2. Evaluación de la fuente de nitrógeno

Este parámetro fue evaluado solo para la *Ralstonia eutropha*, ya que para la *Halomonas boliviensis* se encontró un estudio realizado por Quillaguaman, et al., 2010, en el cual se estudia el efecto de la fuente de nitrógeno utilizada y su concentración, por lo cual para este microorganismo se selecciona la fuente y concentración que reportó mejor rendimiento y productividad. Para la *Ralstonia eutropha* se valoraron tres condiciones: fuente de nitrógeno inorgánica ((NH₄)₂SO₄), orgánica (extracto de levadura) y sin fuente de nitrógeno.

3.4.3 Relación Carbono-Nitrógeno (C/N):

Este parámetro fue evaluado en cuatro niveles (10, 20, 40 y 57) para ambos microorganismos. Este rango fue definido teniendo en cuenta los requerimientos mínimos de Nitrógeno de cada bacteria para su crecimiento y reproducción; y que a su vez el estrés generado en los microorganismos para inducir la acumulación del biopolímero es la limitación de nitrógeno y exceso de carbono. Para este parámetro se tuvieron en cuenta dos variables respuesta: biomasa y PHA producido. (Johnson et al., 2010)ⁱ

3.5 EVALUACIÓN DE LAS FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS

Para evaluar la producción de PHA se utilizaron 3 medios de cultivo, además del utilizado como estándar, entre ellos se encuentra uno sintético y dos no convencionales. En el medio sintético se utilizó como fuente de carbono glicerol puro, con el fin de evaluar la capacidad de los microorganismos de usar este compuesto como nutriente y de esta manera usarlo como estándar para el medio no convencional en el que se usó como fuente de carbono el glicerol residual de la producción de Biodiesel.

Estos tres medios de cultivo evaluados se formularon reemplazando la glucosa por las fuentes de carbono (FC) glicerol puro, glicerol residual e hidrolizado de raquis, de tal manera que se conservó la relación C/N que favoreció la acumulación del PHA en el medio estándar definido para cada microorganismo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en matraz de 250ml; 30°C/200rpm/48h/165ml de cultivo para *Ralstonia eutropha* y en matraz de 500ml; 30°C/200rpm/48h/125ml de cultivo para *Halomonas boliviensis*.

A partir de las concentraciones se determinaron rendimientos sustrato- biomasa: (YXS: g biomasa/g de FC), Productividad de biomasa (Qx: g biomasa/L.h); Productividad de PHA (Qp: mg PHA/L.h).

Para evaluar el efecto de pulsos de fuente de carbono en el proceso de producción del PHA, se realizaron ensayos de 72 horas de producción con dos pulsos de fuente de carbono durante el proceso, el primero a la hora 12 y el segundo a la hora 36, esto con el fin de suministrar a los microorganismos condiciones suficientes para su crecimiento en la primera etapa y luego mantener una relación carbono-nitrógeno que favorezca la acumulación del biopolímero.

3.5.1 Producción de PHA con hidrolizados de raquis de palma:

El raquis de palma utilizado fue suministrado por CENIPALMA, procedente de una planta extractora de aceite de palma (Barrancabermeja- Santander). Este material para su uso como fuente de carbono requirió de pretratamientos como la disminución de tamaño, la remoción de lignina a través del uso de NaOH y la hidrólisis enzimática. Esta última se realizó con las enzimas CTEC y HTEC con una carga enzimática de 15 FPU/gr material pretratado, según lo reportado por Peñuela, 2013.

La producción de PHA con esta fuente de carbono se llevó a cabo utilizando las condiciones definidas con el medio estándar de: concentración de inóculo, fuente de nitrógeno, relación C/N; realizando ensayos sin adición de pulso de fuente de carbono y con adición de pulsos de fuente de carbono. Se realizó seguimiento al crecimiento de biomasa y al consumo de la fuente de carbono, ambas por técnicas colorimétricas, además de verificar de manera cualitativa por medio de tinción con Negro Sudan Black la acumulación del PHA.

3.5.2 Producción de PHA con Glicerol:

Para la producción de PHA usando como fuente de carbono glicerol se utilizó glicerol puro marca Chemi, y glicerol residual del proceso de obtención de Biodiesel de la planta BIOD S.A. (Biodiesel de palma) al cual no se le realizó ningún pretratamiento.

De igual manera, con esta fuente de carbono la producción de PHA se llevó a cabo utilizando las condiciones definidas con el medio estándar de: concentración de inóculo, fuente de nitrógeno, relación C/N; realizando ensayos sin adición de pulso de fuente de carbono y con adición de pulsos de fuente de carbono. Se realizó seguimiento al crecimiento de biomasa y al consumo de la fuente de carbono, ambas por técnicas colorimétricas, además de verificar de manera cualitativa por medio de tinción con Negro Sudan Black la acumulación del PHA.

3.6. EFECTO DEL OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN DE PHB EN BIORREACTOR

Se realizó la producción de PHA a escala de bioreactor de 1L usando las condiciones definidas con el medio estándar y para la mejor combinación fuente de carbono –

microorganismo, con el fin de evaluar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto (DO) en el medio, mediante la evaluación de un Coeficiente Global de Transferencia de Masa (K_{La}) alto y un K_{La} bajo, teniendo como variable respuesta los rendimientos.

Se evaluó la velocidad específica de consumo de oxígeno del microorganismo (*Ralstonia eutropha*) para garantizar el suministro mínimo de este requerimiento y no generar una limitante de este nutriente al microorganismo.

La evaluación del K_{La} se realizó por medio del método dinámico o directo, el cual se basa en un balance de materia en estado no estacionario para el oxígeno, obteniendo el coeficiente de transferencia de oxígeno durante un proceso de fermentación (Alvero, 1998).

3.6.1 Determinación de la Velocidad específica de consumo de oxígeno (Q_{O_2})

La evaluación de la velocidad específica de consumo de oxígeno se realizó en el bioreactor marca Biostat A plus, de capacidad de 1L, se preparó y esterilizó 700ml del medio de cultivo estándar y se inoculó para obtener una concentración de 1g/L. Previamente se había calibrado el electrodo de oxígeno. Luego se inició el suministro de oxígeno hasta saturar el sistema. A partir de ese momento se monitoreó la cantidad de oxígeno disuelto registrada por el panel de control en intervalos de 30 segundos hasta alcanzar un valor casi constante.

3.6.2 Determinación del Coeficiente Global de Transferencia de Masa (K_{La})

El Bioreactor se cargó con 700 ml de agua destilada, fijando las mismas condiciones de trabajo descritas bajo las cuales se realizaron las fermentaciones con *Ralstonia eutropha* 30°C/ pH 6,8 y se variaron las condiciones de agitación y flujo de aire.

Luego de la calibración del sensor de oxígeno el sistema fue saturado, después se suspendió la aireación manualmente y se cambiaron las conexiones neumáticas para introducir nitrógeno e iniciar la desoxigenación del recipiente, de manera paralela se monitoreó la cantidad de oxígeno registrada por el panel de control en intervalos de 30

segundos hasta alcanzar un valor muy cercano a 0%. Posteriormente, se restableció el flujo de aire para permitir que se alcanzara una concentración oxígeno disuelto casi constante y se consignaron los porcentajes de oxígeno durante esta transición en intervalos de tiempo igual a la etapa inicial.

Este procedimiento se llevó a cabo para la combinación de 3 velocidades de agitación diferentes (150, 200 y 300 rpm) con 2 flujos de suministro de aire/nitrógeno (0,5 y 1,0 vvm), realizando así 6 ensayos con las diferentes combinaciones, con el fin de identificar las condiciones que proporcionaran los dos niveles de k_La que se evaluaron (bajo y alto).

3.6.3 Evaluación de la acumulación de biopolímero para cada nivel de K_La definido:

Con la combinación fuente de carbono – microorganismo definida, en este caso Hidrolizado de raquis de palma - *Ralstonia eutropha*, se realizó la fermentación para la obtención de biopolímero con las condiciones encontradas que ofrecen al sistema un k_La bajo y un k_La alto, conservando las condiciones de proceso definidos para este microorganismo, tales como: 30°C/ pH 6,8/ relación C/N 40, se trabajó sin pulso, así que este proceso se llevó a cabo durante 48 horas haciendo un seguimiento en el tiempo tomando muestra cada doce horas, con el fin de evaluar: cantidad de biomasa generada, consumo de glucosa y obtención de biopolímero.

3.7. CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO TIPO PHA

3.7.1 Extracción del PHA:

La extracción del PHA se realizó siguiendo la metodología propuesta por Yu y Chen, 2006. Terminada la fermentación se obtuvo la biomasa por centrifugación a 5000xg durante 12 minutos, se realizó un lavado con agua destilada al pellet obtenido y se resuspendió con un volumen de agua igual al medio de cultivo inicial, luego se esterilizó a 121°C y 1 atm durante 20 minutos. La biomasa se recuperó nuevamente por centrifugación y luego se le realizó una digestión ácida con H₂SO₄ al 0.1 M durante

2 horas a 100°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 10 con NaOH 5N, se centrifugó y se realizó lavado con agua destilada.

Posteriormente se realizó blanqueamiento del pellet obtenido resuspendiéndolo en una solución 2:1 de agua destilada: hipoclorito al 13% v/v durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se centrifugó y se realizó lavado con agua destilada; por último se dejó secar en horno hasta peso constante.

3.7.2 Caracterización del PHA

La caracterización del PHA se realizó por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en un equipo marca Thermo Scientific, referencia Nicdet 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.

Para conocer sus propiedades térmicas se realizó un análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en un rango de temperatura desde -20 °C hasta 200°C aumentando 10 °C/min, luego se enfrió has -50 °C con un decremento de 20 °C/min, en una atmósfera de Nitrógeno.

3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS:

3.8.1. Cuantificación de biomasa:

La concentración de biomasa se determinó por espectrofotometría, mediante la curva de calibración obtenida por la metodología de peso seco para relacionar la absorbancia con la concentración de biomasa mediante una ecuación. (Ver Anexo 1 y 2)

3.8.2. Cuantificación de fuente de carbono:

- **Medición de azúcares reductores:** La determinación de azúcares en la fermentación con hidrolizado de raquis se realizó mediante el método del DNS (Miller, 1959) para cuantificación de azúcares reductores.
- **Cuantificación de glicerol:** La determinación del glicerol, para las fermentaciones realizadas con glicerol puro y glicerol crudo, se realizó por el método colorimétrico reportado por Hae Bok y Demain, 1977, en el cual se forma un complejo coloreado entre el polirol y el reactivo de Nash, el cual se cuantifica por espectrofotometría, haciendo una lectura a 414 nm. (Ver Anexo3)
- **Cuantificación de Glucosa:** El consumo de glucosa, en las fermentaciones con medio estándar y con hidrolizado de raquis, se determinó mediante mediciones en el tiempo de la concentración de glucosa; usando el método de glucosa oxidasa con el kit de Biosistem S.A. Éste es un método colorimétrico en el cual se cuantifica por espectrofotometría, haciendo una lectura a 500 nm.

3.8.3 Identificación y cuantificación del PHA:

Se realizó una verificación cualitativa de la presencia de PHA en el proceso de fermentación mediante tinción con negro Sudan y la cuantificación se hizo por peso seco después de realizada la extracción del biopolímero.

- **Tinción con negro Sudan:** La acumulación del polímero se determinó cualitativamente mediante su observación microscópica. Se realizaron placas en porta objetos donde se tomó un volumen de 5µl de las células, se fijó con calor y se pasó a realizar la metodología de tinción descrita por Burdon, 1946. Se observaron las placas en un microscopio marca Motic modelo BA310 LED en el objetivo de 100X. Para la preparación del colorante se tomaron 0,5 g del colorante y se disolvieron en 50ml de etanol al 70%, posteriormente se calentó en baño María a 50°C, se agitó hasta disolver el colorante y se filtró para retirar los excesos de colorante no disuelto.

4. Resultados y discusión.

4.1. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES INICIALES

Para hacer la evaluación de las fuentes alternativas, previamente se determinaron las mejores condiciones de edad del inóculo y la fuente de nitrógeno que favoreciera la obtención de biomasa.

La tabla 5 presenta los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la concentración inicial de inóculo y el tipo de fuente de nitrógeno, sobre la concentración de biomasa. Respecto a la concentración de inóculo en el rango evaluado se encontró efecto significativo ($p \leq 0,05$), sobre la concentración de biomasa; sin embargo, se observó que la concentración de biomasa alcanzada en cada ensayo fue igual a la concentración inicial más 1,0g/L, es decir, que en cada nivel siempre hubo un crecimiento adicional al inóculo de biomasa, de 1,0g/L en términos concentración de. Esto muestra que en cada ensayo se obtuvo igual cantidad de biomasa, ya que la diferencia radicó básicamente en la concentración de inóculo usada.

