

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

Departamento de Ingeniería Química



**Tesis de**

**Doctor en Ingeniería Química**

**OBTENCIÓN DE POLI(HIDROXIALCANOATO)S EMPLEANDO  
VINAZAS COMO SUSTRATO**

**Daiana Vanina Trapé**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2023**



## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito en la Planta Piloto de Ingeniería Química, dependiente del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre abril de 2017 y abril de 2023, bajo la dirección de la Dra. Olivia López, investigadora Principal de CONICET y el Dr. Marcelo Villar, Investigador Independiente de CONICET.

Daiana Vanina Trapé



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el ...../...../....., mereciendo la calificación de .....(.....).



## AGRADECIMIENTOS

A CONICET y a la Universidad Nacional del Sur, por su apoyo financiero para la realización de esta tesis doctoral.

Quiero agradecer de manera especial a todo el personal de PLAPIQUI y, en particular, al grupo de Polímeros, por su compañerismo y apoyo durante el desarrollo de mi tesis. Gracias por crear un ambiente de trabajo colaborativo y por contribuir a mi crecimiento profesional y personal.

A mis queridos directores, Marcelo y Olivia, quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Su orientación, conocimientos y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis. Gracias por su paciencia, y por brindarme su guía en cada etapa de mi investigación. Estoy profundamente agradecido por su apoyo constante y por impulsarme a dar lo mejor de mí.

A mis amigas Romi y Mari por las risas compartidas y momentos de distracción. Gracias por estar a mi lado en estos años.

A todos los integrantes que tuvo la Oficina del Fondo a lo largo de estos años, quiero expresar mi gratitud por su compañerismo y por ser una parte importante de esta experiencia. En particular, quiero agradecer a Mai y Dahi por su apoyo en este último tiempo. Su amistad, aliento y disposición para ayudarme han sido invaluable.

A mi amada familia, mamá, papá y hermana, les debo una gratitud eterna. Su amor incondicional, apoyo constante y palabras de aliento me han dado la fuerza y la motivación para enfrentar los desafíos que surgen en el camino. Gracias por creer en mí y por ser mi mayor fuente de inspiración. Este logro es también suyo.

A mi compañero de vida, Fran, quiero agradecerte por tu apoyo incondicional y tu ánimo constante. Gracias por ser mi apoyo inquebrantable, por comprender mis ausencias y por celebrar cada logro a mi lado. Tu amor y respaldo han sido un pilar fundamental en este camino.



## Resumen

Los biopolímeros se presentan como una opción promisoriosa a los polímeros sintéticos convencionales, ya que son biodegradables y se obtienen de fuentes renovables. Entre ellos, los poli(hidroxialcanoato)s (PHAs) son biopoliésteres especialmente atractivos por su similitud en propiedades finales con algunos de los polímeros sintéticos, pero con la ventaja adicional de ser biodegradables. Sin embargo, el costo de producción de los PHAs es alto debido, principalmente, al costo de la fuente de carbono. Por lo que buscar materias primas más económicas es crucial para reducir los costos asociados a la producción de estos biopoliésteres. El objetivo de esta tesis fue estudiar la producción de PHAs utilizando vinaza (residuo de la industria del bioetanol) como sustrato y *Bacillus megaterium* como microorganismo productor. En este sentido, se optimizó la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación mediante un diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta, lográndose una productividad de  $0,0105 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Mediante optimización matemática se demostró que producir PHAs a partir de vinaza es económicamente viable, especialmente si el microorganismo productor posee una alta capacidad de acumulación del biopolímero, si la vinaza es pretratada o mezclada con otras fuentes de carbono más accesibles y si se agregan sales minerales al medio. Por otra parte, se exploró la obtención de vinaza seca mediante secado por aspersion, empleando maltodextrina como aditivo coadyuvante y se demostró que su uso como sustrato resultó en una mayor productividad de PHAs ( $0,0227 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en comparación con la vinaza líquida. Este incremento podría atribuirse a la presencia de la maltodextrina que resultaría en una fuente de carbono más accesible en la fermentación empleado como

cepa *Bacillus megaterium*, en concordancia con los resultados del estudio de factibilidad técnico-económica. Los PHAs biosintetizados se sometieron a una caracterización molecular y térmica mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada Fourier (FTIR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA). Los valores de la temperatura de fusión de los PHAs obtenidos sugieren que el biopolímero podría estar formado por 3HB con comonómeros de cadena mas larga como el 3HV, entre otros. En función de los resultados reportados en la literatura los PHAs obtenidos resentan una temperatura de fusión similar al P(3HB-co-3HV) con una concentración aproximada del 9 mol% HV. Los avances en la optimización de la producción de PHAs utilizando vinaza como sustrato, la evaluación económica, la obtención de vinaza seca y su uso para la síntesis de PHAs y la caracterización de los PHAs permiten avanzar hacia una producción más sostenible de materiales poliméricos biodegradables y renovables. Además, los resultados experimentales obtenidos representan una importante contribución al estudio de la biosíntesis de PHAs empleando procesos biotecnológicos más económicos.

## Abstract

Biopolymers are presented as a promising option to conventional synthetic polymers, since they are biodegradable and they can be obtained from renewable resources. Among them, poly(hydroxyalkanoates)s (PHAs) are especially attractive biopolyesters due to their similarity in final properties to some synthetic polymers, but with the additional advantage of being biodegradable. However, the production cost of PHAs is high, mainly due to the cost of the carbon source. Therefore, looking for more economical raw materials is crucial to reduce the costs associated with the production of these biopolyesters. This thesis focused on studying the production of PHAs using vinasse (residue from the bioethanol industry) as substrate and *Bacillus megaterium* as the producing microorganism. In this sense, the composition of the culture medium and fermentation conditions were optimized through an experimental design and the response surface methodology, achieving a productivity of  $0.0105 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Through mathematical optimization, it was shown that producing PHAs from vinasse is economically viable, especially if the producing microorganism has a high capacity for biopolymer accumulation, if the vinasse is pretreated or mixed with more accessible carbon sources, and if mineral salts are added to the medium. On the other hand, spray drying of vinasse by was explored, using maltodextrin as a coadjuvant additive, in order to obtain dry vinasse. The use of dry vinasse as substrate resulted in a higher productivity of PHAs ( $0.0227 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) compared to the liquid vinasse. This increase could be attributed to the presence of maltodextrin, which would result in a more accessible carbon source for fermentation by *Bacillus*, in accordance with the results of the technical-economic feasibility study. The biosynthesized PHAs were subjected to

molecular and thermal characterization using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), and Thermogravimetric Analysis (TGA). The values of melting temperature of PHAs suggest that the biopolymer obtained could be identified as a copolymer of 3HB with longer monomers such as 3-HV, among others. Comparing the melting temperature with values reported in the literature the obtained PHAs could be a P(3HB-co-3HV) with an approximate concentration of 9 mo % HV. The advances in the optimization of the production of PHAs using vinasse as a substrate, the economic evaluation, the obtaining of dry vinasse and its use for the PHAs synthesis, and the biopolymer characterization allow progress towards more sustainable production of biodegradable polymers using renewable resources. In addition, experimental results obtained represent an important contribution to the biosynthesis of PHAs by cost-effective biotechnological processes.

# ÍNDICE

---

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tablas.....	vii
Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Introducción .....	1
1.1.1 Estructura y clasificación de los PHAs .....	5
1.1.2 Vías biosintéticas de los PHAs .....	7
1.1.3 Especies bacterianas que acumulan PHAs .....	8
1.1.4 Aplicaciones de los PHAs .....	10
1.1.5 Producción industrial de PHAs .....	12
1.1.6 Residuos agroindustriales para la producción de PHAs .....	13
1.2 Objetivos .....	18
1.3 Referencias .....	19
Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de <i>Bacillus megaterium</i> y vinaza como fuente de carbono.....	34
2.1 Introducción .....	34
2.2 Materiales y métodos .....	38
2.2.1 Cepa bacteriana.....	38
2.2.2 Sustrato .....	39
2.2.3 Medios de cultivo .....	42
2.2.4 Fermentaciones para la producción de PHB .....	42
2.2.5 Optimización de la composición de los medios de cultivo y de las condiciones de fermentación .....	43
2.2.6 Métodos analíticos .....	46
2.3 Resultados y discusión .....	49
2.3.1 Sustrato .....	49
2.3.2 Fermentaciones en Erlenmeyers (shake flasks) .....	50
2.3.3 Optimización de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación .....	52
2.4 Conclusiones.....	65
2.5 Referencias .....	66
Capítulo 3: Evaluación de la factibilidad económica de la producción de PHAs a partir de vinaza .....	72
3.1 Introducción .....	72
3.2 Materiales y métodos .....	73

3.2.1 Modelo matemático.....	75
3.2.2 Análisis de sensibilidad.....	80
3.3 Resultados y discusión .....	81
3.4 Conclusiones.....	89
3.5 Referencias.....	89
Capítulo 4: Optimización del proceso de secado de vinaza .....	94
4.1 Introducción .....	94
4.2 Materiales y Métodos .....	97
4.2.1 Materiales .....	97
4.2.2 Caracterización de la vinaza .....	97
4.2.3 Secado de vinaza .....	97
4.2.4 Obtención de PHB a partir de vinaza seca .....	100
4.2.5 Optimización global del proceso de secado: deseabilidad individual (d) y global (D) .....	100
4.2.6 Ensayos de caracterización de las muestras de vinaza seca .....	104
4.3 Resultados y Discusión .....	105
4.3.1 Caracterización de la muestra de vinaza.....	105
4.3.2 Secado de vinaza .....	106
4.3.3 Caracterización de las muestras de vinaza seca.....	120
4.4 Conclusiones.....	121
4.5 Referencias.....	122
Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos. ....	126
5.1 Introducción .....	126
5.2 Materiales y métodos .....	130
5.2.1 Fermentaciones para la producción de PHAs .....	130
5.2.2 Métodos analíticos empleados para el seguimiento de las fermentaciones.....	131
5.2.3 Extracción del biopolímero .....	133
5.2.4 Caracterización estructural y térmica .....	133
5.3 Resultados y discusión .....	135
5.3.2 Caracterización estructural y térmica .....	140
5.4 Conclusiones.....	149
5.5 Referencias.....	149
Capítulo 6: Conclusiones y trabajos futuros.....	155
6.1 Conclusiones.....	155
6.2 Trabajo futuro .....	159

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Clasificación de biopolímeros según su origen y biodegradabilidad .....	4
Figura 1.2: Estructura general de los PHAs y algunos monómeros. ....	6
Figura 1.3: Rutas biosintéticas de PHAs .....	8
Figura 1.4: Cepas bacterianas productoras de PHAs .....	13
Figura 1.5: Cepas bacterianas productoras de PHAs .....	15
Figura 2.1: Curva de calibración para el cálculo de la biomasa. ....	47
Figura 2.2: Curva de calibración para la determinación de PHB.....	49
Figura 2.3: Biomasa total, biomasa residual y PHB acumulado en función del tiempo de fermentación. Símbolos: (●) biomasa total, (▲) biomasa residual y (■) PHB acumulado.....	52
Figura 2.4: Productividad de PHB: valores experimentales versus valores estimados por el modelo .....	55
Figura 2.5: Superficie de respuesta del efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la productividad de PHB.....	57
Figura 2.6: Productividad de PHB: valores experimentales versus valores estimados por el modelo. ....	61
Figura 2.7: Superficie de respuesta de la productividad de PHB en función de: a) la relación C/N y el tiempo, b) la temperatura y el tiempo y c) la relación C/N y la temperatura. ....	63
Figura 3.1: Biorrefinería de producción de PHAs utilizando vinaza como fuente de carbono. ..	75
Figura 3.2: Análisis de sensibilidad realizado en el escenario 1 para evaluar la influencia de diferentes valores de los parámetros sobre el VNP. Símbolos: (- - -) Costo energía térmica, (- - -) Rendimiento PHA, (- - -) Costo energía eléctrica, (- - -) PHA acumulado y (- - -) Precio PHA....	88
Figura 4.1: Funciones de deseabilidad. Se desea que la respuesta de interés alcance: a) un valor máximo ( $d_{m\acute{a}x}$ ); b) un valor mínimo ( $d_{m\acute{i}n}$ ) o c) un valor objetivo ( $d_{obj}$ ) .....	103
Figura 4.2: Rendimiento de secado experimental en función de los obtenidos por el modelo cuadrático ajustado.....	1088
Figura 4.3: Superficie de respuesta del rendimiento de secado de vinaza en función de la concentración de maltodextrina y del caudal de aire de atomización .....	1100
Figura 4.4: Productividad de PHB experimental en función de los obtenidos por el modelo cuadrático ajustado.....	115
Figura 4.5: Superficie de respuesta de la productividad de PHB en función de la concentración de maltodextrina y de la temperatura del aire de atomización. ....	1166
Figura 4.6: Distribución de tamaño de partícula en la muestra de vinaza seca.....	1211
Figura 5.1: Mini-biorreactor usado en esta tesis. ....	131
Figura 5.2: Curva de calibración para el cálculo de la concentración de glucosa. Glucosa ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) = $26,22 \times \text{Absorbancia}$ .....	133
Figura 5.3: Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en Erlenmeyers empleando vinaza líquida y <i>B. megaterium</i> .....	136
Figura 5.4: Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en mini-biorreactor empleando vinaza líquida y <i>B. megaterium</i> .....	137
Figura 5.5: Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en Erlenmeyers empleando vinaza seca y <i>B. megaterium</i> .....	139
Figura 5.6: Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en mini-biorreactor empleando vinaza seca y <i>B. megaterium</i> . ....	140

Figura 5.7: Espectro FTIR de los PHAs producidos por <i>B. megaterium</i> empleando vinaza líquida y sólida. ....	141
Figura 5.8: Termogramas correspondientes a las muestras de PHAs obtenido a partir de <i>Bacillus megaterium</i> y vinaza líquida o seca como sustrato. ....	143
Figura 5.9: Termograma correspondiente a la muestra de PHB comercial. ....	144
Figura 5.10: Termograma correspondiente a la muestra de PHA obtenido a partir de <i>B. megaterium</i> empelyo vinaza liquida. ....	147
Figura 5.11: Termograma correspondiente a la muestra de PHB comercial. ....	148

## Índice de Tablas

Tabla 1.1: Cepas bacterianas productoras de PHAs.....	10
Tabla 1.2: Residuos diversos derivados de biorrefinerías para producir PHAs por diferentes cepas bacterianas.....	16
Tabla 2.1:Producción de PHB a partir de <i>Bacillus</i> y fuentes de carbono de bajo. ....	37
Tabla 2.2: Niveles de factores para las variables independientes (C, N y F) y para las condiciones de fermentación (C/N, T y t) para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> utilizando vinaza como sustrato. ....	43
Tabla 2.3: Valores de los factores para las variables independientes (C, N y F) para optimizar la composición de los medios de cultivo para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> utilizando vinaza como sustrato. ....	44
Tabla 2.4: Valores de los factores para las variables independientes (C/N, T y t) de los experimentos para optimizar las condiciones de fermentación para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> utilizando vinaza como sustrato.....	45
Tabla 2.5: Propiedades fisicoquímicas de las muestras de vinaza V <sub>2017</sub> y V <sub>2018</sub> .....	50
Tabla 2.6: Valores de productividad experimental (P <sub>exp</sub> ) y estimadas por el modelo (P <sub>mod</sub> ) en la optimización de la composición del medio de cultivo para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> utilizando vinaza como fuente de carbono. ....	53
Tabla 2.7: Valores de <i>p</i> para cada variable independiente (C, N y F) y sus interacciones, obtenidos a partir de la optimización de la composición del medio de cultivo. ....	54
Tabla 2.8: Validación del modelo de producción de PHB. Comparación de los valores predichos por el modelo con los valores experimentales para la composición óptima del medio de cultivo .....	58
Tabla 2.9: Valores de productividad experimental (P <sub>exp</sub> ) y estimadas por el modelo (P <sub>mod</sub> ) en la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de PHB por <i>B. megaterium</i> utilizando vinaza como fuente de carbono .....	59
Tabla 2.10: Valores de <i>p</i> para cada variable independiente (C/N, T y t) y sus interacciones, obtenidos a partir de la optimización de las condiciones de fermentación. ....	60
Tabla 2.11: Validación del modelo de producción de PHB. Comparación de los valores predichos por el modelo con los valores experimentales para las condiciones óptimas de fermentación.....	64
Tabla 2.12: Productividades reportadas utilizando <i>B. megaterium</i> y diferentes fuentes de carbono. ....	65
Tabla 3.1: Principales variables de biosíntesis de PHAs para diferentes escenarios. ....	80
Tabla 3.2: Resultados obtenidos de la superestructura para la producción de PHB.....	81
Tabla 3.3: Consumo y costo de energía de diferentes escenarios de biosíntesis de PHAs.....	85
Tabla 4.1: Variables independientes con sus valores codificados y niveles correspondientes ..	97
Tabla 4.2:Valores de los factores para las variables independientes de los experimentos para optimizar las condiciones de secado por aspersion de vinaza.....	98
Tabla 4.3: Propiedades fisicoquímicas de las muestras de vinaza. ....	1055
Tabla 4.4: Valores de la variable de respuesta rendimiento de secado (RS) experimentales y estimados por el modelo para optimizar el secado de vinaza por aspersion.....	1066
Tabla 4.5: Valores de <i>p</i> para las variables independientes y sus interacciones, obtenidas a partir de la optimización del proceso para maximizar el rendimiento del secado.....	1099
Tabla 4.6: Valores de Carbono Orgánico Total (COT) de las muestras de vinaza secas.....	1122

Tabla 4.7: Valores productividad experimental de PHB (P) y estimada por el modelo para optimizar el secado de vinaza por aspersión. ....	1133
Tabla 4.8: Valores de p para las variables independientes y sus interacciones, obtenidas a partir de la optimización del proceso para maximizar la productividad de PHB. ....	1155
Tabla 4.9: Condiciones óptimas del proceso de secado y deseabilidad global estimada. ....	1199
Tabla 4.10: Valores experimentales óptimos y predichos del proceso de secado. ....	1200
Tabla 5.1: Propiedades térmicas y mecánicas del PHB y otros PHAs .....	128
Tabla 5.2: Propiedades térmicas de los PHAs obtenidos empleando vinaza líquida y seca. ....	144
Tabla 5.3: Variación de la temperatura de fusión del P(3HB-co-3HV) en función de la composición molar de 3HV . ....	146
Tabla 5.4: Temperatura de degradación de PHB y P(3HB-co-3HV).....	148

# Capítulo 1: Introducción

---

## 1.1 Introducción

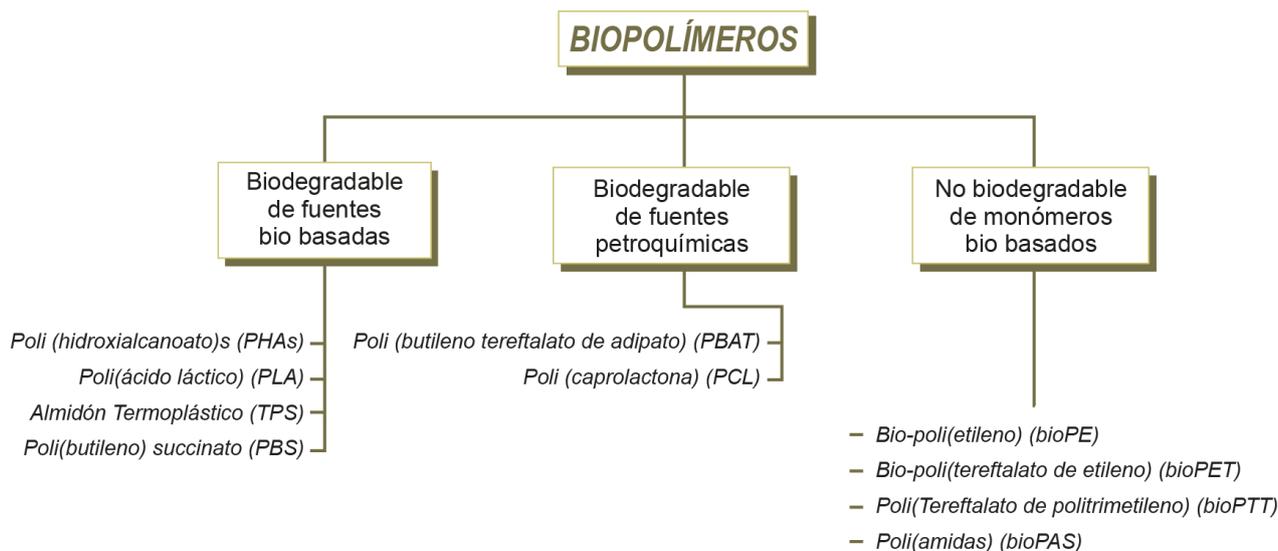
Los polímeros sintéticos presentan una amplia gama de ventajas que los han hecho esenciales para la vida moderna. Su versatilidad y costo accesible, han permitido su uso en múltiples sectores como textil, envasado, construcción y transporte, entre otros. A pesar de ser muy útiles en la vida cotidiana tienen varias desventajas que deben ser consideradas. Una de ellas es el agotamiento de los recursos fósiles, ya que gran parte de su producción se basa en el gas natural, el petróleo y sus derivados. A medida que las reservas de gas y petróleo disminuyen, el costo de producción de los polímeros sintéticos aumenta, lo que podría tener un impacto significativo en la economía y en la disponibilidad de productos que dependen de ellos (Bansal y Rosenholm 2020). Además, la dependencia del gas y del petróleo para la producción de polímeros sintéticos tiene un significativo impacto ambiental negativo. La extracción y el procesamiento pueden emitir gases tóxicos y partículas que pueden afectar la calidad del aire y la salud humana (Thompson *et al.* 2017). Además, estas actividades contaminan las fuentes de agua cercanas y tienen un impacto negativo en la biodiversidad (Allen *et al.* 2012). Dentro de este contexto, Jeffry *et al.* (2021) afirman que la explotación del gas y del petróleo es responsable de una gran cantidad de emisiones de gases de efecto invernadero, que son los principales contribuyentes al cambio climático. Otra desventaja importante es que la mayoría de los polímeros sintéticos no son biodegradables, lo que significa que no pueden ser descompuestos por los microorganismos presentes en el medio ambiente (Muneer *et al.* 2020). Debido a su estructura química, estos materiales pueden persistir

en el medio ambiente durante décadas o incluso siglos, lo que puede generar un grave impacto ambiental si no se manejan adecuadamente. En este sentido, la acumulación de residuos plásticos puede afectar la biodiversidad, la calidad del suelo y del agua, y el equilibrio de los ecosistemas.

A pesar de estas desventajas, la producción mundial de polímeros ha aumentado significativamente en las últimas décadas. Según datos proporcionados por la Asociación de la Industria del Plástico (Plastics Europe), en 2019 se produjeron 368 millones de toneladas de plástico a nivel mundial, lo que representa un aumento del 3,2 % con respecto al año anterior (Busch *et al.* 2023). Además, se espera que tanto la demanda mundial como la capacidad de producción de plásticos convencionales continúen aumentando. Sin embargo, solo el 9 % de los plásticos producidos han sido reciclados o reutilizados y los plásticos restantes han sido incinerados, enterrados o simplemente depositados en el medio ambiente (Sohn *et al.* 2020). Dado que la mayoría de los polímeros sintéticos se descomponen lentamente, la acumulación de residuos ha provocado graves problemas ambientales, como la generación de microplásticos en los ecosistemas marinos y terrestres y la formación de islas de plástico. En respuesta a las preocupaciones sobre la contaminación ambiental y los sistemas de eliminación de plásticos, se ha convertido en una tendencia mundial la introducción de regulaciones sobre el uso de los mismos. Los gobiernos buscan nuevas alternativas que reduzcan el impacto ambiental, económico y social negativo de los sistemas de energía no renovable y los plásticos a base de combustibles fósiles. Es fundamental investigar nuevos materiales que puedan sustituir a los polímeros sintéticos no biodegradables y que los mismos se basen en fuentes renovables. En este contexto, los biopolímeros son una alternativa a los polímeros sintéticos gracias a su renovabilidad y biodegradabilidad

(Šuput *et al.* 2022). Algunos biopolímeros pueden tener propiedades mecánicas similares a las de los polímeros sintéticos, lo que los hace adecuados para aplicaciones similares. Por lo tanto, reemplazar parcialmente los polímeros sintéticos no biodegradables con biopolímeros podría reducir significativamente el impacto ambiental generado por la producción y disposición final de dichos polímeros sintéticos.

Los biopolímeros son materiales naturales formados por unidades monoméricas que se enlazan covalentemente para crear macromoléculas, como la celulosa, el colágeno y los alginatos, entre otros (Yahya *et al.* 2020). Los biopolímeros y polímeros bio-basados se pueden clasificar según su origen y su biodegradabilidad. Los polímeros de base biológica se refieren a aquellos que están conformados total o parcialmente de cualquier tipo de material orgánico renovable de origen biológico (Moshood *et al.* 2022). Los polímeros biodegradables son aquellos que podrían degradarse microbiológicamente en metano, CO<sub>2</sub>, compuestos inorgánicos, agua y biomasa (Ahmed *et al.* 2018). Los polímeros biodegradables, a su vez, se pueden dividir en dos grupos: i) polímeros producidos a partir de recursos naturales y ii) polímeros derivados de recursos petroquímicos (no renovables). El poli (ácido láctico) (PLA), los poli(hidroxicanoato)s (PHAs) y los polisacáridos (celulosa, almidón, etc.) son ejemplos del primer grupo, mientras que la poli(ε-caprolactona) (PCL) y el poli (butilen adipate-co-tereftalato) (PBAT) del segundo. Por otra parte, existen polímeros que pueden obtenerse de recursos naturales o bio-basados que no son biodegradables como el bio-poli(etileno) (Bio-PE) (Fredy y Dorigato 2021). En la Figura 1.1 se representa esta clasificación, reportando varios biopolímeros de cada grupo.



**Figura 1.1:** Clasificación de biopolímeros según su origen y biodegradabilidad

Existen diversas fuentes de donde se pueden obtener biopolímeros, incluyendo microorganismos, plantas y animales terrestres y acuáticos (Gopi *et al.*, 2018). En el caso de las fuentes microbiológicas se pueden mencionar a los hongos, las bacterias y las levaduras. En el caso de las fuentes vegetales, se pueden mencionar ejemplos como maíz, trigo, sorgo, yuca, papa, plátano, tapioca y algodón, entre otros (Baranwal *et al.*, 2022). Por otro lado, las fuentes animales incluyen ganado, corales, esponjas, peces, langostas y camarones.

Los biopolímeros biodegradables ofrecen una serie de ventajas en comparación con los plásticos convencionales, ya que pueden reducir significativamente el impacto ambiental relacionado con la eliminación de residuos plásticos debido a su corto tiempo de biodegradación en agua y en la superficie terrestre (Nya *et al.* 2022). Entre los diversos tipos de biopolímeros, los PHAs son altamente atractivos para la industria de los bioplásticos. Estos biopolímeros son sintetizados por numerosas especies de bacterias y ofrecen propiedades mecánicas similares a algunos plásticos sintéticos

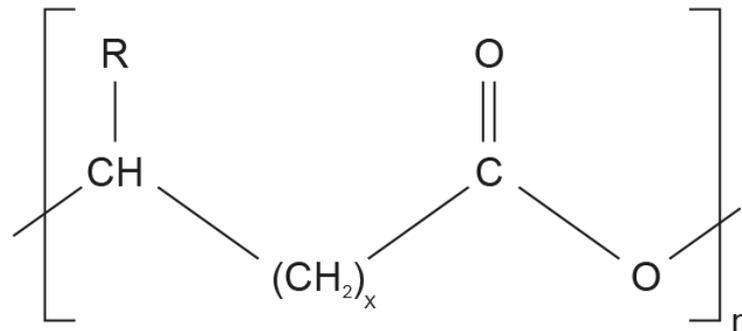
convencionales como el poli(etileno) (PE) y el poli(propileno) (PP), pero con la ventaja adicional de ser biodegradables.

#### 1.1.1 Estructura y clasificación de los PHAs

Los PHAs son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos, sintetizados por una amplia variedad de microorganismos. La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, 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 los conozca como biopolíesteres. Los PHAs se acumulan como gránulos intracelulares bajo ciertas condiciones cuando la energía externa supera las necesidades energéticas para mantener el proceso de división del crecimiento o la viabilidad celular (Obruca *et al.* 2020). Cuando el aporte de energía externa no es suficiente, los PHAs se despolimerizan y metabolizan para obtener carbono y fuente de energía (Prados y Maicas 2016).

Los PHAs son polímeros lineales compuestos por varias repeticiones del mismo monómero. Se han identificado más de 150 tipos diferentes de monómeros como constituyentes de los PHAs (Butt *et al.* 2018). Esta diversidad le otorga a los PHAs una gran versatilidad ya que es posible obtener diversos biopolímeros con distintas propiedades físicas, lo que permite su uso en múltiples aplicaciones. La estructura general de la unidad repetitiva de los PHAs y las sustituciones más comunes del grupo radical se presentan en la Figura 1.2. El valor de  $n$  dependerá del grupo R y de la bacteria productora, variando entre 10 y 30.000 (Lee 1996) y el número de grupos  $-CH_2-$  consecutivos en el esqueleto del polímero oscila entre 1 y 4. Los PHAs más estudiados son: poli(3-hidroxibutirato) (PHB), poli(3-hidroxivalerato) (PHV) y el copolímero poli(3-

hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). Entre estos biopolímeros, el PHB fue la primera clase de PHAs caracterizada (Tarrahi e 2020).



X=1	R=hidrógeno	Poli(3-hidroxipropionato)
	R=metil	Poli(3-hidroxibutirato)
	R=etil	Poli(3-hidroxivalerato)
	R=propil	Poli(3-hidroxihexanoato)
	R=pentil	Poli(3-hidroxioctanoato)
	R=nonil	Poli(3-hidroxidodecanoato)
X=2	R=hidrógeno	Poli(4-hidroxibutirato)
	R=metil	Poli(4-hidroxivalerato)
X=3	R=hidrógeno	Poli(5-hidroxivalerato)
	R=metil	Poli(5-hidroxihexanoato)
X=4	R=hexil	Poli(6-hidroxidodecanoato)

**Figura 1.2:** Estructura general de los PHAs y algunos monómeros.

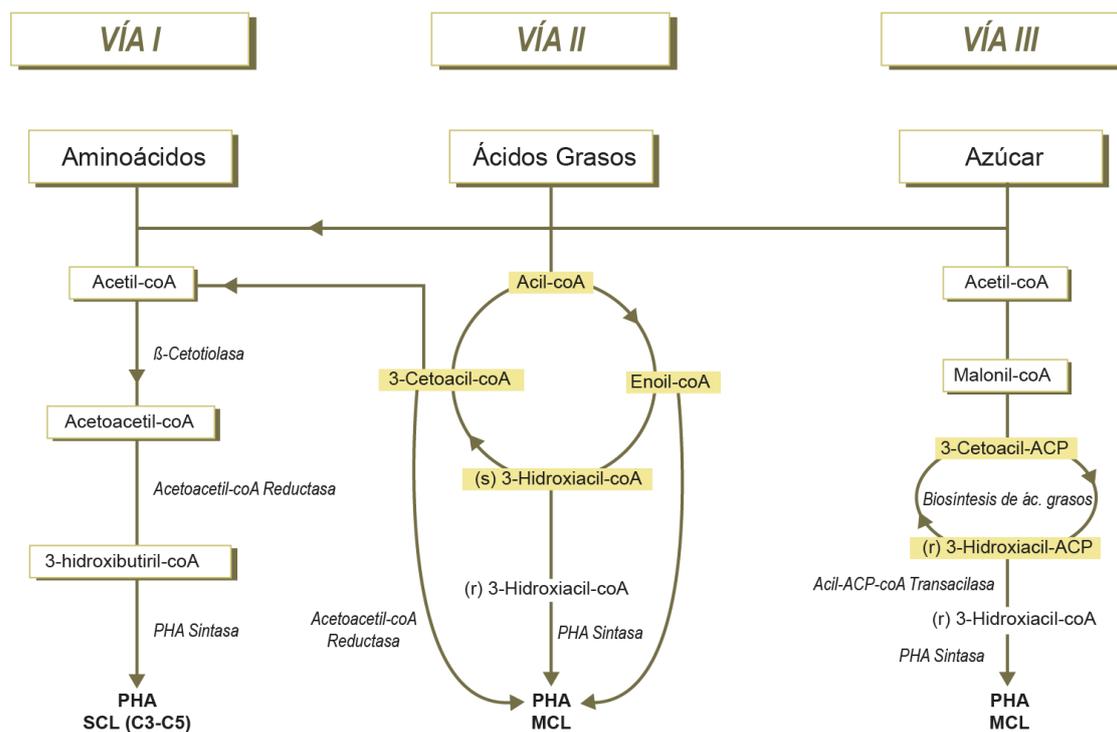
Los PHAs se pueden clasificar según la longitud de la cadena de carbono en: PHAs de cadena corta (scl-PHA), PHAs de cadena media (mcl-PHA) y PHAs de cadena larga (lcl-PHA). La longitud de la unidad de monómero influye en las propiedades del polímero. En el caso de los scl-PHA, compuestos por monómeros de 3-5 carbonos, son

termoplásticos con un alto grado de cristalinidad, demasiado rígidos y quebradizos, y se utilizan mayoritariamente para la producción de artículos desechables y envases para alimentos (Nigmatullin *et al.* 2015). Por otro lado, los mcl-PHA, constituidos por unidades monoméricas de 6-14 carbonos, son elastoméricos, tienen un bajo grado de cristalinidad y temperatura de fusión, tienen una temperatura de transición vítrea baja y menor masa molecular en comparación con los scl-PHA. Finalmente, los biopolíesteres que contienen componentes monoméricos de 15 o más de 15 carbonos son lcl-PHA (Riaz *et al.* 2021). Un PHA será un polímero de cadena corta o media según la enzima responsable de la síntesis (PHA-sintasa) ya que la misma es específica del sustrato y puede actuar sobre monómeros con diferente número de átomos de carbono. Por lo tanto, la composición química de los PHAs dependerá del sustrato, la enzima PHA-sintasa y la ruta metabólica involucrada (Lemos Delgado y Mina Cordoba 2015).