Considerando estos resultados anteriores, se seleccionaron como las concentraciones de inóculo para *R. eutropha* y *H. boliviensis* 1 g/L y 0,6 g/L respectivamente, estos valores se seleccionaron con base a lo alcanzable operacionalmente, luego del proceso de concentración de biomasa. Las concentraciones de inóculo definidas se encuentran en el rango de cantidad inicial de biomasa reportada en las referencias bibliográficas consultadas, aclarando que no se encontró un estudio específico acerca de la concentración inicial (Tanadchangsang & Yu, 2012)(Jorge Quillaguamán, Delgado, Mattiasson, & Hatti-Kaul, 2006).

Tabla 5. Efecto de la concentración inicial de inóculo y de la fuente de nitrógeno sobre la producción de Biomasa (ANOVA)

Factor		<i>Ralstonia eutropha</i>		<i>Halomonas boliviensis</i>		
		Valor p	Biomasa máxima (g/L)	Valor p	Biomasa máxima (g/L)	
Inóculo	0,5 (g/L)	9,95 e-08	1,5	0,3 (g/l)	7,32 e-11	1,6
	1,0 (g/L)		2,0	0,6 (g/l)		1,9
	1,5 (g/L)		2,5	0,9 (g/l)		2,2
Fuente de N	Sin N	0,00744	1,5	Se definió de acuerdo a los reportes de la literatura (Quillaguaman, et.al., 2010)		
	(NH ₄) ₂ SO ₄		1,9			
	E. Levadura		1,6			

Respecto al nitrógeno, se encontró diferencia estadísticamente significativa con ($p \leq 0,05$), favoreciendo la fuente inorgánica evaluada ((NH₄)₂SO₄) el crecimiento de *Ralstonia eutropha*. Entre las fuentes de nitrógeno utilizadas se encuentran el Sulfato de Amonio, Nitrato de Amonio, Cloruro de Amonio, Urea y Extracto de Levadura, sin embargo en la búsqueda de disminuir los costos del proceso Khanna & Srivastava, 2005 realizaron un estudio en el cual evaluaron estas fuentes de nitrógeno alcanzando concentraciones de biomasa y PHB de 7.92 y 3.84 g/L, respectivamente, con urea y de 5.80 y 2.26 g/L con Sulfato de Amonio y Extracto de Levadura. Basados en sus resultados Khanna & Srivastava, recomiendan por rendimiento y economía utilizar Urea o Sulfato de Amonio. Otros autores como Campos, Figueiredo, Sousa, & Druzian, 2014 y Tanadchangsaeng & Yu, 2012 han usado como fuente de Nitrógeno Sulfato de Amonio obteniendo valores similares a los reportados en los otros estudios.

4.2. EFECTO DE LA RELACIÓN C/N:

4.2.1. *Ralstonia eutropha*:

La Figura 9 presenta los máximos valores de biomasa alcanzados en las diferentes relaciones C/N evaluadas. Se observa que la relación C/N presenta efecto significativo sobre la cantidad de biomasa que se produce ($p= 1.99e-07$, Anexo 4). Adicionalmente, se estableció que en la relación C/N=40 se obtuvo tanto la mayor biomasa como de biopolímero acumulada.

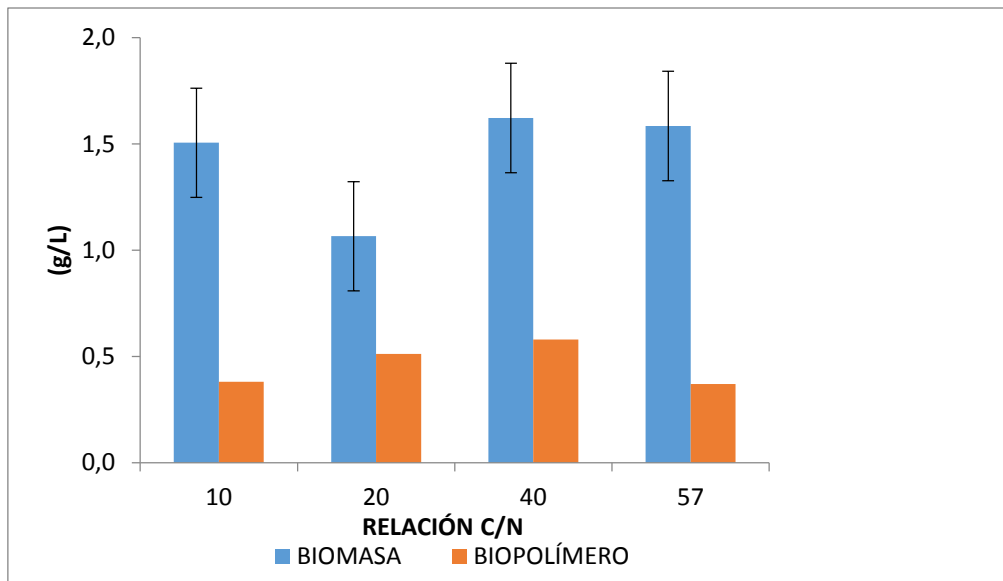


Figura 9. Evaluación relación C/N con *Ralstonia eutropha*

Otros estudios de la influencia de la relación C/N en la obtención de PHB a partir de *Ralstonia eutropha* han encontrado mejores resultados con relaciones por debajo de 40. Huschner et al., 2015, realizó un estudio de la relación C/N en un rango de 4 a 10 Cmol/Nmol en el cual reportó como mejor condición la relación de 10, obteniendo una concentración de PHA de 10,2 g/L.

4.2.2. *Halomonas boliviensis*:

En la Figura 10 se presentan los máximos valores de biomasa alcanzados en las diferentes relaciones C/N evaluadas. Se observa que la relación C/N no presenta efecto significativo sobre la cantidad de biomasa que se produce, en el rango estudiado ($P= 0,571$ Anexo 4 ANOVA). Adicionalmente, se estableció que en la relación C/N=20 se obtuvo la mayor cantidad de biopolímero acumulada.

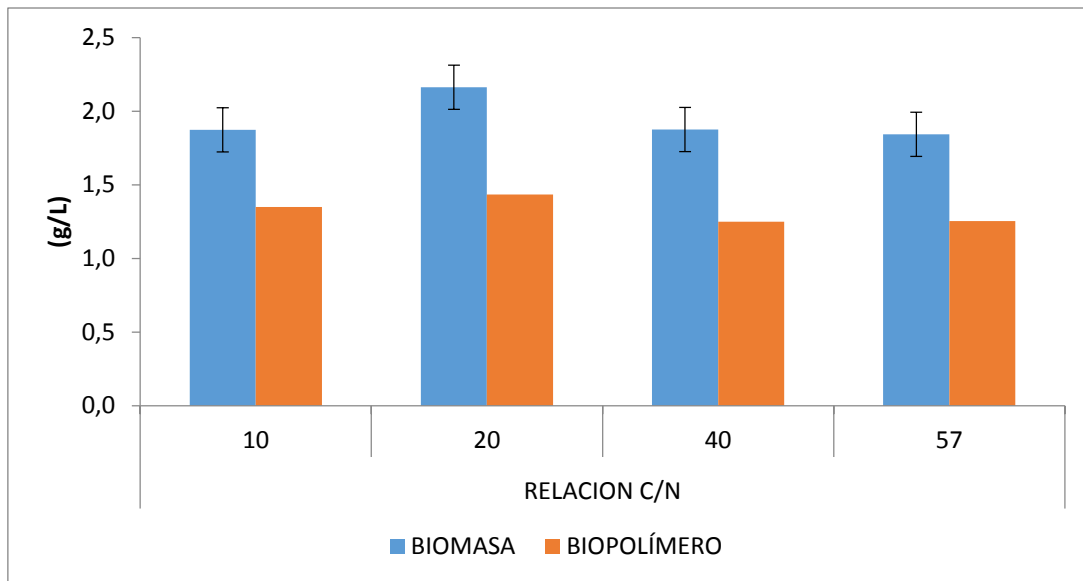


Figura 10. Evaluación relación C/N con *Halomonas boliviensis*

El porcentaje de acumulación de PHA para esta relación corresponde al 66%, lo que está en concordancia con lo reportado por otros autores, donde muestran una capacidad de acumulación de 54% para la *Halomonas boliviensis*. (Jorge Quillaguamán, Muñoz, Mattiasson, & Hatti-Kaul, 2007)

4.3 EVALUACIÓN FUENTES DE CARBONO NO CONVENCIONALES CON *Ralstonia eutropha*:

4.3.1 Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de biomasa:

La Figura 11 presenta el consumo de fuente de carbono y el crecimiento de *Ralstonia eutropha* con las diferentes fuentes de carbono utilizadas: glucosa, hidrolizado de raquis de palma y glicerol puro. Estas cinéticas presentan fermentaciones de 48 horas y 72 horas. Las fermentaciones de 72 horas fueron llevadas a cabo realizando dos pulsos de fuente de carbono, los cuales se hicieron con el fin de verificar si estos pulsos potenciaban la acumulación del biopolímero en la bacteria.

Se puede observar en las gráficas que con las tres fuentes de carbono usadas se obtiene una cantidad de biomasa similar, esto se ve reflejado en los parámetros cinéticos obtenidos: afinidad y velocidad de crecimiento. Para la afinidad se obtuvieron valores en el mismo rango para las tres fuentes de carbono 16.7 (mg/L), 21.8 (mg/L), 22.9 (mg/L), para glicerol, hidrolizado de raquis y glucosa respectivamente. Mientras

que la velocidad de crecimiento si difiere significativamente presentando valores de: $0,0034 \text{ h}^{-1}$, $0,0008 \text{ h}^{-1}$ y $0,025 \text{ h}^{-1}$ en el mismo orden. En el trabajo realizado por Tanadchangsaeng & Yu, 2012, reportan parámetros cinéticos (afinidad y velocidad de crecimiento) para la *Ralstonia eutropha* en glicerol y glucosa, encontrando a diferencia de este trabajo que el microorganismo presenta mayor afinidad por la glucosa que por el glicerol con unos valores de K_s de 80mg/L y 180mg/L respectivamente; y presenta en concordancia con este trabajo que la velocidad de crecimiento es mayor con glucosa que con glicerol, reportando valores para μ de $0,18$ y $0,11 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

En concordancia con esto el glicerol presentó mayor rendimiento de biomasa, alcanzando un valor $0.5 \text{ g biomasa/g sustrato}$, sin embargo con glucosa e hidrolizado raquis se obtuvieron rendimientos más bajos ($0,2$ y $0,17 \text{ g biomasa/g sustrato}$), a pesar de que el microorganismo presentó mayor velocidad de crecimiento con la glucosa como sustrato.

De acuerdo con la velocidad de crecimiento, *Ralstonia eutropha* presenta una afinidad similar por los tres sustratos evaluados, presentando la mayor velocidad de crecimiento con la glucosa y el menor valor menor con el hidrolizado de raquis ($0,025 \text{ h}^{-1}$ y $0,0008 \text{ h}^{-1}$, respectivamente);, en las gráficas a y c se puede observar un crecimiento similar con ambos sustratos, incluso mientras con glucosa ya se encontraba en la fase estacionaria (igual para el glicerol, gráfica e) con el hidrolizado de raquis aún estaba en etapa exponencial. Cabe anotar que al evaluar como fuente de carbono el glicerol residual se presentó un crecimiento muy bajo, con respecto al crecimiento presentado con las otras fuentes de carbono. Lo que hace pensar que este subproducto pueda contener alguno residuo que inhiba el crecimiento del microorganismo (resultados no presentados).

Al realizar los pulsos de fuente de carbono se observa que se presenta poco aumento en la obtención de biomasa, esto porque lo que se esperaba potenciar es la acumulación del biopolímero, sin embargo la productividad con estos pulsos disminuye, lo cual no es favorable para la viabilidad financiera del proceso.