#### 1.1.2 Vías biosintéticas de los PHAs

La composición del monómero está relacionada con la fuente de carbono utilizada. Hay tres rutas biosintéticas de PHAs bien conocidas (Figura 1.3). En la vía de la acetoacetil coenzima A (acetoacetil-coA) (vía I), la 2-acetil-coA se produce a partir de ácidos grasos, azúcares o aminoácidos y se convierte en acetoacetil-coA mediante la enzima- $\beta$ -cetotiolasa (Idi 2019). La acetoacetil-coA reductasa actúa sobre la acetoacetil-coA para formar 3-hidroxiacetil-coA, que luego es polimerizada por la PHA-sintasa para producir PHA. Esta ruta describe la producción de scl-PHAs que se componen de monómeros de 3-5 carbonos. En la vía de los ciclos de oxidación beta (vía II), los ácidos grasos se convierten en enoil-coA. Esto se cataliza a R-3-hidroxiacetil-coA por la R-3-hidroxiacetil-coA hidratasa y luego se convierte en PHA por la PHA-sintasa. Esta vía describe la síntesis de mcl-PHA. La tercera vía, la síntesis de ácidos grasos *in situ* (vía III),

se produce a partir de fuentes de carbono simples como glucosa, fructosa, gluconato, glicerol, etanol y acetato. Estas fuentes de carbono generalmente están presentes en desechos orgánicos de bajo costo como el glicerol, un subproducto de la producción de biodiesel (Uribe Acosta *et al.* 2019). Estas fuentes de carbono se convierten en acetil-coA y luego en malonil-coA que culmina en la proteína transportadora de 3-hidroxiacil-acilo (ACP) (Kniewel *et al.* 2019). El 3-hidroxiacil-ACP se transforma en 3-hidroxiacil-coA para la síntesis de PHA por la enzima 3-hidroxiacil-ACP-coA transferasa (Idi 2019). Esta vía también permite obtener mcl-PHAs.



**Figura 1.3:** Rutas biosintéticas de PHAs

### 1.1.3 Especies bacterianas que acumulan PHAs

Los PHAs son producidos por una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Comparando ambas bacterias, las Gram-negativas tienen una mayor

capacidad para acumular PHAs (Tan *et al.* 2014). Sin embargo, la principal desventaja de los PHAs que se obtienen de este tipo de bacterias es la presencia de endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS) en la membrana celular externa que pueden provocar una fuerte respuesta inflamatoria cuando están en contacto directo con humanos. Por esta razón, estos PHAs no son adecuados para aplicaciones biomédicas (Ponnusamy *et al.* 2019). Si bien se pueden eliminar las endotoxinas LPS esta práctica aumenta el costo total de producción de PHAs y genera cambios en las propiedades del biopolímero (reducción de la masa molecular y aumento de la polidispersidad). En cambio, las bacterias Gram-positivas carecen de LPS, lo que las convierte en una mejor opción para obtener PHAs para aplicaciones biomédicas (Kumar *et al.* 2020).

Las bacterias que se utilizan para la producción de PHAs se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de las condiciones requeridas para su síntesis. El primer grupo requiere la limitación de nutrientes esenciales como el nitrógeno y el fósforo, así como la presencia de una fuente de carbono en exceso para la síntesis eficiente de biopolímeros (Osman *et al.* 2016). Las bacterias incluidas en este grupo son *Cupriavidus necator* (conocida también como *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* y *Ralstonia eutropha*), *Bacillus sp.*, *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans*. Por otro lado, el segundo grupo de bacterias no requiere limitación de nutrientes y puede acumular PHAs durante la fase de crecimiento exponencial como *Alcaligenes latus*, una cepa mutante de *Azotobacter vinelyii*, y cepas recombinante de *Escherichia coli*. En la Tabla 1.1 se muestran diferentes cepas bacterianas productoras de PHAs. Es importante resaltar que *Pseudomonas* es la única especie reportada que produce PHAs de cadena larga de carbono (Meereboer *et al.* 2020).

**Tabla 1.1:** Cepas bacterianas productoras de PHAs

Cepa Bacteriana	Gram	Referencia
<i>Cupriavidus necator</i>	Negativa	(Amini <i>et al.</i> 2020), (Bhatia <i>et al.</i> 2019), (Brojanigo <i>et al.</i> 2020), (Catota <i>et al.</i> 2022), (Ertan <i>et al.</i> 2021), (Insomphun <i>et al.</i> 2014), (Jeon <i>et al.</i> 2014), (Jung <i>et al.</i> 2019), (Khunthongkaew <i>et al.</i> 2018), (Nygaard <i>et al.</i> 2021)
<i>Bacillus sp.</i>	Positiva	(Morya <i>et al.</i> 2018), (Ammar <i>et al.</i> 2021), (Yler <i>et al.</i> 2021), (Vu <i>et al.</i> 2021), (Reddy <i>et al.</i> 2020), (Israni y Shivakumar 2020), (Evangeline y Sridharan 2019), (Yasin y Al-Mayaly 2021), (Mascarenhas y Aruna 2019), (Das <i>et al.</i> 2018)
<i>Alcaligenes latus</i>	Negativa	(Scott <i>et al.</i> 2021), (Amini <i>et al.</i> 2020), (Wang <i>et al.</i> 2013)
<i>Azotobacter sp.</i>	Negativa	(Gómez-Hernández <i>et al.</i> 2021), (Padilla-Córdova <i>et al.</i> 2020), (El-Nahrawy <i>et al.</i> 2018), (Urtuvia <i>et al.</i> 2020), (Semeniuk <i>et al.</i> 2020), (Aslam <i>et al.</i> 2020)
<i>Aeromonas sp.</i>	Negativa	(Shi <i>et al.</i> 2020)
<i>Burkholderia sp.</i>	Negativa	(Oliveira-Filho <i>et al.</i> 2022), (de Paula <i>et al.</i> 2021), (Al-Kaddo <i>et al.</i> 2020)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Negativa	(Kanavaki <i>et al.</i> 2021), (Aremu <i>et al.</i> 2021), (Sabarinathan <i>et al.</i> 2018), (Choi <i>et al.</i> 2021), (Pan <i>et al.</i> 2021), (Bose <i>et al.</i> 2020), (Muniyyi y Punamalai 2021), (Kim <i>et al.</i> 2021)
<i>Halomonas sp.</i>	Negativa	(Yu <i>et al.</i> 2020), (El-malek <i>et al.</i> 2020), (Pernicova <i>et al.</i> 2019), (Stanley <i>et al.</i> 2018), (Liu <i>et al.</i> 2021)
<i>Haloferax sp.</i>	Negativa	(Ino <i>et al.</i> 2020), (Priya <i>et al.</i> 2022), (Raho <i>et al.</i> 2020), (Ghosh <i>et al.</i> 2022), (Melanie <i>et al.</i> 2018), (Sato <i>et al.</i> 2021), (Wang y Zhang 2021)
<i>E. coli recombinante</i>	Negativa	(Thomas <i>et al.</i> 2021), (Sohn <i>et al.</i> 2020b), (Narayanan <i>et al.</i> 2020), (Wu <i>et al.</i> 2022), (Choi <i>et al.</i> 2020), (Miao <i>et al.</i> 2021), (Chen <i>et al.</i> 2018), (Torabi <i>et al.</i> 2021)

#### 1.1.4 Aplicaciones de los PHAs

Los PHAs son biopolímeros altamente versátiles con diversas aplicaciones industriales debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Inicialmente, los PHAs

se han utilizado para artículos y empaques cotidianos con una amplia gama de aplicaciones, como botellas, bolsas, productos de higiene femenina, alfombras y tapicería (Koller *et al.* 2010). La mayoría de los productores actuales de estos biopolímeros a gran escala venden PHAs como materia prima en forma de polvo y pellets que pueden procesarse mediante extrusión convencional, moldeo por inyección, termoformado y soplado de película. Una aplicación con alto valor es su uso como materia prima para implantes médicos, suturas, matrices de administración de fármacos y otros productos para el cuidado de la salud. Varios grupos de investigación y empresas de biotecnología están estudiando estas aplicaciones ya que se ha comprobado que varios tipos de PHAs son biocompatibles en distintos sistemas de modelos animales (Kehail *et al.* 2015). Los homopolímeros, como el P(4HB), y los copolímeros, como el P(3HB-co-4HB) o el P(HB-co-HHx), tienen propiedades apropiadas para su uso en suturas debido a su flexibilidad y resistencia. Por otra parte, la capacidad de biodegradación de los PHAs los convierte en un vehículo atractivo para la administración de fármacos. Se han evaluado diferentes tipos de matrices de PHAs para determinar su degradación y la liberación simultánea de fármacos como antibióticos o inhibidores del crecimiento de células eucariotas (Brigham 2017). A nivel de investigación, las aplicaciones potenciales de los PHAs se extienden a biocombustibles en forma de éster metílico de hidroxialcanoato (3HAME), precursores químicos finos en forma de monómeros enantioméricamente puros en configuraciones (R) y aditivos alimentarios saludables (Koller *et al.* 2010).

Por consiguiente, los PHAs son materiales altamente versátiles y con un gran potencial en una amplia variedad de aplicaciones. Su amplio rango de propiedades

físicas les otorga un gran número de aplicaciones tanto a nivel industrial, comercial como médico.

#### 1.1.5 Producción industrial de PHAs

Los PHAs se han producido comercialmente desde la década de 1980, pero su aplicación se estancó debido a los bajos precios del petróleo. A principios de 2003, el aumento de los precios del petróleo provocó un resurgimiento del interés industrial por los PHAs (Koller *et al.* 2010). Desde entonces, se abrieron nuevas plantas en China, Estados Unidos, Italia y Brasil. La producción de PHAs se lleva a cabo en reactores de fermentación industrial y los procesos varían desde la elección del sustrato, la cepa bacteriana, la integración en plantas de bioprosesamiento existentes y el tipo de PHA producido. En la Figura 1.4 se presentan los niveles de producción actuales, sustratos y microorganismos utilizados por las principales plantas productoras de PHAs a nivel mundial.

En comparación con la producción mundial de polímeros a base de petróleo, los biopolímeros solo representan el 1 %, pero la industria está creciendo rápidamente. En 2018, el mercado global de biopolímeros mostró un crecimiento significativo; el tamaño estimado fue de \$12 mil millones de USD. Se espera que durante el período de 2019 a 2025, el mercado de biopolímeros crezca de manera significativa con una tasa de crecimiento anual compuesta del 19 % (Baranwal *et al.* 2022). Además, la reciente

producción de PHAs ya conduce a una cadena de valor industrial existente que probablemente se extienda con una mayor disponibilidad de PHAs comerciales.

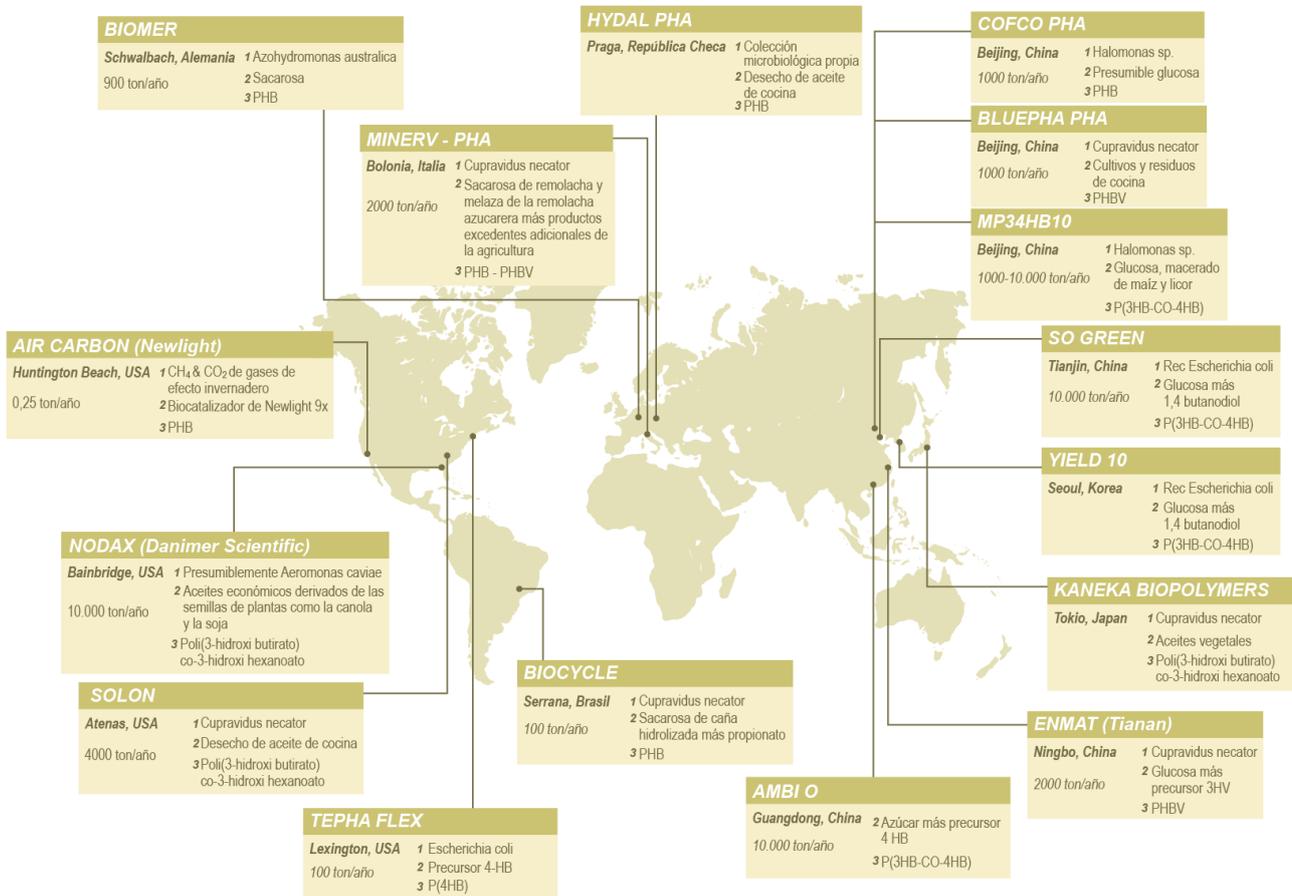


Figura 1.4: Cepas bacterianas productoras de PHAs

### 1.1.6 Residuos agroindustriales para la producción de PHAs

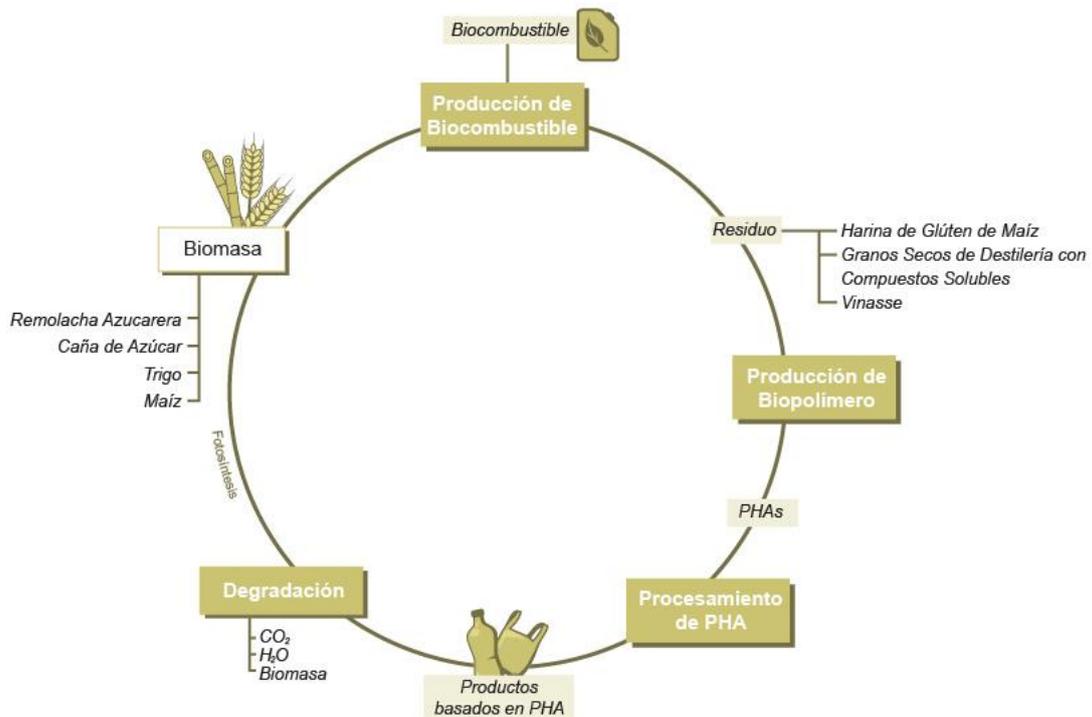
En general, el costo de producción de los PHAs es mayor que el de los polímeros sintéticos. Particularmente, el producir PHB cuesta al menos tres veces más que producir polímeros convencionales como poli(propileno) (PP) o poli(etileno) (PE), debido principalmente a los costos del sustrato y al procesamiento (Kourmentza *et al.* 2017). Sin embargo, su costo es similar al de otros polímeros de base biológica, como el PLA (Kaur *et al.* 2017). En general, los factores más importantes que contribuyen al precio final de los PHAs son la productividad ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), el rendimiento por sustrato, el

costo de las materias primas y el método de recuperación (Choi y Lee, 1999). Cabe destacar que, la fuente de carbono representa más del 50 % del costo total de la producción. Por lo tanto, es fundamental el uso de materias primas más económicas para reducir los costos de producción del PHB. Algunos recursos que se han investigado para la producción sostenible de PHB son: residuos de alimentos (Nielsen et al. 2017), residuos de cervecerías (Amini et al. 2020), suero de queso (Pais et al. 2016), aguas residuales (Alsafadi y Al-Mashaqbeh 2017) y almidón de maíz hidrolizado (Fabra et al. 2016), entre otros.

Para mejorar su desempeño económico y ambiental, la producción de PHAs puede integrarse en biorrefinerías (Koutinas et al., 2014). Las biorrefinerías se consideran las unidades de conversión centrales para la valorización de la biomasa en la bioeconomía (Kamm et al., 2008). Al igual que las refinerías petroquímicas, las biorrefinerías modernas pueden utilizar una variedad de materias primas y tecnologías de procesamiento para producir una amplia gama de productos químicos y energéticos (Clark y Deswarte, 2015b). Los productos energéticos de alto volumen son los principales impulsores del desarrollo de las biorrefinerías, pero el alto valor de los materiales y los productos químicos como co-productos optimizan la rentabilidad general de las plantas.

Con el fin de lograr una completa competitividad, las biorrefinerías están diseñadas para convertir toda la materia prima en productos, minimizando los residuos generados. Los PHAs tienen el potencial de sustituir a los polímeros derivados del petróleo, convirtiéndolos en un co-producto adecuado para una producción a gran escala compatible con los actuales escenarios de biorrefinería (Snell y Pueblos, 2009). De este modo, los costos de producción de los PHAs pueden reducirse mediante el uso

de flujos de subproductos de biorrefinerías como materia prima más económica. Se ha demostrado con éxito que los flujos de residuos de plantas industriales ya en funcionamiento, como el glicerol de las plantas de biodiesel, los subproductos de la industria alimentaria y las plantas de bioetanol de segunda generación, pueden ser utilizados para la producción de PHAs (Koutinas *et al.*, 2014). Además, dado el creciente interés para el desarrollo industrial de nuevas biorrefinerías, se debe considerar la integración de los PHAs en los nuevos diseños de procesos de refinación aún en etapa de investigación con potencial de ampliación.



**Figura 1.5:** Cepas bacterianas productoras de PHAs

El uso de los flujos de desechos de la biorrefinería como materia prima para obtener biopolímeros a través de la fermentación microbiana (Figura 1.5) reduciría el impacto ambiental negativo de los combustibles fósiles y los plásticos sintéticos. En la Tabla 1.2 se reportan varios trabajos académicos que emplearon diversos desechos

residuales derivados de biorrefinerías como fuentes de carbono para producir PHAs por diferentes cepas bacterianas. Además, se reporta el contenido de biopolímero y el porcentaje de acumulación.

**Tabla 1.2:** Residuos diversos derivados de biorrefinerías para producir PHAs por diferentes microorganismos

Sustrato	Cepa	PHA (g/L)	PHA (%)	Referencia
Bagazo de caña de azúcar	<i>Bacillus cereus</i>	0,3	23,1	(Belal y Farid 2016)
Bagazo de caña de azúcar hidrolizado	<i>Burkholderia glumae</i>	nr	14,9	(de Paula <i>et al.</i> 2021)
Bagazo de caña	<i>Bacillus sp.</i>	5	55,5	(Getachew y Woldesenbet 2016)
Bagazo de caña + licor de maíz fermentado	<i>Lysinibacillus sp.</i>	5,31	61,5	(Saratale <i>et al.</i> 2021)
Bagazo de caña	<i>Klebsiella pneumonia</i> 61	9	nr	(Sirapurapu <i>et al.</i> 2022)
Bagazo de caña	<i>Bacillus safensis</i> EBT1	nr	nr	(Sakthiselvan y Madhumathi 2018)
Bagazo de caña	ART_MKT2E	0,088	55	(Tyagi <i>et al.</i> 2018)
Vinaza pretratada	<i>Haloferax mediterranei</i>	19,7	70	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2012)
Vinaza	<i>Cupriavidus necator</i>	1,33	26	(Zanfonato <i>et al.</i> 2018)
Vinaza	<i>Chlorella sp.</i>	nr	nr	(Budianto <i>et al.</i> 2021)
10 % Vinaza cruda		2,8	23	
100 % Vinaza pretratada	<i>H. marismortui</i>	4,5	30	(Pramanik <i>et al.</i> 2012)

10% Vinaza cruda	<i>Bacillus megaterium</i>	0,25	25,5	(Trapé <i>et al.</i> 2021)
Vinaza y melaza de caña de azúcar	<i>Cupriavidus necátor</i>	11,7	56	(Dalsasso <i>et al.</i> 2019)
Melaza de caña de azúcar y vinaza M/V: 25/75	<i>Cupriavidus necator</i>	3,17	85,9	(Acosta-Cárdenas <i>et al.</i> 2018)
Residuos de trigo	<i>Ralstonia eutropha</i>	7,85	74	(Saratale <i>et al.</i> 2020)

% PHA: cantidad de biopolímero acumulado en relación al peso de biomasa seca

nr: no reportada

La producción de azúcar y bioetanol es una de las principales actividades agroindustriales del norte argentino. En el proceso de producción de bioetanol a partir de caña de azúcar se generan alrededor de 10 a 16 litros de vinaza por cada litro de etanol producido, dependiendo de las condiciones tecnológicas de la destilería. La vinaza es un efluente líquido constituido por 93,5 % de agua, 4,6 % de materia orgánica y 1,9 % de sustancias minerales. Presenta un pH bajo (3,7 a 5), olor característico y con una coloración que varía del amarillo ámbar al marrón oscuro.

En la actualidad, en Tucumán se generan anualmente alrededor de 3.000.000 m<sup>3</sup> de vinaza, dificultando su tratamiento y disposición final. El desecho de vinaza afecta los recursos hídricos, así como la vida de las especies animales y vegetales. La alta concentración de sólidos y componentes como fenoles y polifenoles, contaminan las aguas superficiales y subterráneas. Además, la presencia de vinaza aumenta la eutrofización debido a su alto contenido de nitrógeno y fósforo (Parsae *et al.* 2019). Los compuestos coloreados de la vinaza reducen la permeabilidad de la luz solar en ríos

y lagos, disminuyendo así la actividad fotosintética y la concentración de oxígeno disuelto en el agua generando perturbaciones en la vida vegetal y animal acuática (Syaichurrozi 2016). La vinaza también es tóxica por su bajo pH, tiene un olor desagradable para los humanos y su influencia en el agua potable podría causar malaria, amebiasis y esquistosomiasis. La contaminación por cada litro de vinaza es igual a la contaminación producida por 1,43 seres humanos (Parsaee *et al.* 2019).

Algunos autores han reportado el uso de vinaza como fuente de carbono para la producción de PHAs. Bhattacharyya *et al.* (2012) utilizaron vinaza con *Haloferax mediterranei* para producir PHA e informaron que concentraciones superiores al 10 % de vinaza cruda inhibían el crecimiento microbiano. Por otro lado, Zanfonato *et al.* (2018) realizaron fermentaciones con *C. necator* utilizando vinaza como fuente de carbono y no observaron efecto inhibitorio. Pramanik *et al.* (2012) emplearon vinaza cruda como fuente de carbono para producir PHB con *Haloarcula marismortui* y lograron una acumulación del 23 % del biopolímero (respecto del peso seco celular). Estos autores también destacaron que después de un proceso de pretratamiento mediante adsorción sobre carbón activado, se podría utilizar vinaza llegando a acumular un 30 %. En otros casos, se utilizó *C. necator* como microorganismo productor y una combinación de vinaza y melaza de caña de azúcar (Dalsasso *et al.* 2019, Acosta-Cárdenas *et al.* 2018). Estos autores demostraron que la vinaza puede ser un diluyente apropiado de la melaza para usar como medio de cultivo no convencional en la producción de PHAs.

## 1.2 Objetivos

El **objetivo general** de esta tesis fue optimizar la producción de poli(hidroxialcanoato)s (PHAs) mediante fermentación empleando vinaza como sustrato

(residuo de la industria del bioetanol) y *Bacillus megaterium* como microorganismo productor.

Dentro de los **objetivos específicos** pueden destacarse:

- 1) Optimización de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación para la obtención a escala laboratorio de PHAs a partir de vinaza y *B. megaterium*.
- 2) Evaluación de la factibilidad técnico-económica de la producción de PHAs a partir de vinaza bajo el concepto de biorrefinería.
- 3) Optimización del proceso de secado de vinaza mediante la técnica de aspersión a partir de la maximización del rendimiento del proceso y de la productividad de PHB.
- 4) Caracterización molecular y térmica de los biopolímeros obtenidos.

### 1.3 Referencias

- Acosta-Cárdenas A, Alcaraz-zapata W, Cardona-Betancur M (2018) Sugarcane molasses y vinasse as a substrate for polyhydroxyalkanoates (PHA) production - Melazas y vinaza de la caña de azúcar como sustrato para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA). *RevistasUnalEduCo* 85:220–225. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n206.68279>
- Ahmed T, Shahid M, Azeem F, et al (2018) Biodegradation of plastics: current scenario y future prospects for environmental safety. *Environ Sci Pollut Res* 25(1):1-12. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>
- Al-Kaddo KB, Mohamad F, Murugan P, et al (2020) Production of P(3HB-co-4HB) copolymer with high 4HB molar fraction by *Burkholderia contaminans* Kad1 PHA synthase. *Biochem Eng J*

153:107394. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107394>

Allen L, Cohen MJ, Abelson D, Miller B (2012) Fossil Fuels y Water Quality. In: The World's Water. pp 73–96

Amini M, Sobhani S, Younesi H, Abyar H, Salamatinia B, Mohammadi M (2020) Evaluating the feasibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-biopolymer production from rice wastewater by *Azohydromonas lata*. *Appl Food Biotechnol* 7:73–83. <https://doi.org/10.22037/afb.v7i2.26642>

Ammar EM, El-Sheshtawy HS, El-Shatoury EH, Amer SK (2021) Green synthesis of polyhydroxyalkanoate polymer by *Bacillus iocassae*. *Polym Int* 70:1478–1485. <https://doi.org/10.1002/pi.6219>

Yler R, Pino V, Moya F, Soto E, Valdés C, Yreeßen C (2021) Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source . *Int J Biobased Plast* 3:98–111. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1882049>

Aremu MO, Ishola MM, Taherzadeh MJ (2021) Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from volatile fatty acids (vfas) from organic wastes by *Pseudomonas oleovorans*. *Fermentation* 7: 287 <https://doi.org/10.3390/fermentation7040287>

Aslam T, Saeed S, Tayyab M, et al (2020) Bioconversion of Agricultural Wastes to Polyhydroxybutyrate by *Azotobacter vinelyii*. *Pakistan J Zool* 52: 2227-2231 <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20170216050211>

Bansal KK, Rosenholm JM (2020) Synthetic polymers from renewable feedstocks: An alternative to fossil-based materials in biomedical applications. *Ther Deliv* 11:297–300. <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0033>

Belal EB, Farid MA (2016) Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) by *Bacillus cereus*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 5:442–460. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.507.048>

- Bhatia SK, Gurav R, Choi TR, Jung HR2, Yang SY, Song HS, Jeon JM, Kim JS, Lee YK, YangYH (2019) Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production from engineered *Ralstonia eutropha* using synthetic y anaerobically digested food waste derived volatile fatty acids. Int J Biol Macromol 133:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.083>
- Bhattacharyya A, Pramanik A, Maji SK, Haldar S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012) Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. AMB Express 2:1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-34>
- Bose SA, Raja S, Jeyaram K, Arockiasamy S, Velmurugan S (2020) Investigation of fermentation condition for production enhancement of polyhydroxyalkanoate from cheese whey by *Pseudomonas* sp. J Microbiol Biotechnol Food Sci 9:890–898. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.5.890-898>
- Brigham C (2017) Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. Elsevier Inc.
- Brojanigo S, Parro E, Cazzorla T, Favaro L, Basaglia M, Casella S (2020) Conversion of starchy waste streams into polyhydroxyalkanoates using *Cupriavidus necator* DSM 545. Polymers (Basel) 12:1–12. <https://doi.org/10.3390/polym12071496>
- Budianto GPI, Wibowo YM, Hadiyanto H, Widayat W, Sudjarwo AA (2021) Vinasse as cultivation medium of *Chlorella* sp. to produce poly-hydroxy butyrate in various limited low-cost primary nutrient. E3S Web Conf 226:1-8. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202122600018>
- Busch M, Brouwer H, Aalderink G, Bredeck G, Kämpfer A, Schins R, Bouwmeester H (2023) Investigating nanoplastics toxicity using advanced stem cell-based intestinal y lung in vitro models. Front Toxicol 5: 1112212. <https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1112212>
- Butt FI, Muhammad N, Hamid A, Moniruzzaman M, Sharif F (2018) Recent progress in the utilization of biosynthesized polyhydroxyalkanoates for biomedical applications – Review. Int J Biol Macromol 120:1294–1305. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.002>