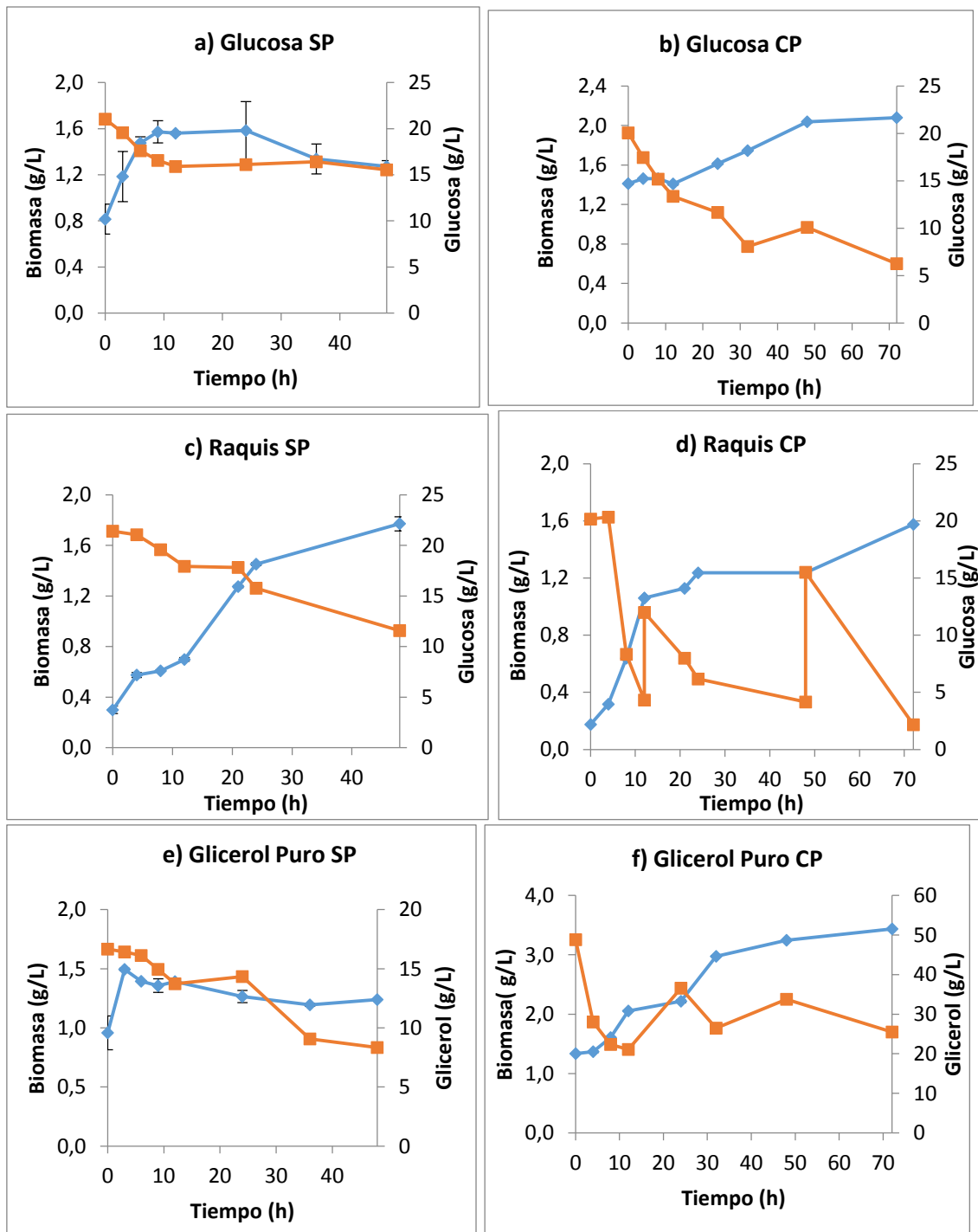


Figura 11. Cinéticas de *Ralstonia eutropha* con las diferentes fuentes de carbono en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP)

4.3.2 Efecto de la fuente de Carbono en la Obtención del Biopolímero:

En la Figura 12 se muestra la concentración obtenida de biopolímero con cada fuente de carbono empleada, además se hace la comparación del resultado obtenido en los

cultivos sin pulso y con pulso. En ella se puede observar que la mayor concentración de biopolímero fue obtenida con la glucosa como fuente de carbono y la menor cantidad con el glicerol residual.

De acuerdo con los valores que se presentan en la Figura 12, se estableció que la concentración de biopolímero obtenido con el glicerol puro es alrededor del 10% del valor logrado con la glucosa, esto muestra que aunque este sustrato tiene mayor afinidad con la *Ralstonia eutropha*, lo que permite un buen crecimiento del microorganismo, este sustrato no favorece la acumulación del biopolímero.

La concentración de biopolímero lograda en el medio con hidrolizado de raquis fue un 73% respecto a la que se alcanzó en el medio estándar con glucosa. Lo cual permite inferir que esta fuente de carbono favorece tanto el crecimiento de la *Ralstonia eutropha* como la acumulación del biopolímero. Este puede ser considerado un buen comportamiento, teniendo en cuenta que la glucosa es pura y la fuente de carbono no convencional no lo es, por lo tanto puede aportar en conseguir que el proceso de obtención del biopolímero sea más económico.

La figura 12 presenta los cultivos que se hicieron con pulso de la fuente de carbono. En esta se observa que los pulsos incrementaron la concentración de biopolímero, excepto con la glucosa. Sin embargo, no logra reflejarse este aumento en la productividad ya que se obtuvieron valores de 0,002 g PHA/Lh, 0,018 g PHA/Lh, 0,025 g PHA/Lh y de 0,008 g PHA/Lh, 0,013 g PHA/Lh y 0,001 g PHA/Lh para el glicerol puro, el hidrolizado de raquis y la glucosa respectivamente, sin pulso y con pulso.

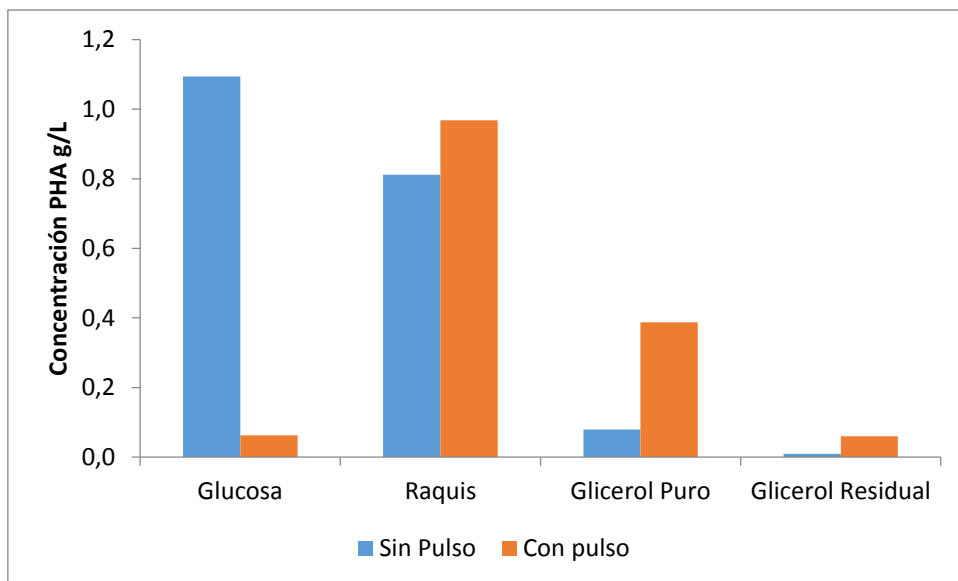


Figura 12. Concentración de Biopolímero obtenido con las diferentes fuentes de carbono empleadas en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP) para *Ralstonia eutropha*

Los resultados muestran que los hidrolizados son una fuente no convencional alternativa a la glucosa. Sin embargo, las productividades en este estudio son más bajas que las reportadas con algunos autores, las cuales alcanzan valores de 1.21, 0.98, 0.53 usando como fuente de carbono glucosa y sin reportar pulsos de fuente de carbono.

4.4 EVALUACIÓN FUENTES DE CARBONO NO CONVENCIONALES CON *Halomonas boliviensis*:

4.4.1 Efecto de la Fuente de Carbono en el Crecimiento de Biomasa:

La figura 13 presenta el consumo de fuente de carbono y el crecimiento de *Halomonas boliviensis* con las diferentes fuentes de carbono utilizadas: glucosa, hidrolizado de raquis de palma, glicerol puro y glicerol residual. Estas cinéticas presentan fermentaciones de 48 horas y 72 horas, éstas últimas llevadas a cabo realizando dos pulsos de fuente de carbono, los cuales se hicieron con el fin de verificar si favorecían la acumulación del biopolímero en la bacteria.

Se puede observar en las gráficas que el glicerol como fuente de carbono favorece más el crecimiento de la *Halomonas boliviensis*, al tener concentraciones de alrededor

de 2,0 y 1,5 g/L para la glucosa y el hidrolizado de raquis respectivamente, mientras para el glicerol puro y residual se alcanzaron concentraciones de alrededor de 3,0 y 3,5 g/L respectivamente.

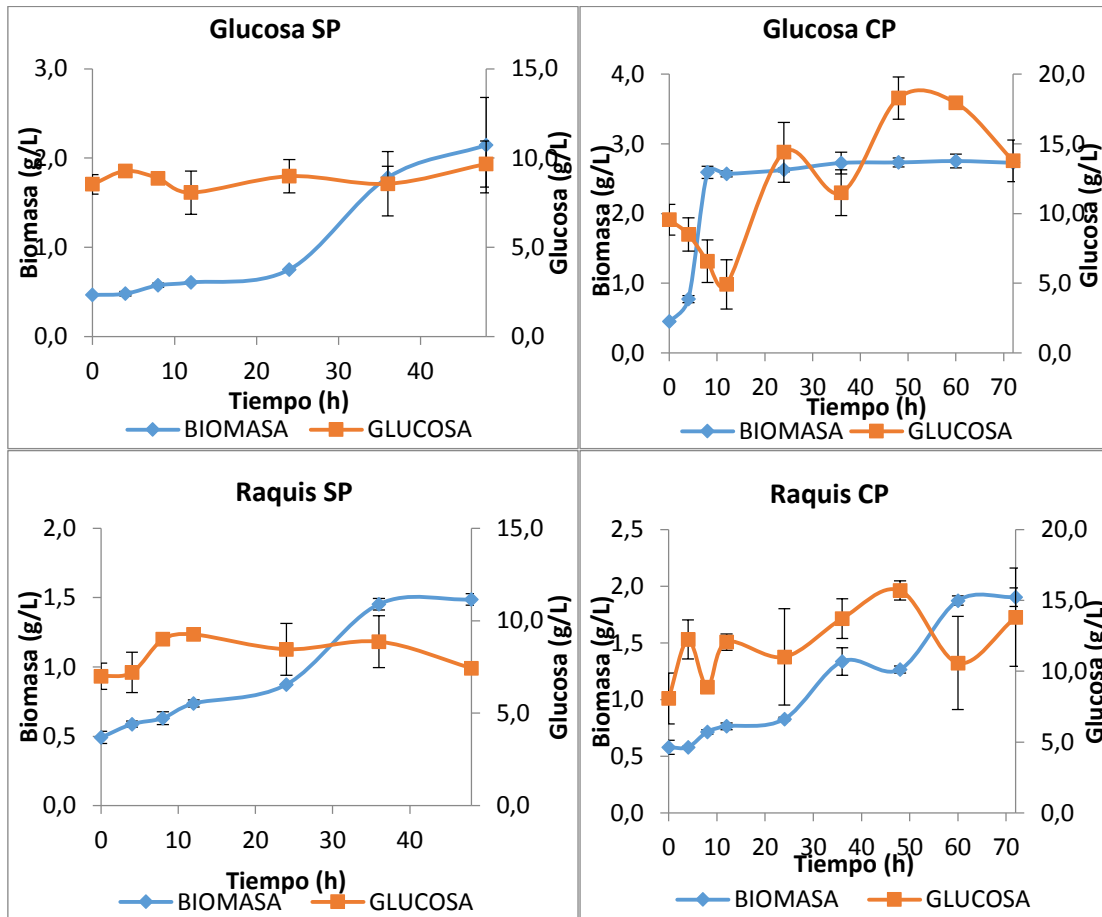
Los resultados anteriores están en concordancia con lo reflejado en los parámetros cinéticos obtenidos: afinidad y velocidad de crecimiento, ya que la *Halomona boliviensis*. presenta mayor afinidad por el glicerol con un valor de K_s de 8,25 mg/L que por la glucosa con un valor de K_s de 9,43 mg/L, aunque ambos son cercanos. A su vez el microorganismo presenta mayor velocidad de crecimiento en glicerol con un valor de μ de 0,1440 h⁻¹ que en glucosa, con un valor de μ de 0,0025 h⁻¹. Esto valida con los rendimientos de biomasa obtenidos que alcanzaron valores de 1,92 y 0,59 g biomasa/g sustrato, para glicerol y glucosa respectivamente.

Entre la glucosa y el hidrolizado de raquis se observa que la glucosa tiene mayor crecimiento de biomasa a pesar que de acuerdo a los parámetros cinéticos la *Halomonas boliviensis*. presenta mayor afinidad y mayor velocidad de crecimiento con el hidrolizado de raquis que con la glucosa, habiendo obtenido unos valores para estos parámetros de K_s 0,98 y μ de 0,042 h⁻¹ para el hidrolizado de raquis, sin embargo se logró un rendimiento de biomasa similar con ambos sustratos (0,48 g biomasa/g sustrato para el hidrolizado de raquis).