- Catota WA, Lucio-Quintana A, Muñoz MG, Bayas-Morejón F (2022) Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Using the bacterium *Ralstonia eutropha* to obtain bioplastic. *J Hunan Univ Nat Sci* 49:137–144. <https://doi.org/10.55463/issn.1674-2974.49.5.15>
- Chen J, Li W, Zhang ZZ, Tan TW, Li ZJ (2018) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of polyhydroxyalkanoates using acetate as a main carbon source. *Microb Cell Fact* 17:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0949-0>
- Choi T, Park Y, Song H, Lee SM, 1, Park SL, Lee HS, Kim HJ, Bhatia SK, Gurav R, Choi KY, Lee YK, Yang YH (2021) Fructose-Based Production of Short-Chain-Length y Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer by Arctic *Pseudomonas* sp. B14-6. *Polymers (Basel)*
- Choi TR, Jeon JM, Bhatia SK, Gurav R, Han YH, Park YL, Park JY, Song HS, Park HY, Yoon JJ, Seo SO, Yang YH (2020) Production of Low Molecular Weight P(3HB-co-3HV) by Butyrateacetoacetate CoA-transferase (cftAB) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 25:279–286. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0366-1>
- Dalsasso RR, Pavan FA, Bordignon SE, de Aragão GMF, Poletto P (2019) Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse y molasses as mixed substrate. *Process Biochem* 85:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>
- Das S, Majumder A, Shukla V, Suhazsini P, Radha P (2018) Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) from Cheese Whey by *Bacillus megaterium* NCIM 5472. *J Polym Environ* 26:4176–4187. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1288-2>
- de Paula CBC, de Paula-Elias FC, Rodrigues MN, Fontes Coelho L, Morgana Lima de Oliveira N, de Almeida AF, Contiero J (2021) Polyhydroxyalkanoate Synthesis by *Burkholderia glumae* into a Sustainable Sugarcane Biorefinery Concept. *Front Bioeng Biotechnol* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.631284>
- Dietrich K, Dumont MJ, Del Rio LF, Orsat V (2017) Producing PHAs in the bioeconomy — Towards

<https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>

El-malek FA, Farag A, Omar S, Khairy H (2020) Polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Halomonas pacifica* ASL10 y *Halomonas salifodiane* ASL11 isolated from Mariout salt lakes. Int J Biol Macromol 161:1318–1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.258>

El-Nahrawy S, Abd El-Kodoos RY, Belal E-SB, El-Shouny W (2018) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Azospirillum* y *Rhizobium* sp. Environ Biodivers Soil Secur 2:1–25. <https://doi.org/10.21608/jenvbs.2019.6781.1044>

Ertan F, Keskinler B, Tanriseven A (2021) Exploration of *Cupriavidus necator* ATCC 25207 for the Production of Poly(3-hydroxybutyrate) Using Acid Treated Beet Molasses. J Polym Environ 29:2111–2125. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02020-2>

Evangelina S, Sridharan TB (2019) Biosynthesis y statistical optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus cereus* VIT-SSR1 y fabrication of biopolymer films for sustained drug release. Int J Biol Macromol 135:945–958. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.163>

Fredi G, Dorigato A (2021) Recycling of bioplastic waste: A review. Adv Ind Eng Polym Res 4:159–177. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2021.06.006>

Getachew A, Woldesenbet F (2016) Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. BMC Res Notes 9:1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>

Ghosh S, Coons J, Yeager C, et al (2022) Halophyte biorefinery for polyhydroxyalkanoates production from *Ulva* sp. hydrolysate with *Haloferax mediterranei* in pneumatically agitated bioreactors y ultrasound harvesting. Bioresour Technol 344:125964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125964>

- Gómez-Hernández E, Salgado-Lugo H, Segura D, García A, Díaz-Barrera A, Peña C (2021) Production of Poly-3-Hydroxybutyrate (P3HB) with Ultra-High Molecular Weight (UHMW) by Mutant Strains of *Azotobacter vinelyii* Under Microaerophilic Conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 193:79–95. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03384-w>
- Idi A (2019) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate. *Int J Res* 7:200–206. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3358073>
- Ino K, Sato S, Ushimaru K, Saika A, Fukuoka T, Ohshiman K, Morita T (2020) Mechanical properties of cold-drawn films of ultrahigh-molecular-weight poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Haloferax mediterranei*. *Polym J* 52:1299–1306. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-0379-9>
- Insomphun C, Mifune J, Orita I, Numata K, Nakamura S, Fukui T (2014) Modification of  $\beta$ -oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil. *J Biosci Bioeng* 117:184–190. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.016>
- Israni N, Shivakumar S (2020) Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from directly valorized ragi husk y sesame oil cake by *Bacillus megaterium* strain Ti3: Statistical optimization y characterization. *Int J Biol Macromol* 148:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.082>
- Jeffry L, Ong MY, Nomanbhay S, Mofijur M, Mubashir M, Show PL (2021) Greenhouse gases utilization: A review. *Fuel* 301. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121017>
- Jeon JM, Brigham CJ, Kim YH, Kim HJ, Yi DH, Kim H, Rha C, Sinskey A, Yang YH (2014) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (P(HB-co-HHx)) from butyrate using engineered *Ralstonia eutropha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5461–5469. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5617-7>
- Jung HR, Jeon JM, Yi DH, Song HS, Yang SY, Choi TR, Bhatia SK, Yoon JJ, Kim YG, Brigham C, Yang

- YH (2019) Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolymer production from volatile fatty acids using engineered *Ralstonia eutropha*. *Int J Biol Macromol* 138:370–378. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.091>
- Kanavaki I, Drakonaki A, Geladas ED, Spyros A, Xie H, Tsiotis G (2021) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas* sp. phdv1 strain grown on phenol as carbon sources. *Microorganisms* 9:16-36. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636>
- Kehail AA, Foshey M, Chalivendra V, Brigham CJ (2015) Thermal y mechanical characterization of solvent-cast poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *J Polym Res* 212:1-8. <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0872-6>
- Khunthongkaew P, Murugan P, Sudesh K, lewkittayakorn J (2018) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates using *Cupriavidus necator* H16 y its application for particleboard production. *J Polym Res* 25:131-140. <https://doi.org/10.1007/s10965-018-1521-7>
- Kim T, Kim J, Chung C (2021) Production of Medium-chain-length Poly ( 3-hydroxyalkanoates ) by *Pseudomonas* sp . EML8 from Waste Frying Oil. 31:90–99. <https://doi.org/10.5352/JLS.2021.31.1.90>
- Kniewel R, Lopez OR, Prieto MA (2019) Biogenesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. In: *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids y Membranes, Hybook of Hydrocarbon y Lipid Microbiology*. pp 457–481 Springer, Cham
- Koller M, Atlíć A, Dias M, Reiterer A, Braunegg G (2010) Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. 14:85–119. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5)
- Kumar L, Kumar LR, Giri N, Kumar Kashyap B (2020) Waste to Energy: Prospects y Applications. *Waste to Energy Prospect Appl*. VIII, 438 <https://doi.org/10.1007/978-981-33-4347-4>
- Lee SY (1996) Plastic bacteria? Progress y prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol* 14:431–438. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5)

- Lemos Delgado AC, Mina Cordoba A (2015) Polihidroxiálcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Inf Técnico* 79:93–101. <https://doi.org/10.23850/22565035.139>
- Liu C, Wang X, Yang H, Liu C, Zhang Z, Chen G (2021) Biodegradable polyhydroxyalkanoates production from wheat straw by recombinant *Halomonas elongata* A1. *Int J Biol Macromol* 187:675–682. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.137>
- Mascarenhas J, Aruna K (2019) Effect of Physical Treatment on the Physicochemical, Rheological y Functional Properties of Yam Meal of the Cultivar “Ngumvu” From *Dioscorea alata* L. of Congo. *Int J Recent Sci Res* 10:30693–30695. <https://doi.org/10.24327/IJRSR>
- Meereboer KW, Misra M, Mohanty AK (2020) Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics y their composites. *Green Chem* 22:5519–5558. <https://doi.org/10.1039/d0gc01647k>
- Melanie S, Winterburn JB, Devianto H (2018) Production of Biopolymer Polyhydroxyalkanoates (PHA) by Extreme Halophilic Marine Archaea *Haloferax mediterranei* in Medium with Varying Phosphorus Concentration. *J Eng Technol Sci* 50:255–271. <https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2017.50.2.7>
- Miao C, Meng D, Liu Y, Wang F, Chen L, Huang Z, Fan X, Gu P, Li Q (2021) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in metabolically recombinant *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol* 193:956–964. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.183>
- Morya R, Kumar M, Thakur IS (2018) Utilization of glycerol by *Bacillus* sp. ISTVK1 for production y characterization of Polyhydroxyvalerate. *Bioresour Technol Reports* 2:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.03.002>
- Moshood TD, Nawanir G, Mahmud F, Mohamad F, Ahmad MH, AbdulGhani A (2022) Sustainability of biodegradable plastics: New problem or solution to solve the global plastic pollution? *Curr Res Green Sustain Chem* 5: 100273.

<https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100273>

Muneer F, Rasul I, Azeem F, et al (2020) Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *J Polym Environ* 28:2301–2323.

<https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1>

Muniyyi K, Punamalai G (2021) Isolation y chracterization of polyhydroxybutirate (PHB) producing novel bacteria *Pseudomonas canadensis* by using tapioca powderas nutrient source. *African Journal of Biotechnology* 10: 4907-4919. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1737>

Nya S, Patra BR, Patel R, Bakos J, Dalai A (2022) Innovations in applications y prospects of bioplastics y biopolymers: a review. *Environ Chem Lett* 20:379–395.

<https://doi.org/10.1007/s10311-021-01334-4>

Narayanan M, Kumarasamy S, Ranganathan M, Kyasamy S, Kyasamy G, Gnanavel K, Mamtha K (2020) Production y characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized by *E. coli* Isolated from sludge soil. *Mater Today Proc* 33:3646–3653.

<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.725>

Nigmatullin R, Thomas P, Lukasiewicz B, Puthussery H, Roy I (2015) Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, y their applications in drug delivery. *J Chem Technol Biotechnol* 90:1209–1221. <https://doi.org/10.1002/jctb.4685>

Nygaard D, Yashchuk O, Hermida EB (2021) PHA granule formation y degradation by *Cupriavidus necator* under different nutritional conditions. *J Basic Microbiol* 61:825–834.

<https://doi.org/10.1002/jobm.202100184>

Obruca S, Sedlacek P, Slaninova E, Fritz I, Daffert C, Meixner K, Sedrlova Z, Koller M (2020) Novel unexpected functions of PHA granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:4795–4810.

<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>

- Oliveira-Filho ER, de Macedo MA, Lemos ACC, Adams F, Merkel OM, Taciro MK, JG Gomez, Silva LF (2022) Engineering *Burkholderia sacchari* to enhance poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] production from xylose y hexanoate. *Int J Biol Macromol* 213:902–914. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.024>
- Osman Y, Abd Elrazak A, Khater W (2016) Microbial biopolymer production by *Microbacterium* WA81 in batch fermentation. *Egypt J Basic Appl Sci* 3:250–262. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.05.001>
- Padilla-Córdova C, Mongili B, Contreras P, Fino D, Tommasi T (2020) Productivity y scale-up of poly(3-hydroxybutyrate) production under different oxygen transfer conditions in cultures of *Azotobacter vinelyii*. *J Chem Technol Biotechnol* 95:3034–3040. <https://doi.org/10.1002/jctb.6465>
- Pan L, Li J, Wang R, Wang Y, Lin Q, Li C, Wang Y (2021) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate from food waste oil by *Pseudomonas alcaligenes* with simultaneous energy recovery from fermentation wastewater. *Waste Manag* 131:268–276. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.06.008>
- Pernicova I, Kucera D, Nebesarova J, Kalina M, Novackova I, Koller M, Obruca S (2019) Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains. *Bioresour Technol* 292:122028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122028>
- Ponnusamy S, Viswanathan S, Periyasamy A, Rajaiah S (2019) Production y characterization of PHB-HV copolymer by *Bacillus thuringiensis* isolated from *Eisenia foetida*. *Biotechnol Appl Biochem* 66:340–352. <https://doi.org/10.1002/bab.1730>
- Prados E, Maicas S (2016) Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Univers J Microbiol Res* 4:23–30. <https://doi.org/10.13189/ujmr.2016.040104>
- Pramanik A, Mitra A, Arumugam M, Bhattacharyya A, Sadhukhan S, Ray A, Haldar S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012) Utilization of vinasse for the production of

- polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. Folia Microbiol (Praha) 57:71–79.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-011-0092-3>
- Priya A, Hathi Z, Haque MA, Kumar S, Kumar A, Singh E, Lin CSK (2022) Effect of levulinic acid on production of polyhydroxyalkanoates from food waste by *Haloferax mediterranei*. Environ Res 214:114001. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114001>
- Raho S, Carofiglio VE, Montemurro M, Miceli V, Centrone D, Stufano S, Schioppa M, Pontonio E, Giuseppe Rizzello C (2020) Production of the polyhydroxyalkanoate PHBV from ricotta cheese exhausted whey by *Haloferax mediterranei* fermentation. Foods 9: 1459.  
<https://doi.org/10.3390/foods9101459>
- Reddy MV, Watanabe A, Onodera R, Mawatari Y, Tsukiori Y, Watanabe A, Kudou M, Chang YC (2020) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using single or mixture of fatty acids with *Bacillus* sp. CYR1: Identification of PHA synthesis genes. Bioresour Technol Reports 11:100483. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100483>
- Riaz S, Rhee KY, Park SJ (2021) Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biopolymers for biofuel y biorefineries. Polymers (Basel) 13:1–21. <https://doi.org/10.3390/polym13020253>
- Sabarinathan D, Chyrika SP, Venkatraman P, Easwaran M, Sureka CS, Preethi K (2018) Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* y its application towards cancer detection. Informatics Med Unlocked 11:61–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.04.009>
- Sakthiselvan P, Madhumathi R (2018) Kinetic evaluation on cell growth y biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus safensis* EBT1 from sugarcane bagasse. Eng Agric Environ Food 11:145–152. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2018.03.003>
- Saratale GD, Saratale RG, Varjani S, Cho SK, Ghodake GS, Kadam A, Mulla SI, Naresh Bharagava R, Kim DS, Shin HS (2020) Development of ultrasound aided chemical pretreatment methods to enrich saccharification of wheat waste biomass for polyhydroxybutyrate

- production y its characterization. *Ind Crops Prod* 150:112425.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112425>
- Saratale RG, Cho SK, Saratale GD, Ghodake GS, Bharagava RN, Kim DS, Nair S, Shin HS (2021) Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus* sp. y its characterization. *Bioresour Technol* 324:124673.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124673>
- Sato S, Ino K, Ushimaru K, Wada K, Saika A, Fukuoka T, Ohshiman K, Morita T (2021) Evaluating haloarchaeal culture media for ultrahigh-molecular-weight polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Haloferax mediterranei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:6679–6689.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11508-3>
- Scott F, Yañez L, Conejeros R, Araya B, Vergara A (2021) Two internal bottlenecks cause the overflow metabolism leading to poly(3-hydroxybutyrate) production in *Azohydromonas lata* DSM1123. *J Environ Chem Eng* 9: 105665 <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105665>
- Semeniuk I, Pokynbroda T, Kochubei V, Midyana H, Karpenko O, Skorokhoda V (2020) Biosynthesis y characteristics of polyhydroxyalkanoates. 1. polyhydroxybutyrates of *Azotobacter vinelyii* n-15. *Chem Chem Technol* 14:463–467.  
<https://doi.org/10.23939/chcht14.04.463>
- Shi LL, Da YY, Zheng WT, Chen GQ, Li ZJ (2020) Production of polyhydroxyalkanoate from acetate by metabolically engineered *Aeromonas hydrophilia*. *J Biosci Bioeng* 130:290–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.05.003>
- Sirapurapu A, KVN V, Shivshetty N, Poosarla VG (2022) Production y Characterization of Biodegradable Polymer-Polyhydroxybutyrate from Agricultural Waste-Sugarcane Bagasse by the Novel Marine Bacterium *Klebsiella pneumoniae* G1. *SSRN Electron J* 1–21.  
<https://doi.org/10.2139/ssrn.4131064>
- Sohn YJ, Kim HT, Baritugo KA, Jo SJ, Song HM, Park SY, Park SK, Pyo J, Cha HG, Kim H, Na JG, Park

- C, Choi J, Joo JC, Park SJ (2020) Recent Advances in Sustainable Plastic Upcycling y Biopolymers. *Biotechnol J* 15:1–16. <https://doi.org/10.1002/biot.201900489>
- Stanley A, Punil Kumar HN, Mutturi S, Vijayendra SVN (2018) Fed-Batch Strategies for Production of PHA Using a Native Isolate of *Halomonas venusta* KT832796 Strain. *Appl Biochem Biotechnol* 184:935–952. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2601-6>
- Šuput D, Popović S, Ugarković J, Hromiš N (2022) Application of life cycle assessment in the packaging sector for the environmental assessment of polymer y biopolymer based materials: A review. *J Process Energy Agric* 26:75–78. <https://doi.org/10.5937/jpea26-39342>
- Tan GYA, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Mo Y, Wang JY (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers (Basel)* 6:706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Tarrahi R, Fathi Z, Seydibeyoğlu MÖ, Doustkhah E, Khataee A (2020) Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture. *Int J Biol Macromol* 146:596–619. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.181>
- Thomas CM, Scheel RA, Nomura CT, Ramarao B, Kumar D (2021) Production of polyhydroxybutyrate y polyhydroxybutyrate-co-MCL copolymers from brewer's spent grains by recombinant *Escherichia coli* LSBJ. *Biomass Convers Biorefinery* <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01738-w>
- Thompson TM, Shepherd D, Stacy A, Barna MG, Schichte BA (2017) Modeling to Evaluate Contribution of Oil y Gas Emissions to Air Pollution. *J Air Waste Manag Assoc* 67:445–461. <https://doi.org/10.1080/10962247.2016.1251508>
- Torabi H, Mosleh I, Davachi SM, Davaritouchaee M, Abbaspourrad A (2021) Xylose-rich Horse Manure Hydrolysate as the Sole Carbon Source for Bacterial Production of Polyhydroxy Butyrate Using Engineered *Escherichia coli*. *ACS Sustain Chem Eng* 9:8946–8950.