Es importante resaltar que al evaluar como fuente de carbono el glicerol residual se presentó el mayor crecimiento de biomasa, totalmente diferente a lo obtenido al evaluar esta fuente de carbono con la *Ralstonia eutropha*. En este caso se puede decir que ambas fuentes de carbono no convencionales favorecen el crecimiento de la *Halomona boliviensis*.

Al realizar los pulsos de fuente de carbono se observó (Figura 13) que se presenta poco aumento en la obtención de biomasa, pues lo que se busca con esta estrategia es que se presente aumento en la cantidad de biopolímero acumulado. Teniendo en cuenta que el microorganismo tiene un requerimiento mínimo de Nitrógeno para su crecimiento, es necesario que al inicio de la fermentación el medio suministre esta condición al microorganismo, sin embargo el estrés para que se empiece a acumular el biopolímero se genera cuando hay limitación de Nitrógeno y exceso de Carbono, por

esta razón algunos autores han presentado como opción para lograr estas condiciones, suministrar al inicio de la fermentación el requerimiento mínimo de Nitrógeno y luego de un tiempo cuando se ha consumido gran parte de la fuente de carbono un pulso adicionando más carbono (Tanadchangsaeng & Yu, 2012).



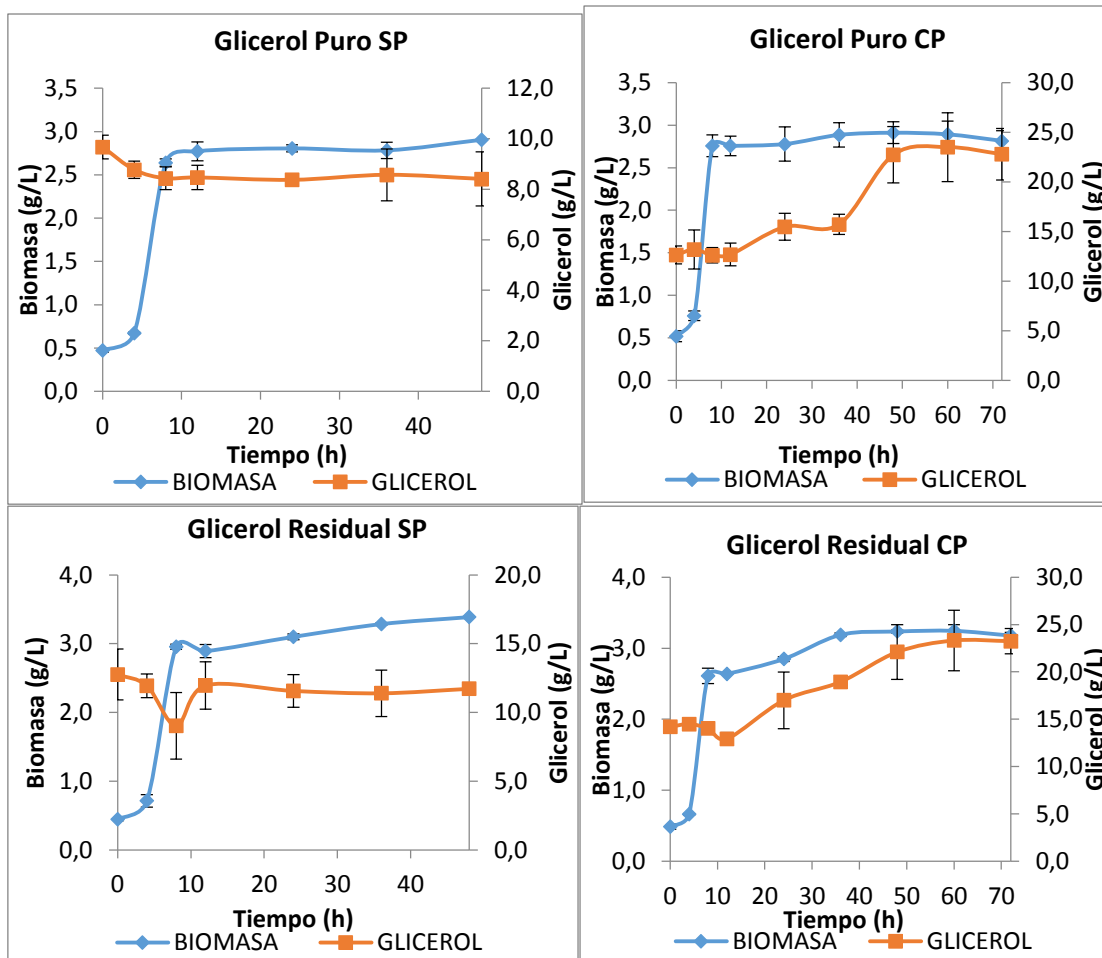


Figura 13. Cinéticas de *Halomonas boliviensis* con las diferentes fuentes de carbono en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP)

4.4.2 Efecto de la fuente de Carbono en la Obtención del Biopolímero:

En la Figura 14 se muestra la concentración obtenida de biopolímero con cada fuente de carbono empleada, además se hace la comparación del resultado obtenido en los cultivos sin pulso y con pulso. En ella se puede observar que la mayor concentración de biopolímero fue obtenida con la glucosa como fuente de carbono, alcanzando un valor de 1,4 g PHA/L, mientras con las demás se alcanzó la misma concentración de biopolímero, alrededor de 0,9 g PHA/L.

A pesar de que se obtuvo mayor cantidad de biomasa usando como fuente de carbono el glicerol, con éste, no se obtuvo la mayor concentración de biopolímero. Por esta razón se puede decir que la glucosa favorece más la acumulación de biopolímero en la *Halomonas boliviensis* que el glicerol. Esto se verifica con las fuentes de carbono no convencionales, pues aunque con ambas se alcanzó la misma concentración de

biopolímero, con el glicerol residual se obtuvo mayor cantidad de biomasa que con el hidrolizado de raquis. De acuerdo con los estudios realizados con *Halomonas boliviensis*, se puede encontrar en concordancia con lo encontrado en este trabajo que este microorganismo presenta mayor crecimiento y mayor acumulación de biopolímero con azúcares como fuente de carbono. (Jorge Quillaguamán et al., 2008)(J Quillaguamán et al., 2005). En el trabajo reportado por Kawata & Aiba, 2010, aislaron una bacteria desde glicerol residual, la cual al estudiarla concordó con la familia de la Halomonas, lo que permite inferir que es capaz de crecer en este medio y de acumular algún tipo de PHAs, lo que fue validado en el estudio, aunque con una baja productividad.

Al realizar la fermentación con pulsos de la fuente de carbono, se puede observar en la Figura 14 que hubo un aumento en la concentración de biopolímero obtenido con las fuentes de carbono no convencionales, mientras que con las fuentes de carbono tradicionales ocurrió lo contrario. Sin embargo, en el caso que se presentó un aumento, éste fue muy bajo, lo que se puede verificar con las productividades obtenidas que fueron de: 0,027 g PHA/L*h, 0,020 g PHA/L*h, 0,030 g PHA/L*h y de 0,001 g PHA/L*h, 0,017 g PHA/Lh y 0,018 g PHA/Lh para el glicerol puro, el hidrolizado de raquis y la glucosa respectivamente, sin pulso y con pulso.

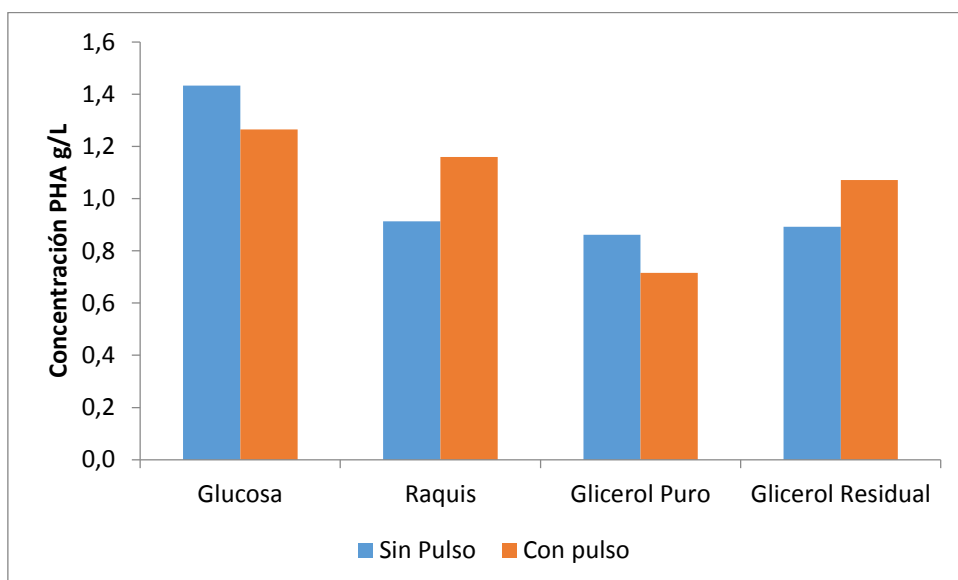


Figura 14. Concentración de Biopolímero obtenido con las diferentes fuentes de carbono empleadas en cultivos sin pulso (SP) y con pulsos (CP) para *Halomonas boliviensis*

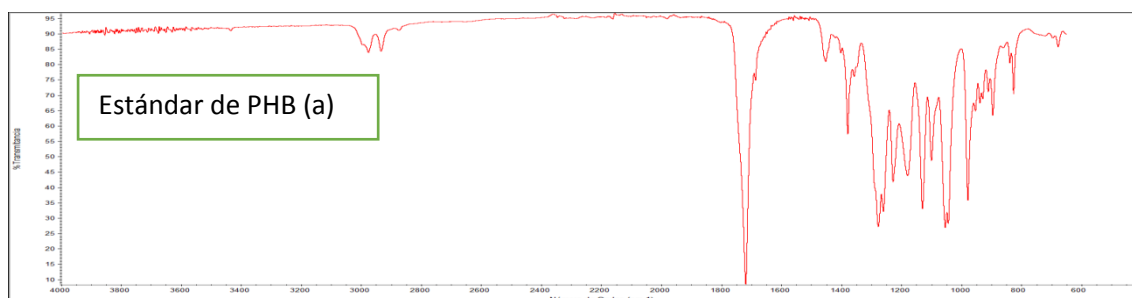
Con la *Halomonas boliviensis* autores como Quillaguamán et al., 2008, han reportado productividades de alrededor de 1,1 g/Lh, con lo que se muestra que en este trabajo se lograron productividades muy bajas, alrededor de 0,03 g/Lh. Sin embargo se logró mostrar que este microorganismo puede producir biopolímeros tipo PHA con las dos fuentes de carbono empleadas, el cual era el objetivo de este trabajo.

4.5 CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO TIPO PHA

4.5.1 Análisis de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR):

La Figura 15 de la b) a la e), presenta los espectros infrarrojo de las muestras extraídas luego del cultivo de *Ralstonia eutropha* con las diferentes fuentes de carbono. En comparación con el espectro del estándar Figura 15 a, este biopolímero presenta bandas características a los 1725 cm^{-1} que representa el enlace éster y a los 2950 cm^{-1} que indica la presencia de los grupos alifáticos CH_3 y CH_2 . Estas bandas también se identifican en la Figura 16 de la a) a la d), donde se muestran los espectros infrarrojo de las muestras de biopolímero obtenidos a partir de la fermentación de la *Halomonas boliviensis* con las diferentes fuentes de carbono.

Sin embargo el biopolímero obtenido con la *Halomonas boliviensis* presenta otros picos diferentes a los del estándar, lo que hace pensar en la posibilidad de que el material obtenido sea un tipo de biopolímero diferente al PHB.