<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c03521>

Trapé D V., López O V., Villar MA (2021) Vinasse: from a residue to a high added value biopolymer. *Bioresour Bioprocess* 8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00476-1>

Tyagi P, Kumar Saxena N, Sharma A (2018) Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 6:246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>

Uribe Acosta M, Felipe A, Restrepo V (2019) In silico-analysis of phag-like protein in *Ralstonia eutropha* H16, potentially involved in polyhydroxyalkanoates synthesis. *Rev Politécnica* 15:55–64. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v15n29a5>

Urtuvia V, Maturana N, Peña C, Díaz-Barrera A (2020) Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelyii* with different 3HV fraction in shake flasks y bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 43:1469–1478. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02340-6>

Vu DH, Wainaina S, Taherzadeh MJ, Åkesson D, Ferreira JA (2021) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus megaterium* using food waste acidogenic fermentation-derived volatile fatty acids. *Bioengineered* 12:2480–2498. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1935524>

Wang B, Sharma-Shivappa RR, Olson JW, Khan SA (2013) Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Ind Crops Prod* 43:802–811. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.011>

Wang K, Zhang R (2021) Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Haloferax mediterranei* from food waste derived nutrients for biodegradable plastic applications. *J Microbiol Biotechnol* 31:338–347. <https://doi.org/10.4014/JMB.2008.08057>

Wu F, Zhou Y, Pei W, Jiang Y, Yan X, Wu H (2022) Biosynthesis of Poly-(3-hydroxybutyrate) under

the Control of an Anaerobically Induced Promoter by Recombinant *Escherichia coli* from Sucrose. *Molecules* 27:294 . <https://doi.org/10.3390/molecules27010294>

Yahya EB, Jummaat F, Amirul AA, Adnan AS, Olaiya NG, Abdullah CK, Rizal S, Haafiz MK Abdul Khalil HPS (2020) A Review on Revolutionary Natural Biopolymer-Based Aerogels for Antibacterial Delivery. *Antibiotics* 9:648 <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100648>

Yasin AR, Al-Mayaly I k. (2021) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a newly isolated strain *Bacillus tequilensis* ARY86 using inexpensive carbon source. *Bioresour Technol Reports* 16: 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100846>

Yu LP, Yan X, Zhang X, Chen XB, Wu Q, Jiang XR, Chen GQ (2020) Biosynthesis of functional polyhydroxyalkanoates by engineered *Halomonas bluephagenesis*. *Metab Eng* 59:119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.02.005>

Zanfonato K, Schmidt M, Quines LK, Gai Santos C, Schmidell W, Falcão de Aragão GM (2018) Can vinasse be used as carbon source for Poly(3-hydroxybutyrate). Production by *Cupriavidus necator* DSM 545. *Brazilian J Chem Eng* 35:901–908 <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170265>

## Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

---

### 2.1 Introducción

Existen diversas especies bacterianas capaces de sintetizar poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), siendo las más utilizadas en la producción de estos biopolímeros las pertenecientes a los géneros *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Aeromonas* y *Bacillus*. Cada una de estas especies tiene ventajas y desventajas específicas en cuanto a la producción de PHAs y la elección dependerá de factores tales como la disponibilidad de sustratos, la calidad deseada del producto y el costo de producción. Aunque la mayoría de las bacterias pueden acumular PHAs en un rango del 30 al 50 % del peso de célula seca, *Cupriavidus necator* es capaz de acumular más del 90 % (Tsuge *et al.* 2015).

Sin embargo, desde el hallazgo del poli (hidroxibutirato) (PHB) en *Bacillus megaterium* por el investigador francés Lemoigne en 1926 (Aristya *et al.* 2022), el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado en relación a su capacidad para sintetizar PHAs. La estabilidad genética de las especies *Bacillus* los convierte en organismos modelo tanto en la industria como en el mundo académico (Biedendieck *et al.* 2007). Además, las especies de *Bacillus* son abundantes, incluso en condiciones ecológicas extremas, y poseen una mayor tasa de crecimiento en comparación con otras bacterias. Otra ventaja del género *Bacillus* es que se trata de bacterias Gram-positivas, lo que favorece la

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

extracción de PHAs debido a la ausencia de una membrana externa de lipopolisacáridos en la membrana celular.

El predominio en la naturaleza y la falta de la capa de lipopolisacáridos son ventajas añadidas para el uso de especies de *Bacillus* en la producción de biopolímeros a escala industrial. Dado que la mayoría de las especies de *Bacillus* son reconocidas como seguras por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), un beneficio adicional es su potencial uso en aplicaciones biomédicas (Mohapatra *et al.* 2017).

El principal inconveniente de las especies de *Bacillus* para su implementación a nivel industrial en la producción de PHAs es su naturaleza esporulante. La esporulación es un proceso de supervivencia que desarrollan los organismos de este género cuyo encuentran limitaciones nutricionales, formando un complejo inmune a diversas condiciones adversas como valores extremos de pH y altas temperaturas. Desafortunadamente el mismo proceso que estimula la acumulación de PHAs, conlleva también a la esporulación como medio de supervivencia. Es por ello que los niveles de PHAs acumulados en *Bacillus* son marcadamente menores que aquellos obtenidos en microorganismos Gram negativos como *Cupriavidus necator* y *Alcaligenes latus*. Sin embargo, se ha demostrado que se pueden alcanzar mejores productividades en cepas *Bacillus* cuyo se hace una correcta búsqueda del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación (López *et al.* 2012).

Las especies de *Bacillus* reportadas como productoras nativas de PHAs son las siguientes: *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aryabhatai*, *B. badius*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. odyssey*, *B. pasteurii*, *B.*

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxitirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

*pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* (Tsuge *et al.* 2015). Particularmente, *Bacillus licheniformis* M2-12 ha mostrado el nivel más alto de acumulación de PHAs, con un 88,7 % respecto a la masa de célula seca (Sangkharak y Prasertsan 2013).

En los diferentes estudios que emplean cepas de *Bacillus* para la producción de PHAs, se observa una considerable variación en la composición de los medios, el rendimiento del biopolímero y la productividad reportada. Por otra parte, la producción de PHAs a gran escala se ve afectada principalmente por el costo de la materia prima (Mohapatra *et al.* 2017). Debido a esto, la rentabilidad de la producción de PHAs está estrechamente relacionada con el desarrollo de tecnologías de fermentación eficientes que utilicen fuentes de carbono de bajo costo. En este sentido, las cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de secretar diversas enzimas extracelulares, como  $\alpha$ -amilasas y proteasas, lo que les permite utilizar directamente polisacáridos y polipéptidos para su crecimiento celular y la acumulación de PHAs (Halami 2008). Estas cepas pueden ser utilizadas para la producción rentable de PHAs, aprovechando materiales de desecho agroindustriales y otras materias primas de bajo costo. Varios autores han reportado la amplia variedad de fuentes de carbono asimilables por algunas cepas de *Bacillus* a partir de recursos renovables o residuos provenientes de la biomasa para producir poli(hidroxitirato) (PHB), uno de PHAs más conocidos. En la Tabla 2.1 se resumen algunas de las cepas y fuente de carbono utilizadas para la obtención de PHB.

**Tabla 2.1:** Producción de PHB a partir de *Bacillus* y fuentes de carbono de bajo.

Bacteria	Fuente de carbono	PHB (g/L)	PHB (%)	Productividad (g/L h)	Referencia
<i>Bacillus cereus</i>	Melaza caña de azúcar	nr	68,78	n.r	(Suryawanshi <i>et al.</i> 2020)
<i>Bacillus flexus</i>	Suero de queso	0,95	20,96	0,0132	(Khattab <i>et al.</i> 2021)
<i>Bacillus sp. CYR1</i>	Ác. acético + ac. propiónico + ac. butírico + ac. caproico	n.r	33	n.r	(Reddy <i>et al.</i> 2020)
<i>Bacillus megaterium</i> R11	Frutos de palma aceitera	9,32	58,5	0,194	(Zhang <i>et al.</i> 2013)
<i>Bacillus megaterium</i> UMTKB-1	Glicerol	0,77	49	0,0035	(Mohd Yatim <i>et al.</i> 2017)
<i>Bacillus megaterium</i> UMTKB-1	Melaza de caña de azúcar	0,29	15	0,0031	(Mohd Yatim <i>et al.</i> 2017)
<i>Bacillus megaterium</i> UMTKB-1	Agua dulce	0,04	9	0,0008	(Mohd Yatim <i>et al.</i> 2017)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Cáscara de uva pretratada	0,53	18,8	0,0073	(Yler <i>et al.</i> 2021)

Los PHAs se consideran como posibles sustitutos de los plásticos derivados de productos petroquímicos. Sin embargo, el mayor desafío para una producción económica de PHAs es la bioconversión de sustratos de bajo costo. La optimización del proceso de fermentación es otra forma de reducir los costos de PHAs. La optimización por métodos estadísticos, en comparación con el método común de “un factor a la vez”, demostró ser una herramienta poderosa y útil para predecir el rendimiento máximo para la síntesis de bioproductos. Los métodos estadísticos, como la metodología de superficie de respuesta, permiten diseñar los experimentos y evaluar las interacciones

entre los factores y las respuestas a lo largo del estudio (Nor *et al.* 2017). Según Nygaard *et al.* (2019), en el caso de procesos de fermentación microbológica para producir PHAs, se puede utilizar la metodología de superficie de respuesta para determinar la composición del medio de cultivo que proporcione una productividad óptima de PHAs. Antes de utilizar el enfoque de la metodología de superficie de respuesta, se debe seleccionar el diseño experimental correcto para designar qué tratamientos se deben realizar en la región experimental que se está estudiando. Para ello, se deben aplicar diseños experimentales para superficies de respuesta cuadrática, como factorial de tres niveles, compuesto central y Box-Behnken (Yolmeh y Jafari 2017). Una comparación entre el diseño de Box-Behnken y otros diseños de superficie de respuesta (compuesto central y diseño factorial completo de tres niveles) demostró que el diseño de Box-Behnken es ligeramente más eficiente que el diseño compuesto central pero mucho más eficiente que los diseños factoriales completos de tres niveles (Ferreira *et al.* 2007).

El objetivo de este capítulo fue optimizar la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para obtener PHB a escala de laboratorio, empleando *Bacillus megaterium* como cepa productora y vinaza como sustrato. Para determinar la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación que proporcionen una productividad óptima de PHB, se aplicó un diseño Box-Behnken.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Cepa bacteriana

Las fermentaciones para la producción de PHB se llevaron a cabo con *B. megaterium* (número de acceso a la base de datos GenBank: HM119600.1), denominado BBST4. Esta cepa, aislada de sedimentos del Estuario de Bahía Blanca (38°45' y 39°40' S

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

y 61°45' y 62°20' O, Buenos Aires, Argentina), fue identificada y caracterizada por López Jimenez (2012). Esta bacteria fue conservada a -20 °C en viales individuales que contenían aproximadamente 1 mL de medio nutritivo (MN) (peptona de carne 5 g.L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 3 g.L<sup>-1</sup>) con un 20 % de glicerol puro.

### 2.2.2 Sustrato

Como sustrato se empleó vinaza suministrada por una empresa sucro-alcoholera situada en Famaillá (Tucumán, Argentina). Para el desarrollo de este capítulo se utilizaron dos muestras de vinaza identificadas como V<sub>2017</sub> y V<sub>2018</sub>. Con el fin de eliminar el material particulado, las muestras de vinaza se sometieron a una centrifugación a 8.000 rpm durante 7 minutos. Posteriormente, se almacenó a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

Las muestras de vinaza se caracterizaron fisicoquímicamente mediante la determinación de: Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Carbono Orgánico Total (COT), Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK) y pH. Parte de estos estudios (DBO, DQO y COT) se realizaron en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Argentina), mediante diferentes métodos estándar.

La DBO consiste en determinar la concentración del oxígeno disuelto consumida por la degradación microbiana (en condiciones aeróbicas) de la materia orgánica presente en una muestra en un determinado periodo de tiempo y temperatura específicos. La DBO fue determinada por el método de Winkler (Prambudy *et al.* 2019) que consiste en verter un volumen conocido de muestra en el interior de una botella con cierre hermético. A medida que pasa el tiempo las bacterias consumen el oxígeno

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

de la muestra, que es reemplazado por el de la cámara de aire que queda por encima del líquido. El CO<sub>2</sub> producido por la actividad bacteriana es eliminado por adición en la junta de goma de una disolución de KOH. Como resultado se produce una caída de la presión de aire en el interior de la botella que es medido por un sensor y convertido en mg.L<sup>-1</sup> de DBO.

La DQO es la cantidad de oxígeno obtenido a partir de oxidantes químicos necesarios para la oxidación completa de sustancias disueltas o suspendidas. La determinación de la DQO fue realizada por el método estándar de dicromato de potasio (Burke y Mavrodineanu 1977); el cual permite evaluar cuantitativamente las sustancias oxidables por oxidantes fuertes como el dicromato de potasio en disoluciones fuertemente ácidas de sulfúrico concentrado. Tanto las sustancias orgánicas como inorgánicas pueden ser oxidadas. La oxidación obtenida al medir la DQO es más fuerte que la de la DBO, por lo que normalmente las concentraciones de DQO son más altas. La determinación de la DQO consiste en una valoración por retroceso añadiendo una concentración conocida y en exceso de dicromato. La cantidad de sustancias oxidables presentes en una muestra dada es directamente proporcional a la cantidad de dicromato consumido.

Para medir el contenido de COT se utilizó un analizador de COT (CE440 de Exeter Analytical). El método se basa en la oxidación por combustión catalítica a 680 °C. El CO<sub>2</sub> generado es detectado por un detector de infrarrojo no dispersivo (NDIR) y este valor se relaciona con el carbono total mediante una curva de calibración (previamente obtenida con una disolución estándar). Para medir el carbono inorgánico se acidifica la muestra, lo que transforma solamente los carbonatos y bicarbonatos en CO<sub>2</sub>, que es

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

detectado por el NDIR. La concentración total de carbono orgánico se obtiene al restar el carbono inorgánico del total.