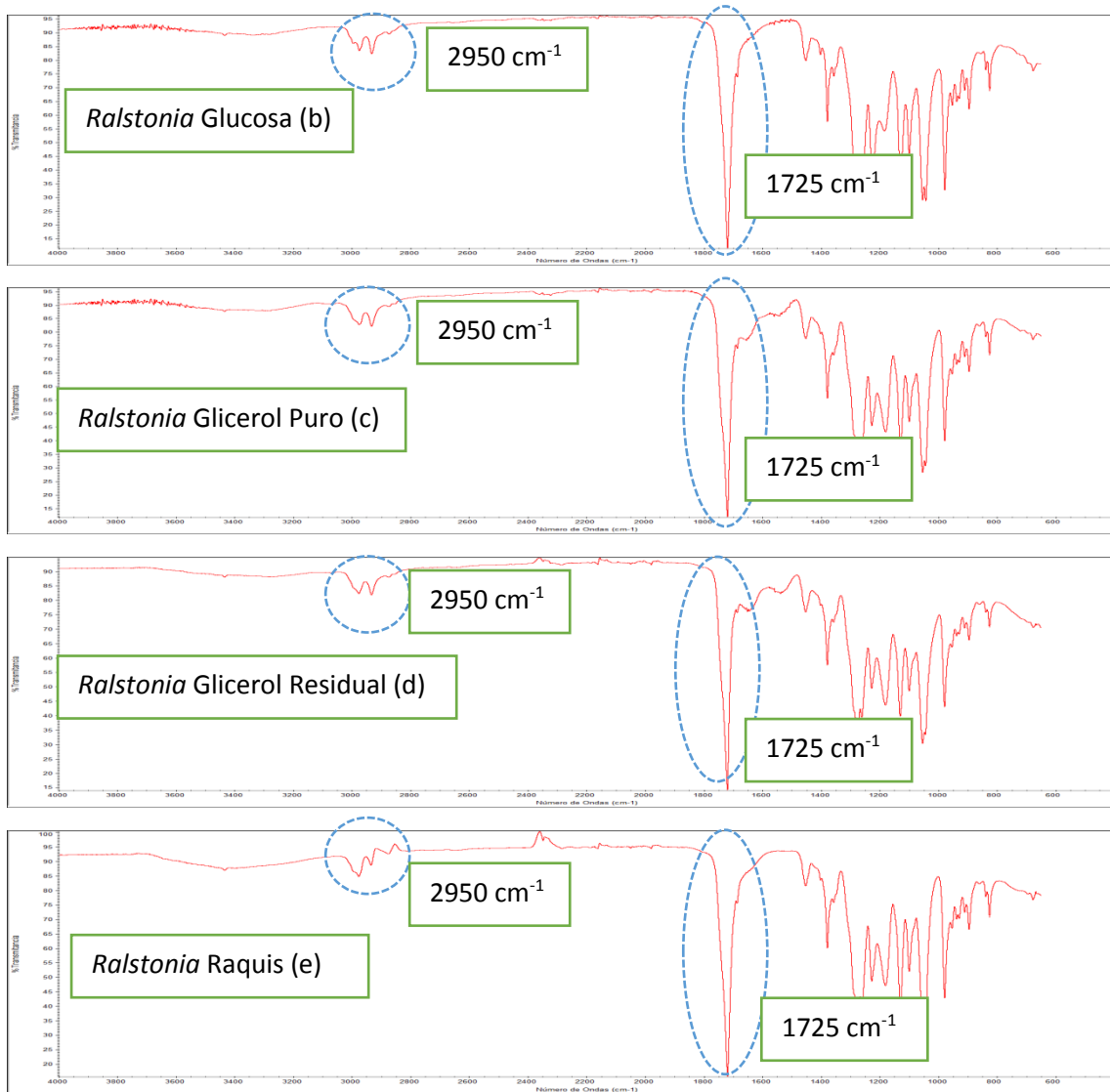
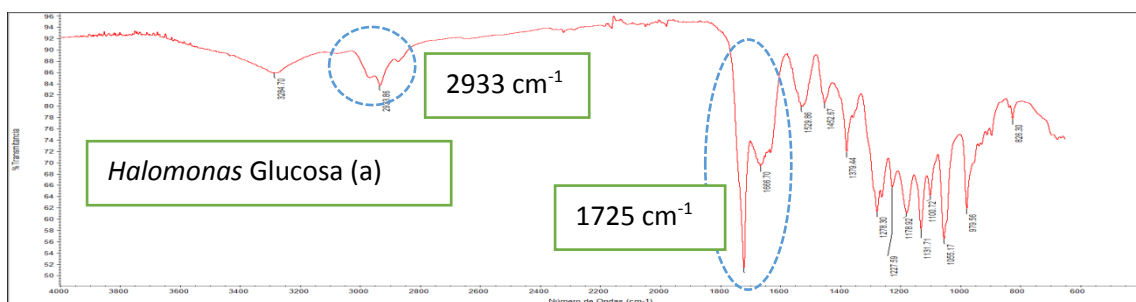


Figura 15. Infrarojos obtenidos con la *Ralstonia eutropha* con las diferentes fuentes de carbono.



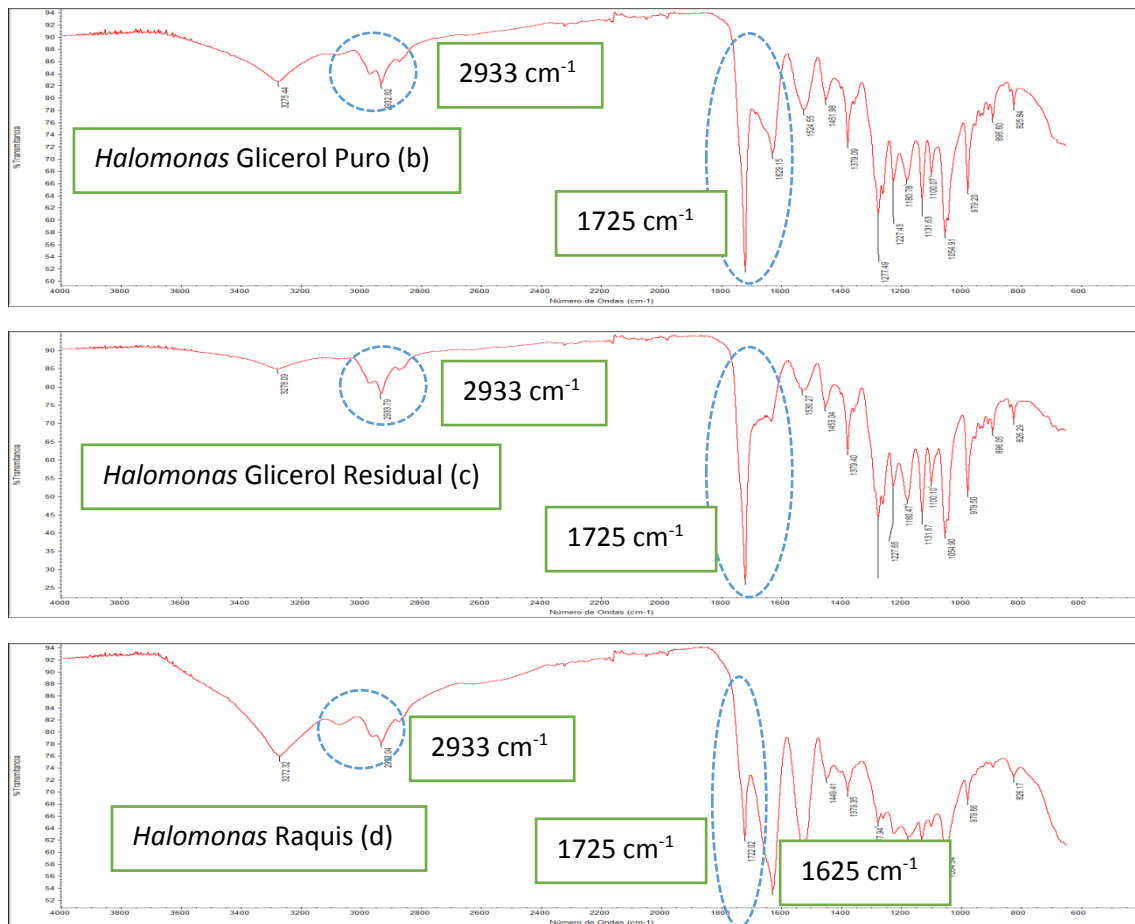


Figura 16. Espectro Infrarojo obtenidos con la *Halomonas boliviensis* en diferentes fuentes de carbono.

4.5.2 Análisis térmico (DSC):

El resumen de las propiedades térmicas del material obtenido se presenta en la tabla 6 y los termogramas obtenidos se presentan en el Anexo 6. Con estos resultados se confirma que con la *Ralstonia eutropha* el material obtenido fue PHB, mientras que con la *Halomonas boliviensis* no se obtuvieron valores en el rango del PHB para la temperatura de fusión y las temperaturas de transición vítrea y de cristalización no se lograron identificar en los termogramas. Los valores más cercanos al PHB comercial fueron los encontrados para el PHB obtenido por la *Ralstonia eutropha* usando como fuente de carbono el hidrolizado de raquis.

Tabla 6. Propiedades Térmicas del Biopolímero

Polímero	T _m (°C)	T _g (°C)	T _{cc} (°C)	ΔH _m (J/g)	X _c (%)
PHB (<i>Ralstonia</i> – Raquis)	169	3,7	46	87	60
PHB (<i>Ralstonia</i> – Glucosa)	167	-10,8	40	49	34
PHB (<i>Halomonas</i> - Raquis)**	100	—	—	—	—
PHB (<i>Halomonas</i> – Glucosa)**	100	—	—	—	—
PHB Comercial*	175,4	3,5	48	99	68

*(Tanadchangsaeng & Yu, 2012), ** Los otros valores no se leen en el termograma bajo el mismo método.

4.6 EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO EN LA PRODUCCIÓN DE PHB EN BIORREACTOR

Para el trabajo en el biorreactor se definió la combinación microorganismo – sustrato a trabajar teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las diferentes cinéticas (rendimiento y productividad) y la caracterización del material obtenido en cada uno de los ensayos. Según los valores reportados en los numerales 4.3 y 4.4 se puede inferir que la combinación que más favorece la acumulación del biopolímero es *Ralstonia eutropha*-hidrolizado de raquis. Además el material obtenido con esta combinación microorganismo – sustrato presentó propiedades térmicas más cercanas a las del PHB comercial. Por estas razones y teniendo en cuenta que de acuerdo a lo reportado en la literatura aún se puede conseguir un mayor porcentaje de acumulación con la *Ralstonia*, se evaluó a nivel de biorreactor *Ralstonia eutropha* en hidrolizado de raquis.

4.6.1 Definición de parámetros para el trabajo en el biorreactor:

La velocidad específica de consumo de oxígeno que se encontró para *Ralstonia eutropha* $Q_{O_2} = 0,8813 \frac{mmolO_2}{g \text{ Biomasa} \cdot h}$ fue establecida realizando el seguimiento de la variación de oxígeno disuelto en un ensayo con el medio estándar.

Los valores de $K_L a$ y flujo de oxígeno suministrado para cada uno de los ensayos realizados con las diferentes combinaciones de agitación y flujo de aire se reportan en

la tabla 7, las gráficas obtenidas en los ensayos y mediante las cuales se realizaron los cálculos para conseguir estos datos se presentan en el anexo 5.

Tabla 7. Valores de K_{La} para los diferentes ensayos realizados

Agitación (rpm)	Flujo (vvm)	$K_{La}(h^{-1})$	N_{LaX} (mmol O_2/h)
150	0,5	0,36	1,74
150	1,0	0,72	3,48
200	0,5	0,36	1,74
200	1,0	0,72	3,48
300	0,5	5,04	24,34
300	1,0	7,92	38,25

Como K_{La} bajo se seleccionó el obtenido con las condiciones de 150 rpm y 0,5 vvm, ya que suministra una cantidad de O_2 muy cercana a los requerimientos nutricionales del microorganismo. Como K_{La} alto se escogió el de 7,92 (h^{-1}) obtenido a las condiciones de 300 rpm y 1,0 vvm. Con cada una de estas condiciones se evaluó la capacidad de acumulación del microorganismo.

4.6.2 Cinéticas con las condiciones de Oxígeno seleccionadas:

Como se observa en la Figura 17, se presenta un consumo completo de la fuente de carbono suministrada con ambas condiciones de oxígeno disuelto. Para la condición de K_{La} bajo se presenta un crecimiento de biomasa durante todo el tiempo de la fermentación, llegando a una concentración de 5 g/l y obteniendo una cantidad total de 0,4987 g de biopolímero, mientras con las condiciones para el K_{La} alto se alcanzó un valor máximo de concentración de biomasa de 6,1g/L a la hora 24 de fermentación, para luego presentar una disminución llegando a una concentración de 4,2 g/L de biomasa y obteniendo una cantidad total de 0,6998 g de biopolímero.

De acuerdo a las cinéticas presentadas se puede decir que el K_{La} alto fue la condición que más favoreció la acumulación del biopolímero. A pesar que con ambas

condiciones hubo un consumo total de la fuente de carbono se puede observar que con el K_{La} bajo siempre se presentó aumento en la biomasa, mientras que con el K_{La} alto a partir de la hora 24 no hubo aumento en la biomasa pero si se continuó consumiendo la fuente de carbono lo que permite inferir que el microorganismo lo usaba para acumulación de biopolímero. Esto se ve reflejado en el hecho de que con el K_{La} alto se obtuvo mayor cantidad de biopolímero a pesar de que la cantidad de biomasa al final de la fermentación fue menor que la biomasa obtenida con el K_{La} bajo.

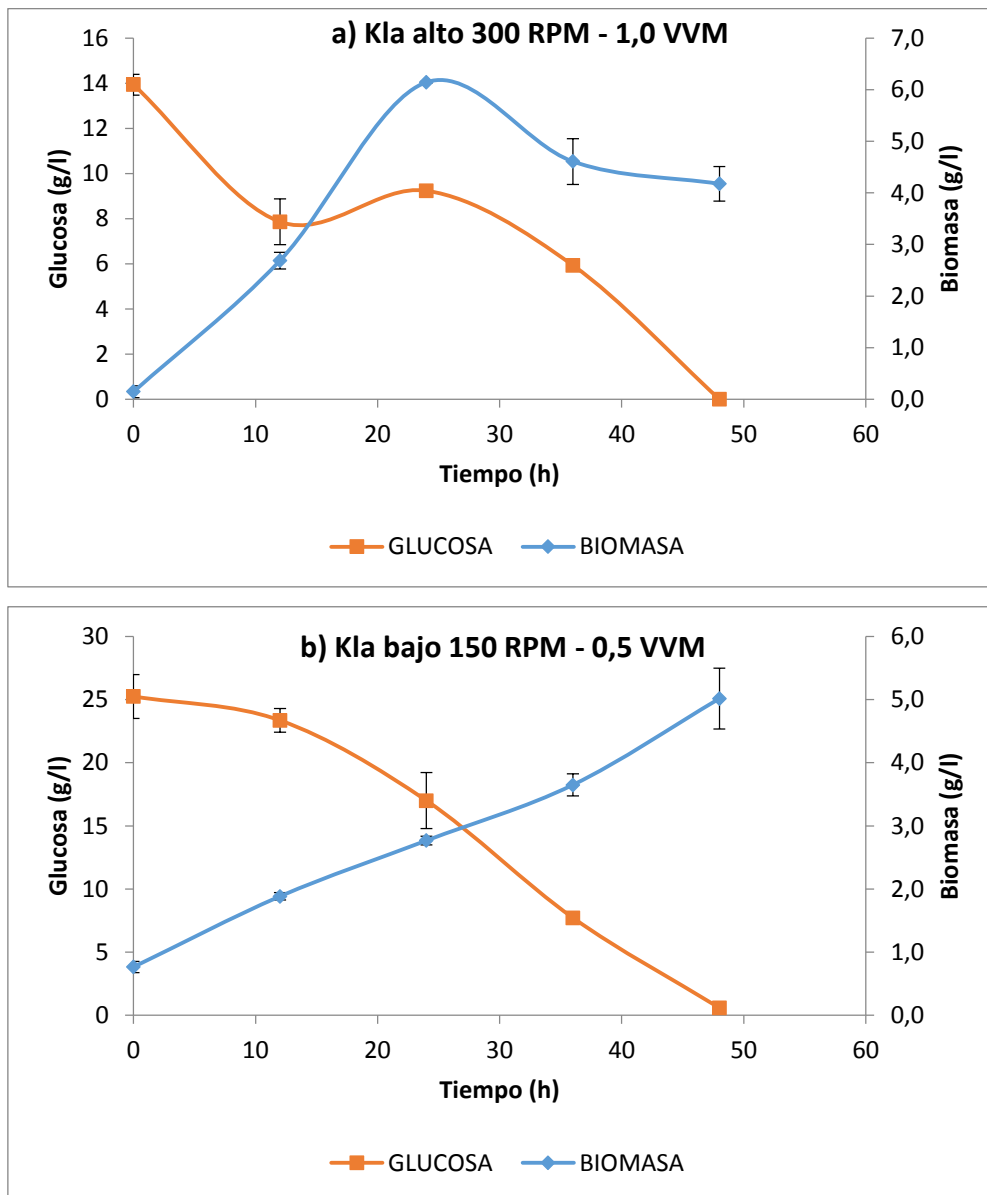


Figura 17. Cinéticas de crecimiento *Ralstonia eutropha* en bioreactor con fuente de carbono hidrolizado de raquis para un K_{La} alto: 300 RPM - 1,0 VVM y K_{La} bajo: 150 RPM - 0,5 VVM

Conclusiones

Las dos bacterias evaluadas en este estudio, *Ralstonia eutropha* y *Halomonas boliviensis*, presentaron buena capacidad para crecer y acumular biopolímero tipo PHA, al ser cultivadas sobre las fuentes de carbono no convencionales glicerol residual e hidrolizado de raquis de palma.

La mejor combinación de fuente de carbono – microorganismo, teniendo en cuenta los parámetros cinéticos, rendimientos, productividad y propiedades térmicas del material logrado se presentó con *Ralstonia eutropha* cultivada sobre hidrolizados de raquis.

Las propiedades logradas del biopolímero permitieron establecer que el tipo de PHA obtenido es el Polihidroxiburato (PHB).

El PHB que se obtuvo con *Ralstonia eutropha* en hidrolizados de raquis de palma, presentó propiedades térmicas similares a las del biopolímero comercial PHB. Por lo tanto, este sustrato se constituye en una buena fuente no convencional para la obtención de PHB.

Recomendaciones

Hacer un estudio más detallado que permita mejorar los rendimientos para la obtención PHB en hidrolizados de raquis de palma.

Realizar una valoración técnico-económica para establecer la viabilidad de producción de PHB a una escala mayor, considerando para ello una aplicación que permita darle un mayor valor agregado.

Bibliografía

- Acosta, H. A. (2007). Biodegradables biopolymers naturales used in biodegradable, (4), 5–13.
- Bugnicourt, E. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <http://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Campos, M. I., Figueiredo, T. V. B., Sousa, L. S., & Druzian, J. I. (2014). The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial Crops and Products*, 52, 338–346. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.008>
- Carvalho, C. C. C. R. De. (2012). Adaptation of *Cupriavidus necator* to conditions favoring polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Biotechnology*, 164(2), 309–317. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.009>
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–32. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
- Corre, Y.-M., Bruzaud, S., Audic, J.-L., & Grohens, Y. (2012). Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. *Polymer Testing*, 31(2), 226–235. <http://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.11.002>
- Fedepalma. (2012). *Anuario estadístico: La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo* (Edición Ge). Bogotá. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Anuario+Estadístico#0>
- Fedepalma. (2015). *Minianuario Estadístico 2015*.
- Federico, C. (2011). *Producción de Poliésteres Biopoliméricos (PHAs) desde Alpeorajo por Medio de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno*.
- Franz, A., Song, H.-S., Ramkrishna, D., & Kienle, A. (2011). Experimental and theoretical analysis of poly(β -hydroxybutyrate) formation and consumption in *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*, 55(1), 49–58. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2011.03.006>
- González, Y., Meza, J. C., González, O., & Córdova, J. A. (2013). Síntesis y Biodegradación de Polihidroxialcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77–115.
- Huschner, F., Grousseau, E., Brigham, C. J., Plassmeier, J., Popovic, M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2015). Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. *Process Biochemistry*, 50(2), 165–172. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.004>

- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S., & Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>
- 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), 2141–52. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.031>
- Kawata, Y., & Aiba, S. (2010). Poly(3-hydroxybutyrate) Production by Isolated Halomonas sp. KM-1 Using Waste Glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(1), 175–177. <http://doi.org/10.1271/bbb.90459>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*, 40, 2173–2182. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria ? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, 14(November), 431–438.
- Naranjo, J. M., Posada, J. a, Higueta, J. C., & Cardona, C. a. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: the PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 133, 38–44. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.129>
- Posada, J. a., Naranjo, J. M., López, J. a., Higueta, J. C., & Cardona, C. a. (2011). Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, 46(1), 310–317. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.003>
- Peñuela, M., (2013). Productos de valor agregado a partir de fibra y raquis de palma de aceite. Informe Final Grupo de Bioprocesos UdeA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
- Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2006). Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 148–154. <http://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), 227–32. <http://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), 1687–96. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2397-6>
- Quillaguamán, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2005). Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied*

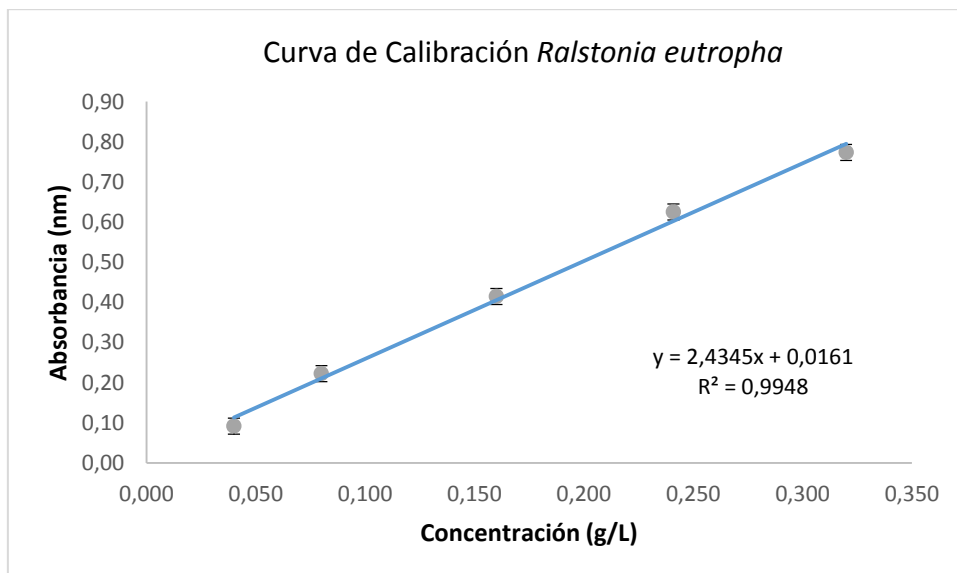
- Microbiology*, 99(1), 151–7. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02589.x>
- Quillaguamán, J., Muñoz, M., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2007). Optimizing conditions for poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 981–6. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0754-2>
- Reinosa Pulido, D. C. (2009). Costos de producción en el proceso de extracción de aceite de palma: Estudio de un caso. *Revista Venezolana de Gerencia*, 46(14), 228 – 247. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84928776364&partnerID=tZOtx3y1>
- Shen, L., Haufe, J., Patel, M. K., & Science, G. (2009). Product overview and market projection of emerging bio-based plastics, (June).
- Tan, L., Yu, Y., Li, X., Zhao, J., Qu, Y., Choo, Y. M., & Loh, S. K. (2013). Pretreatment of empty fruit bunch from oil palm for fuel ethanol production and proposed biorefinery process. *Bioresource Technology*, 135, 275–282. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.134>
- Tanadchangsang, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2808–18. <http://doi.org/10.1002/bit.24546>
- 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*, 104(2), 420–8. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x>
- Vivas Castaño, A. M. (2010). *Estudio y obtención de biodiesel a partir de residuos grasos de origen bovino*.
- Yu J, Chen LXL. Cost Effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mas. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22:547-553.

ANEXOS

ANEXO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA *Ralstonia eutropha*.

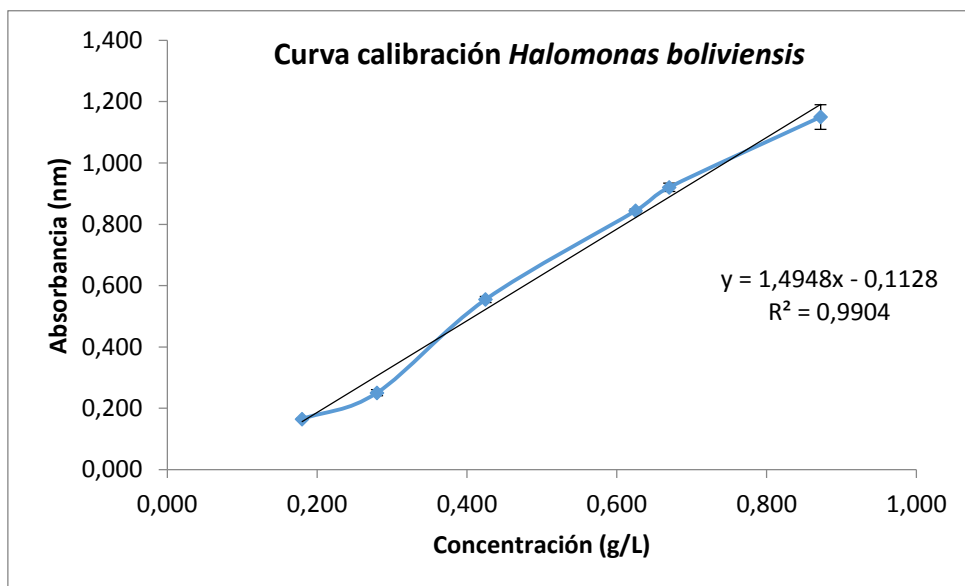
Para realizar la curva de calibración para cuantificar concentración de biomasa del microorganismo se partió de una solución madre con una absorbancia mayor a uno, luego a partir de ella se prepararon 5 soluciones con diferentes concentraciones de biomasa y volumen total de 25 ml para filtrar. Se leyó absorbancia a 600 nm.

Para realizar el proceso de filtrado de cada solución previamente los filtros estaban secados y pesados, luego el filtro con la biomasa se dejó secar en estufa hasta peso seco. Se graficó absorbancia vs peso seco de biomasa.