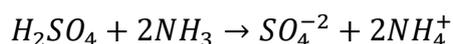
El NT se determinó por el método Kjeldahl (Bradstreet 1954). Este método se divide en tres etapas: digestión, destilación y valoración. El objetivo del procedimiento de digestión es romper todos los enlaces de nitrógeno de la muestra y convertir el nitrógeno unido orgánicamente en iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).



El carbono orgánico y el hidrógeno forman  $\text{CO}_2$  y agua. La digestión se realiza mezclando la muestra con ácido sulfúrico a temperaturas entre 350 y 380 °C. Se añade sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico y se añaden catalizadores para aumentar la velocidad y la eficiencia del procedimiento de digestión. Finalizada la digestión, se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente, se diluye con agua y se trasvasa a la unidad de destilación. Durante el proceso de destilación, los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se convierten en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) mediante la adición de un álcali ( $\text{NaOH}$ ).



El amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) es arrastrado al vaso receptor por medio de una corriente de vapor de agua. El vaso receptor del destilado se llena con una solución de ácido sulfúrico para capturar el gas amoníaco disuelto.



El ácido sulfúrico residual (es decir, el exceso que no reacciona con  $\text{NH}_3$ ) se valora con una solución de hidróxido de sodio y la cantidad de amoníaco se calcula por diferencia.

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono



El pH de las muestras de vinaza se midió usando un medidor de pH Sensorex.

### 2.2.3 Medios de cultivo

Se preparó un medio de cultivo siguiendo la formulación reportada por López Jimenez (2011): 2,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 0,5 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 10 g.L<sup>-1</sup> de carbono. A partir del valor de COT de las muestras de vinaza se calculó la cantidad de sustrato a añadir para alcanzar la concentración de carbono establecida. Por otra parte, el pH del medio fue ajustado a 7,0 con NaOH 2,5 M.

### 2.2.4 Fermentaciones para la producción de PHB

Todas las fermentaciones bacterianas fueron inoculadas con 1 mL de MN, el cual fue inoculado 24 h antes en Erlenmeyers de 250 mL en un agitador orbital a 200 rpm y 33 °C utilizó un vial con la cepa bacteriana. Es importante destacar que, todos los componentes necesarios para la biosíntesis de PHB se sometieron a esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, exceptuando la vinaza para evitar su degradación. La vinaza, por su parte, se esterilizó mediante filtración utilizó una membrana de 0,22 µm de poro. Durante el transcurso de las fermentaciones en Erlenmeyers se realizó un muestreo con el objetivo de cuantificar las concentraciones de biomasa, glucosa y PHB cuyos resultados se muestran en el Capítulo 5.

### 2.2.5 Optimización de la composición de los medios de cultivo y de las condiciones de fermentación

Para la optimización de la composición de los medios de cultivo y las condiciones de fermentación se empleó un diseño experimental de Box-Behnken y una metodología de superficie de respuesta.

Para optimizar la composición de los medios de cultivo, se eligieron tres variables independientes: concentración de carbono (C), concentración de nitrógeno (N) y concentración de fósforo (F), las cuales se prescribieron en 3 niveles de código: -1, 0, 1 (Tabla 2.2). Los rangos de las concentraciones de C, N y F se seleccionaron en base a datos reportados en trabajos previos (Acosta-Cárdenas *et al.* 2018, Wang *et al.* 2013, Berekaa y Al Thawadi 2012).

**Tabla 2.2.:** Niveles de factores para las variables independientes (C, N y F) y para las condiciones de fermentación (C/N, T y t) para la producción de PHB por *B. megaterium* utilizando vinaza como sustrato

<b>Composición de los medios de cultivo</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Carbono (C) (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrogeno (N) (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fosforo (F) (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Alto (+1)</b>	8	0,40	1,20
<b>Central (0)</b>	6	0,25	1,05
<b>Bajo (-1)</b>	4	0,10	0,90
<b>Condiciones de fermentación</b>			
<b>Nivel</b>	<b>Carbono/Nitrógeno (C/N)</b>	<b>Temperatura (T) (°C)</b>	<b>tiempo (t) (h)</b>
<b>Alto (+1)</b>	40	37,0	72
<b>Central (0)</b>	30	33,5	48
<b>Bajo (-1)</b>	20	30,0	24

**C:** concentración de carbono; **N:** concentración de nitrógeno; **P:** concentración de fósforo. **C/N:** relación carbono/nitrógeno; **T:** temperatura de fermentación; **t:** tiempo de fermentación

Las concentraciones de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaCl$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  se mantuvieron de acuerdo a la formulación propuesta por López Jimenez (2011); mientras que las concentraciones de  $NH_4NO_3$ ,  $KH_2PO_4$  y vinaza se ajustaron de acuerdo al diseño experimental.

La matriz de diseño para 15 experimentos se presenta en la Tabla 2.3. La variable de respuesta fue la productividad de PHB (expresada en  $g \cdot L^{-1} h^{-1}$ ). En los ensayos experimentales, los cultivos se incubaron en Erlenmeyers de 250 mL, que contenían 100 mL de cada medio de cultivo dado por el diseño experimental, a 33 °C durante 24 h y 200 rpm en un agitador orbital.

**Tabla 2.3:** Valores de los factores para las variables independientes (C, N y F) para optimizar la composición de los medios de cultivo para la producción de PHB por *B. megaterium* utilizando vinaza como sustrato

Corrida	C ( $g \cdot L^{-1}$ )	N ( $g \cdot L^{-1}$ )	F ( $g \cdot L^{-1}$ )
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

C: concentración de carbono; N: concentración de nitrógeno; F: concentración de fósforo

Para complementar la optimización de la producción de PHB por *B. megaterium* y vinaza como sustrato, se realizó un segundo diseño experimental. Como variables independientes se escogieron la relación carbono/nitrógeno (C/N), la temperatura (T) y el tiempo (t) y se prescribieron en 3 niveles de código: -1, 0, 1 (Tabla 2.2). Los rangos de relaciones C/N, T y t se seleccionaron en base a trabajos previos (Pal *et al.* 2009, Grothe *et al.* 1999). La matriz de diseño para los 15 experimentos se presenta en la Tabla 2.4. Al igual que en el caso de optimización de medios de cultivo, la variable respuesta fue la productividad de PHB. Los cultivos se incubaron en Erlenmeyers de 250 mL, que contenían 100 mL de medio de cultivo con diferentes relaciones C/N a diferentes temperaturas y tiempos, siguiendo el diseño experimental.

**Tabla 2.4:** Valores de los factores para las variables independientes (C/N, T y t) de los experimentos para optimizar las condiciones de fermentación para la producción de PHB por *B. megaterium* utilizando vinaza como sustrato

Corrida	C/N	T (°C)	t (h)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

C/N: relación carbono/nitrógeno; T: temperatura de fermentación; t: tiempo de fermentación.

Las superficies de respuesta se obtienen como resultado de los modelos de regresión cuadrática. Los datos experimentales obtenidos del diseño se analizaron mediante el procedimiento de regresión de la superficie de respuesta utilizando una ecuación polinómica de segundo orden:

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_{ij} \quad [2.1]$$

donde  $Y_i$  es la respuesta prevista por el modelo,  $x_i$  las variables independientes analizadas y  $\beta$  los coeficientes estimados:  $\beta_0$  es el término de compensación,  $\beta_i$  los coeficientes lineales,  $\beta_{ii}$  los coeficientes cuadráticos y  $\beta_{ij}$  los coeficientes de interacción.

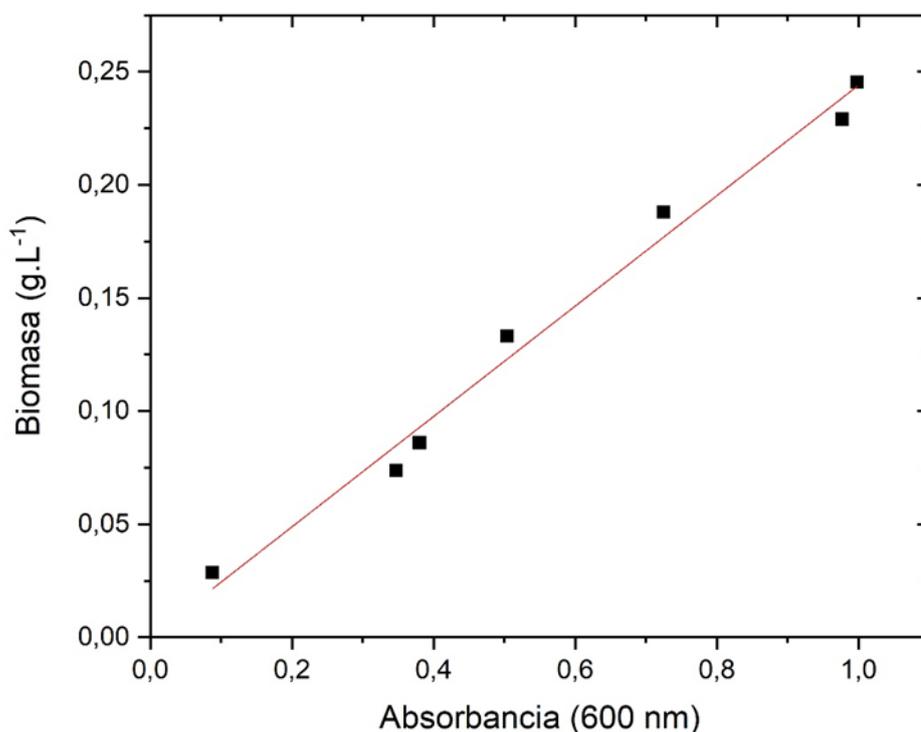
Se utilizaron gráficos 3D para analizar los componentes optimizados del medio que influyen en la respuesta del diseño. Se llevaron a cabo fermentaciones empleando la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación que condujeron a la productividad óptima. Además, para validar adecuadamente el modelo se llevaron a cabo fermentaciones adicionales empleando dos puntos en torno a la composición óptima del medio de cultivo y a las condiciones óptimas de fermentación. Cada condición se realizó por duplicado.

## 2.2.6 Métodos analíticos

### 2.2.6.1 Concentración de biomasa celular

La concentración celular se determinó mediante medidas gravimétricas de peso seco y por medio de la densidad óptica. Para las medidas gravimétricas, se tomaron muestras del cultivo, las cuales fueron centrifugadas y secadas en una estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante. Por otro lado, se realizó la medición de la densidad óptica mediante la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Utilizando los datos obtenidos del peso seco y la absorbancia de una misma muestra, y

considerando el volumen de muestra extraído del medio de cultivo, se construyó una curva de calibración que permitió establecer la relación entre la densidad óptica y la concentración de biomasa (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Curva de calibración para el cálculo de la biomasa.

$$\text{Biomasa (g.L}^{-1}\text{)} = 0,244 \times \text{Absorbancia. } R^2=0,99$$

#### 2.2.6.2 Cuantificación de PHB acumulado

La biomasa seca se empleó para la determinación de PHB acumulado a partir del método reportado por Riis y Mai (1988). El mismo se basa en el análisis por cromatografía gaseosa (GC) del éster del ácido hidroxibutírico producido luego de la hidrólisis del PHB con ácido clorhídrico y posterior esterificación del ácido con propanol. En este método se empleó 1,2-dicloroetano como solvente. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Se pesaron aproximadamente 40 mg de biomasa seca y se incorporaron a un tubo sellado. Luego se añadieron 2 mL de 1,2-dicloroetano,

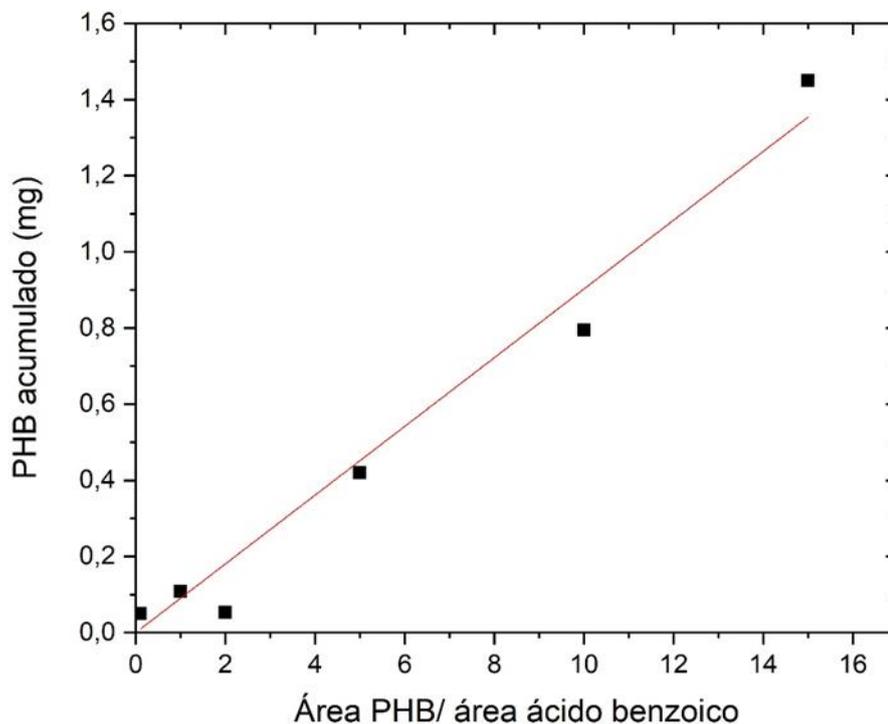
Capítulo 2: Producción de poli(hidroxi-butarato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

2 mL de una solución de ácido clorhídrico en propanol (1 volumen de ácido clorhídrico y 4 volúmenes de 1-propanol) y 200 µL de solución estándar interna (2 g de ácido benzoico en 50 mL de propanol). La muestra se mantuvo durante 2 h en una estufa a 100 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 4 mL de agua destilada y la mezcla se agitó durante 20-30 s. La fase pesada, usada para la determinación de PHB, se inyectó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (Serie II). La columna usada fue una PORAPLOT Q-HT (10×0.32 mm) con helio como gas carrier. Las temperaturas de inyección y del detector fueron de 230 y 200 °C, respectivamente. En el tiempo inicial, la temperatura fue 120 °C, ésta fue incrementada hasta 230 °C en los primeros tres minutos y luego se mantuvo constante hasta el final del análisis.

Para cuantificar el PHB se realizó previamente una curva de calibración (Figura 2.2) utilizando un PHB comercial (Biomer, Alemania) la cual fue empleada para la determinación de la concentración de PHB a partir de las áreas obtenidas por GC. La productividad (P) de PHB se calculó utilizando la ecuación 2.2.

$$P = \frac{PHB}{t V} \quad [2.2]$$

donde PHB es la cantidad de biopolímero en gramos, t es el tiempo de fermentación en horas y V el volumen del medio de cultivo en litros.



**Figura 2.2:** Curva de calibración para la determinación de PHB.

$$\text{PHB acumulado (mg)} = 10,62 \times \text{Área PHB/área ácido benzoico}. R^2=0,98$$

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Sustrato

Las muestras de vinaza se caracterizaron fisicoquímicamente y los resultados se muestran en la Tabla 2.5. Como se puede observar, los parámetros fisicoquímicos de ambas muestras ( $V_{2017}$  y  $V_{2018}$ ) fueron significativamente diferentes entre ellos. Esta variabilidad depende de la variedad y maduración de la caña de azúcar, el sustrato utilizado en el proceso de fermentación, destilación y sulfitación que enriquece los productos aguas abajo con compuestos de azufre (de Godoi *et al.* 2019). Esta amplia gama de propiedades fisicoquímicas representa un desafío para utilizar la vinaza como fuente de carbono en la producción de PHB. A pesar de que ambas muestras de vinaza estudiadas tenían niveles elevados de DBO y DQO, los valores de  $V_{2017}$  fueron significativamente más altos que los de  $V_{2018}$ . Estos parámetros son responsables de la

difícil disposición y están de acuerdo con los valores promedio encontrados en la literatura (Pal *et al.* 2009, Carrilho *et al.* 2016, Nakashima y de Oliveira Junior 2020). El contenido de NT de V<sub>2017</sub> fue 4,3 veces superior al correspondiente a V<sub>2018</sub>. En la bibliografía se encontró que los valores de NT van desde 60 mg.L<sup>-1</sup> (Zanfonato *et al.* 2018) hasta 587 mg.L<sup>-1</sup> (Popolizio 2017), demostrando una vez más la variabilidad de este subproducto y el desafío de usarlo como sustrato para producir biopolímeros mediante fermentación microbiana. En cuanto al contenido de COT, el valor correspondiente a V<sub>2018</sub> fue aproximadamente la mitad del contenido obtenido para la muestra V<sub>2017</sub>. Parsaee *et al.* (2019) reportaron un valor de COT de 20,16 g.L<sup>-1</sup>, similar al valor obtenido para V<sub>2018</sub>. Por otro lado, Fagier *et al.* (2018) obtuvieron un valor de COT de 48 g.L<sup>-1</sup>, similar al valor obtenido para V<sub>2017</sub>. Los valores de pH de las muestras de vinaza están en el rango informado en la bibliografía (Fukushima *et al.* 2019).