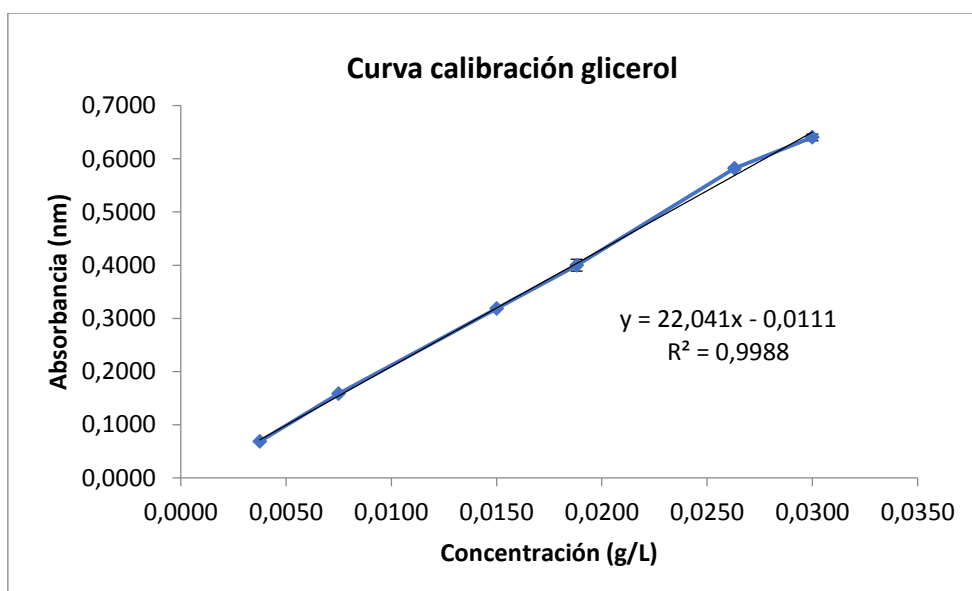
ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA *Halomonas boliviensis*.

Para realizar esta curva de calibración se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito para la obtención de la curva de calibración para la *Ralstonia eutropha*.



ANEXO 3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA MEDICIÓN DE GLICEROL.

La cuantificación del glicerol se realizó con el método reportado por Hae Bok y Demain, 1977 en el artículo "An improvement colorimetric Assay for Polyols". Éste se basa en la oxidación de alditoles a formaldehído por el peryodato ácido, y uso de L-Ramnosa para reducir el exceso de peryodato. El procedimiento consiste en adicionar a la muestra 1ml de peryodato, luego de 10 minutos se adiciona la L-Ramnosa y el reactivo de Nash. Para que se dé la reacción se calienta por 15 minutos y después de enfriar se puede leer la absorbancia a 412 nm.



ANEXO 4. ANOVAS DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA PRODUCCIÓN

Tabla #. Anova [Inóculo-Biomasa] *Ralstonia eutropha*

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	9	2.905	0.323	3.625	0.00391 **
Inóculo	1	4.398	4.398	49.383	9.95e-08 ***
Residuals	29	2.583	0.089		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Tabla #. Anova [Inóculo-Biomasa] *Halomonas boliviensis*

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	7	13.978	1.997	23.57	5.39e-12 ***
Inóculo	2	7.776	3.888	45.89	7.32e-11 ***
Residuals	38	3.219	0.085		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Tabla #. Anova [Fuente de N-Biomasa] *Ralstonia eutropha*

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	6	5.009	0.8348	10.145	2.34e-06***
Fuente de N	2	0.939	0.4696	5.707	0.00744**
Residuals	33	2.716	0.0823		
Signif codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Tabla #. Anova [Relación C/N] *Ralstonia eutropha*

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	6	1.419	0.2364	4.303	0.0016**
Relación C/N	3	2.725	0.9085	16.532	1.99e-07***
Residuals	46	2.528	0.0550		
Signif codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

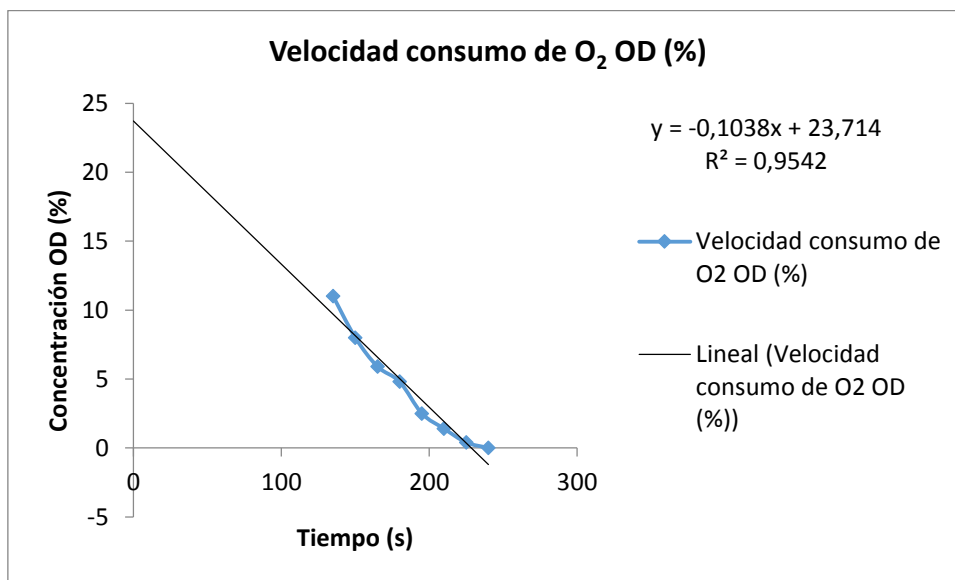
Tabla #. Anova [Relación C/N] *Halomonas boliviensis*

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	6	19.157	3.193	233.755	<2e-16 ***
Relación CN	3	0.028	0.009	0.676	0.571
Residuals	46	0.628	0.014		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

ANEXO 5. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO DE LA *RALSTONIA* Y DEL COEFICIENTE GLOBAL DE TRANSFERENCIA DE MASA K_{La} .

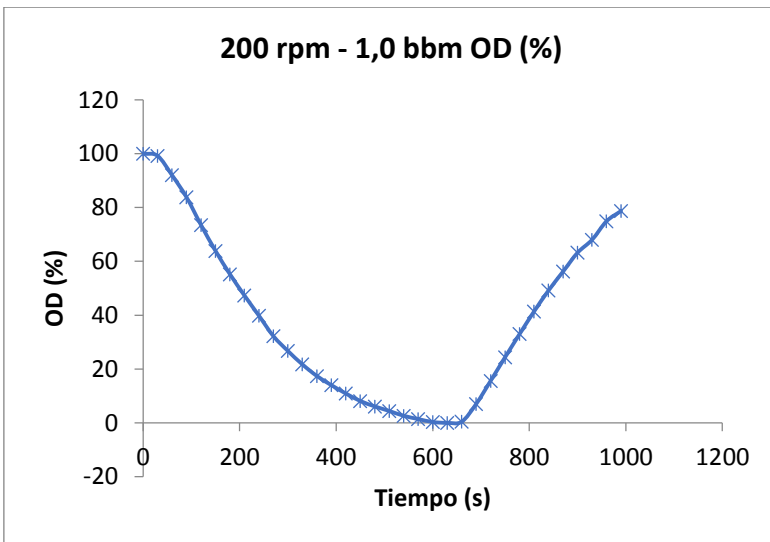
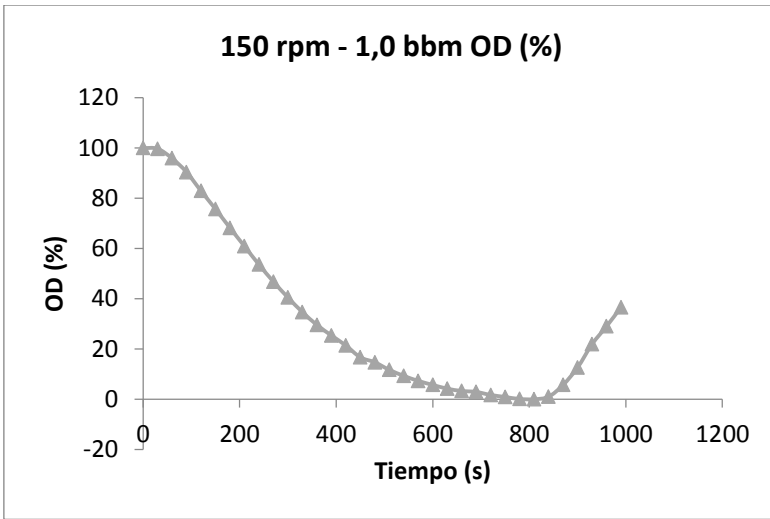
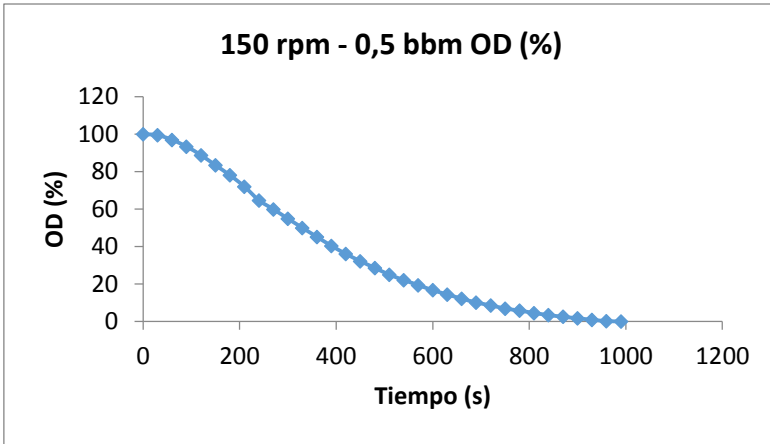
- Velocidad específica de consumo de oxígeno de la *Ralstonia eutropha*:

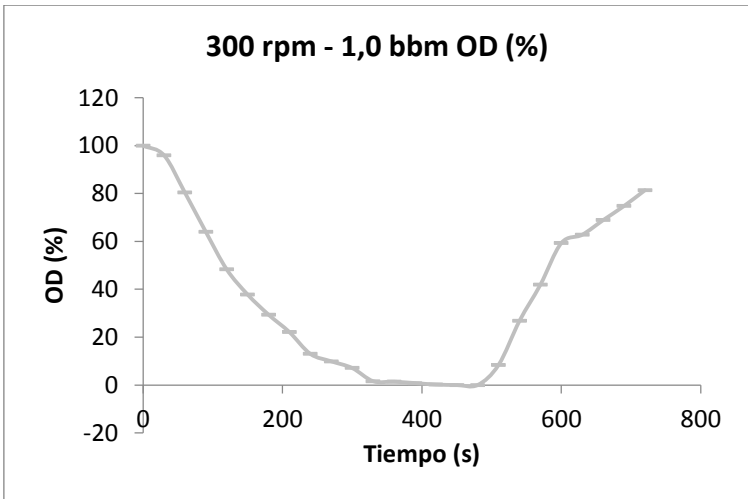
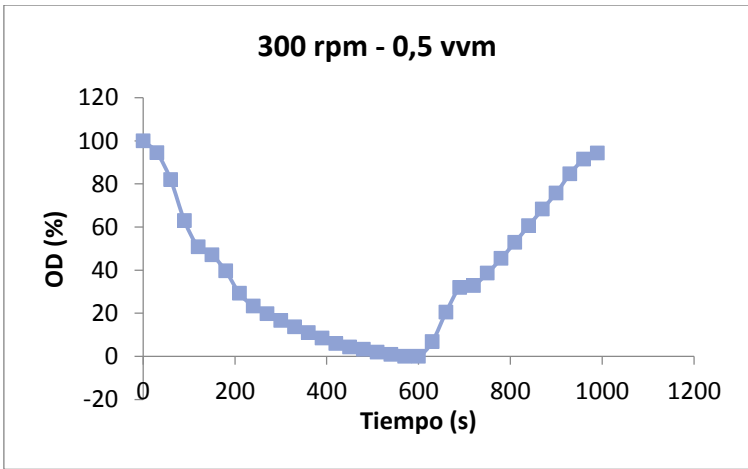
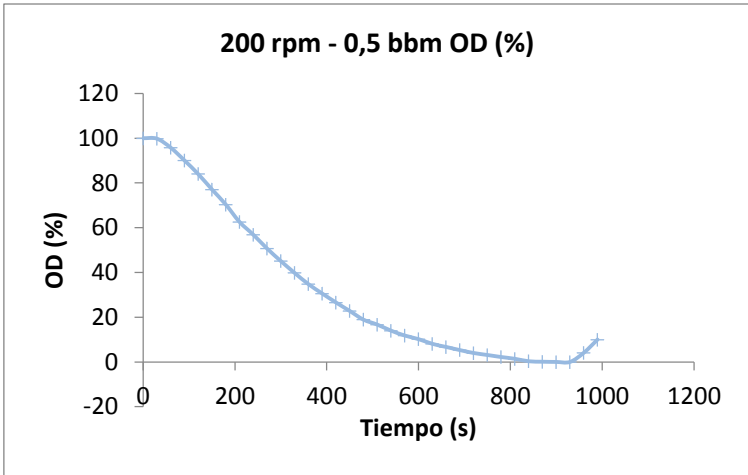
En la gráfica se presentan los valores del Oxígeno Disuelto en función del tiempo obtenidos para el ensayo realizado en el bioreactor de tanque agitado de 1L, cuando luego de saturar el recipiente con aire, se interrumpió este flujo y se observó la disminución sustancial de la concentración solo por la presencia del microorganismo.



- Coeficiente Global de Transferencia de Masa:

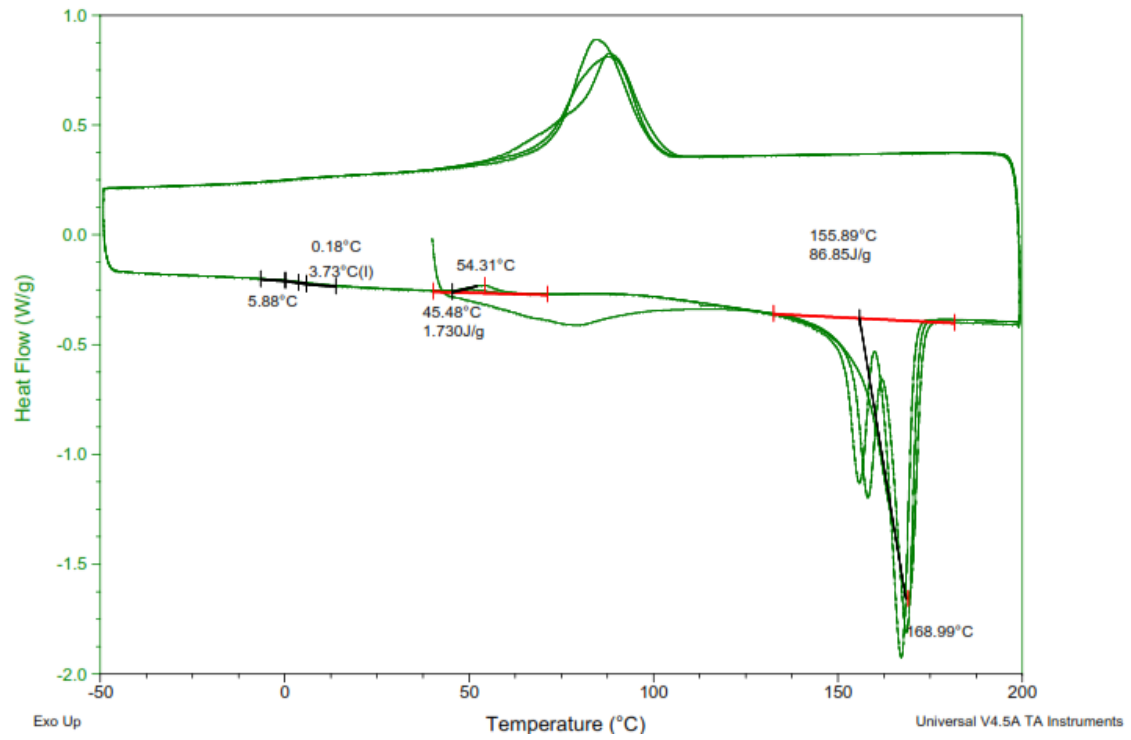
Para la determinación del coeficiente global de transferencia de masa del reactor, se aplicó nuevamente el método dinámico, para determinar la capacidad del reactor para suplir la demanda calculada de la *Ralstonia eutropha*. Se realizaron 6 ensayos con diferentes combinaciones de agitación y flujo de aire suministrado, obteniendo las siguientes gráficas:



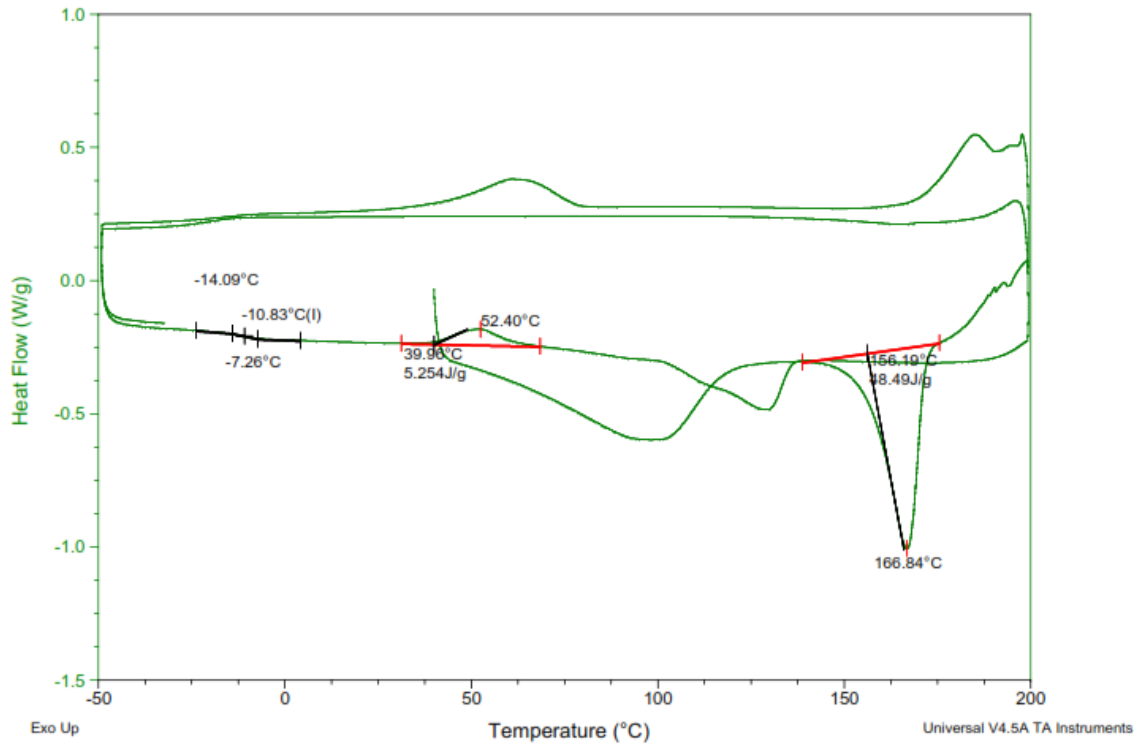


A partir de las gráficas obtenidas usando las ecuaciones del método dinámico se linealizó para obtener el valor de $k_L a$ para cada condición de oxígeno empleada.

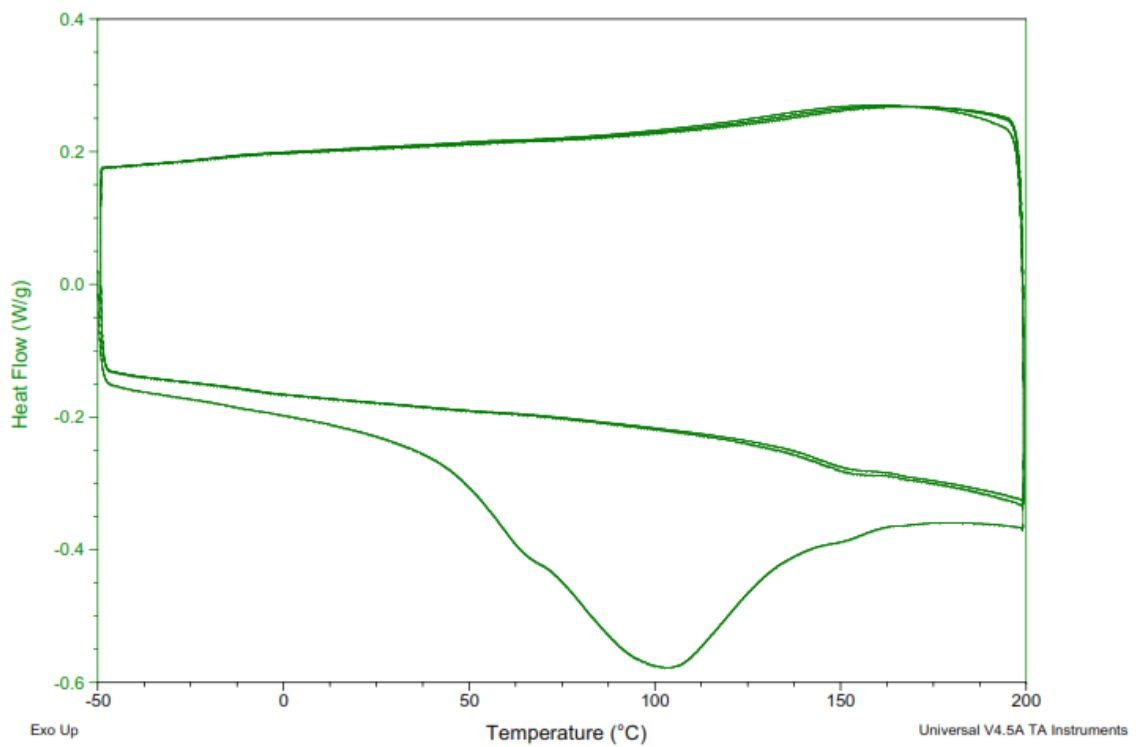
ANEXO 6. TERMOGRÁMAS OBTENIDOS PARA LAS DIFERENTES MUESTRAS DE BIOPOLÍMERO



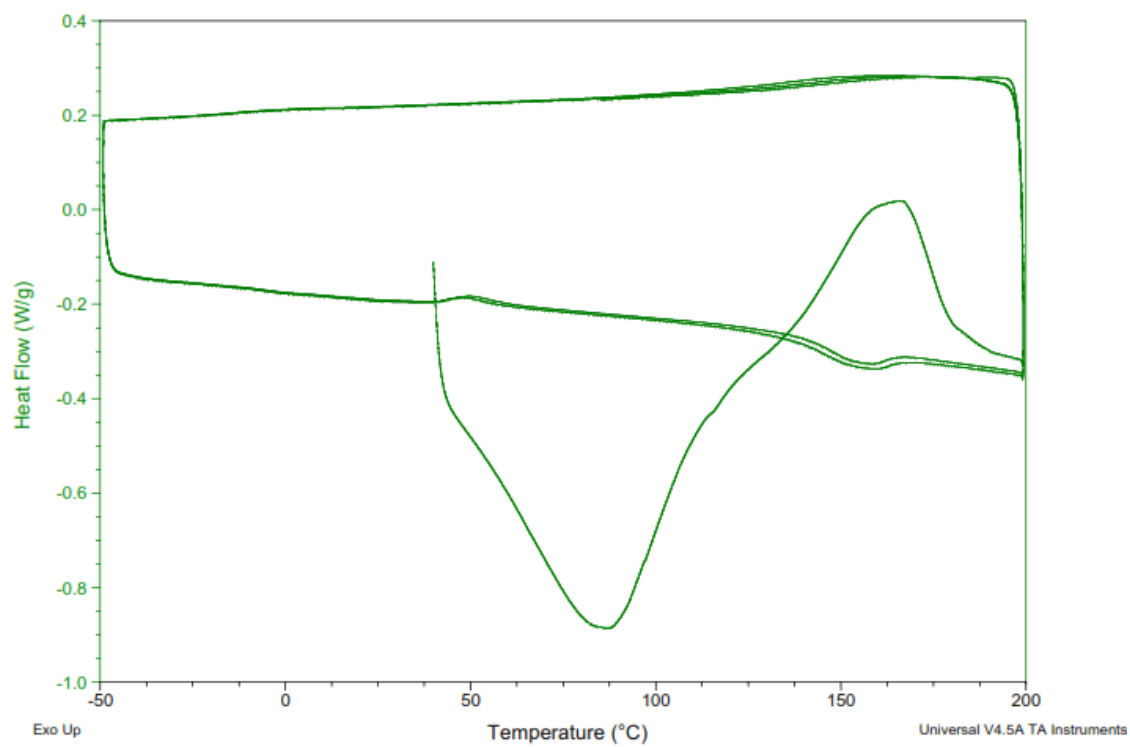
Termograma muestra *Ralstonia eutropha* – Hidrolizado de raquis



Termograma muestra *Ralstonia eutropha* – Glucosa



Termograma muestra *Halomonas boliviensis* – Hidrolizado de raquis



Termograma muestra *Halomonas boliviensis* – Glucosa