**Tabla 2.5:** Propiedades fisicoquímicas de las muestras de vinaza V<sub>2017</sub> y V<sub>2018</sub>.

Propiedades fisicoquímicas	Vinaza	
	V <sub>2017</sub>	V <sub>2018</sub>
<b>DBO (g.L<sup>-1</sup>)</b>	96,5 ± 0,5	36,2 ± 1,8
<b>DQO (g.L<sup>-1</sup>)</b>	101,6 ± 0,5	40,9 ± 0,8
<b>NT (g.L<sup>-1</sup>)</b>	1,1 ± 0,02	0,25 ± 0,01
<b>COT (g.L<sup>-1</sup>)</b>	40,5 ± 0,5	16,3 ± 0,5
<b>pH</b>	4,8	4,6

**DBO:** Demanda Bioquímica de Oxígeno; **DQO:** Demanda Química de Oxígeno; **NT:** Nitrógeno Total; **COT:** Carbono Orgánico Total.

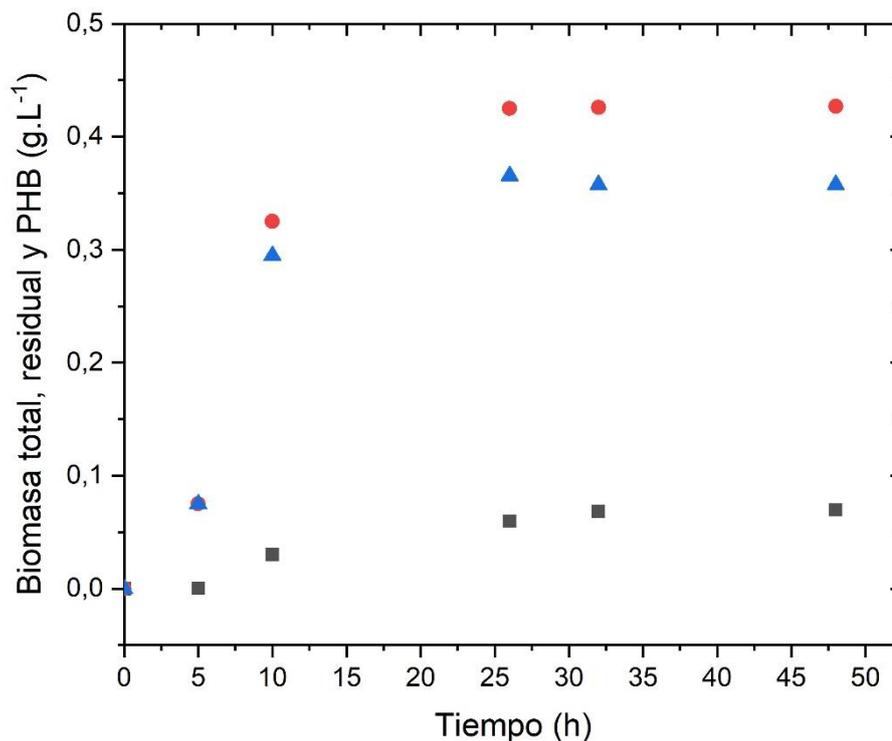
### 2.3.2 Fermentaciones en Erlenmeyers (shake flasks)

Inicialmente se realizaron fermentaciones utilizando *B. megaterium* y vinaza como sustrato empleando el medio de cultivo y las condiciones de fermentación propuestas por López Jiménez (2011). La Figura 2.3 muestra la concentración de

biomasa total, biomasa residual y PHB acumulado en función del tiempo de fermentación.

La máxima concentración celular obtenida fue de  $0,426 \text{ g.L}^{-1}$  y se alcanzó en 24 horas, momento en el cual también se logró la mayor acumulación de PHB durante toda la fermentación, llegando a un 16,1 %. Este valor de acumulación es similar a los informados por Mohd Yatim *et al.* (2017) utilizando melaza de caña de azúcar y agua dulce (15 y 9 %, respectivamente), así como al reportado por Yler *et al.* (2021) utilizando cáscaras de uva pretratadas, donde se obtuvo un valor de 18,8 % (Tabla 2.1).

El valor de la productividad para las condiciones ensayadas fue de  $0,0028 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , el cual se considera bajo en comparación con los microorganismos productores y fuentes de carbono convencionales. No obstante, este valor se encuentra dentro del orden de las productividades reportadas al utilizar cepas de *Bacillus* y subproductos agroindustriales. Por ejemplo, Yler *et al.* (2021) reportó una productividad de  $0,00736 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , mientras que Mohd Yatim *et al.* (2017) obtuvo productividades de  $0,0035$ ,  $0,0031$  y  $0,0008 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , utilizando glicerol, agua dulce y melaza de caña, respectivamente (Tabla 2.1). Con el propósito de mejorar dicha productividad, se llevó a cabo un diseño de experimentos a fin de optimizar el medio de cultivo y las condiciones de fermentación.



**Figura 2.3:** Biomasa total, biomasa residual y PHB acumulado en función del tiempo de fermentación. Símbolos: (●) biomasa total, (▲) biomasa residual y (■) PHB acumulado.

### 2.3.3 Optimización de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación

Para optimizar la composición del medio de cultivo, se llevaron a cabo 15 experimentos, dados por el diseño experimental de Box-Behnken, y se obtuvieron valores de la productividad de PHB (P) según se indica en la Tabla 2.6. La muestra de vinaza empleada en estos ensayos fue V<sub>2017</sub>.

**Tabla 2.6:** Valores de productividad experimental ( $P_{exp}$ ) y estimadas por el modelo ( $P_{mod}$ ) en la optimización de la composición del medio de cultivo para la producción de PHB por *B. megaterium* utilizando vinaza como fuente de carbono

Corrida	$P_{exp.}$ ( $g \cdot L^{-1} h^{-1}$ )	$P_{mod.}$ ( $g \cdot L^{-1} h^{-1}$ )
1	0,0052	0,0058
2	0,0016	0,0027
3	0,0018	0,0025
4	0,0007	0,0020
5	0,0007	0,0024
6	0,0014	0,0025
7	0,0039	0,0045
8	0,0008	0,0011
9	0,0046	0,0048
10	0,0041	0,0041
11	0,0046	0,0063
12	0,0013	0,0029
13	0,0008	0,0017
14	0,0008	0,0017
15	0,0009	0,0017

La influencia de las diferentes variables independientes estudiadas (concentración de carbono, concentración de nitrógeno y concentración de fósforo) sobre la productividad del biopolímero está dada por el valor  $p$ . Aquellas variables que presentaron un valor de  $p < 0,05$  afectaron significativamente el parámetro de respuesta, mientras que las variables con  $p > 0,05$  no fueron consideradas estadísticamente significativas. Los valores de  $p$  para las tres variables independientes y

sus interacciones se encuentran detallados en la Tabla 2.7. Es importante notar que no todas las variables afectaron la productividad de la misma manera. Se puede observar que C y N influyeron estadísticamente en la productividad de PHB, considerando un nivel de significación de 0,05 ( $p = 0,044$  y  $0,028$ , respectivamente). Por otro lado, la concentración de fósforo no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,894$ ). Las interacciones entre las variables estudiadas no fueron destacables sobre la productividad de PHB, excepto el término cuadrático  $N^2$  ( $p = 0,016$ ).

**Tabla 2.7:** Valores de  $p$  para cada variable independiente (C, N y F) y sus interacciones, obtenidos a partir de la optimización de la composición del medio de cultivo

Variable	$p$
C	0,044
N	0,028
F	0,894
$C^2$	0,687
C-N	0,231
C-F	0,103
$N^2$	0,016
N-F	0,203
$F^2$	0,074

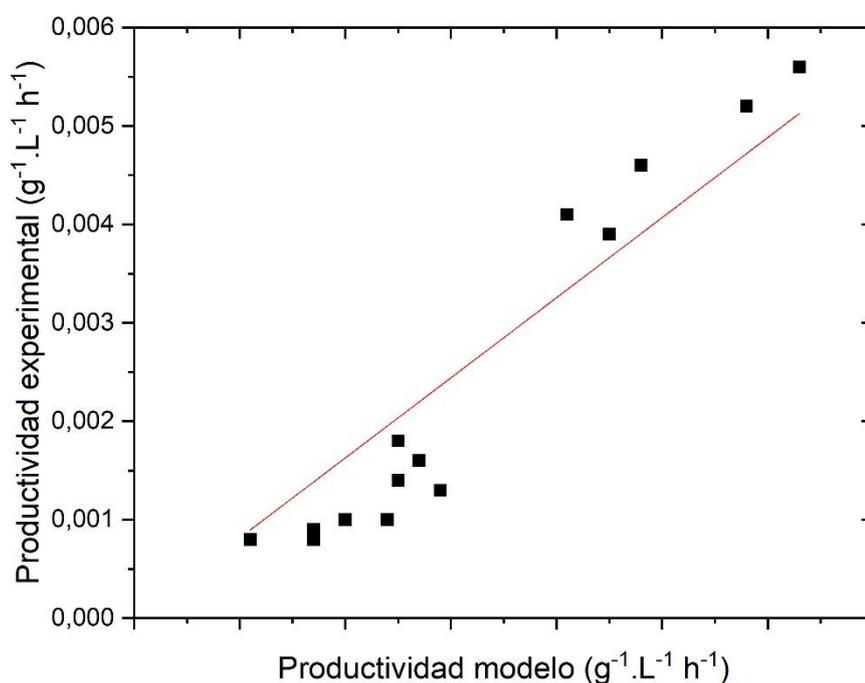
C: concentración de carbono; N: concentración de nitrógeno; F: concentración de fósforo

Para predecir la composición óptima del medio de cultivo, se ajustó una función polinomial a los datos experimentales según la ecuación 2.4.

$$P = 0,0378 + 0,00291 C - 0,0265 N - 0,0756 F - 0,00005 C^2 + 0,0022C N - 0,0031C F + 0,0778 N^2 - 0,0304 N F + 0,0487 F^2 \quad [2.4]$$

donde P es la productividad de PHB ( $\text{g.L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), mientras que C, N y F representan la concentración de carbono, la concentración de nitrógeno y la concentración de fósforo ( $\text{g.L}^{-1}$ ) en los medios de cultivo.

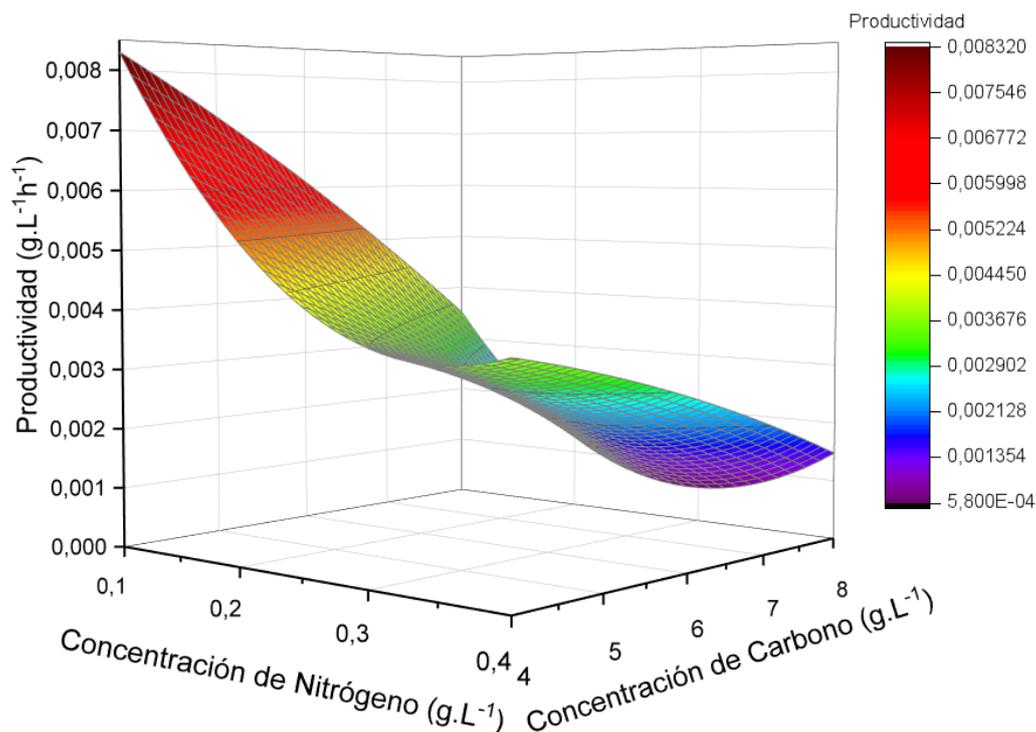
Esta función polinómica representa un buen ajuste de los datos experimentales ya que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0,894. Según Nygaard et al. (2019), el modelo tiene una alta correlación porque  $R^2$  está en el rango de 0,7-0,9. Los términos cuadráticos son coeficientes de ajuste del modelo que demuestran que existe una curvatura y se puede encontrar un punto óptimo local. La representación de los valores observados experimentalmente en función de los ajustados (estimados) se presenta en la Figura 2.4 indicando una buena correlación entre ambos y con ello un buen ajuste del modelo.



**Figura 2.4:** Productividad de PHB: valores experimentales versus valores estimados por el modelo

Así, el nivel óptimo para cada variable estudiada, estimado a partir del punto máximo del modelo polinomial para la producción de PHB, se calculó utilizando la función solver de las herramientas Statgraphics Centurion XV.II X64. Los niveles óptimos de C, N y F fueron 4, 0,1 y 1,19 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. La comparación con los datos encontrados en la bibliografía es difícil porque se deben tener en cuenta varios factores para analizar el efecto de estas variables en la productividad de PHB. Por ejemplo, Bora (2013) estudió la síntesis de PHB por *B. megaterium* mediante un diseño de experimentos, utilizando fructosa, peptona, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Este autor informó que la peptona y la interacción entre la fructosa y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mostraron un efecto interactivo positivo significativo tanto para el crecimiento celular como para el contenido de PHB. Por otro lado, Nygaard *et al.* (2019) realizaron fermentaciones para la producción de PHB utilizando *C. necator* ATCC 17697, y evaluaron el efecto de la concentración de carbono, nitrógeno y fósforo, así como el pH del medio sobre la productividad del biopolímero. Los resultados obtenidos mostraron que la productividad fue estadísticamente afectada por la concentración de nitrógeno, el pH y el término cuadrático de la concentración de carbono. Estos ejemplos de la literatura demuestran que el efecto de las variables de fermentación en la productividad de PHB depende de muchos factores, como la cepa, las fuentes de nutrientes y las condiciones de fermentación, entre otros. Como se mencionó, la concentración de fósforo no tuvo un efecto significativo sobre la productividad de PHB, por lo que la superficie de respuesta se construyó tomando en cuenta únicamente las concentraciones de carbono y nitrógeno como parámetros independientes y la productividad como variable de respuesta (Figura 2.5). Como puede verse, la productividad aumentó cuando disminuyó la concentración de carbono y nitrógeno. Esto podría atribuirse a que la vinaza contiene

compuestos fenólicos, de difícil degradación biológica por bacterias, que poseen propiedades antimicrobianas y fitotóxicas (Parsaee *et al.* 2019). Además, la disminución de la productividad de PHB al aumentar la concentración de nitrógeno puede deberse a que las bacterias *Bacillus* requieren la limitación de este nutriente para la producción de PHB como metabolito (Kanekar *et al.* 2015).



**Figura 2.5:** Superficie de respuesta del efecto de la concentración de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la productividad de PHB.

A partir de los niveles óptimos determinados, se procedió a calcular la productividad máxima de PHB, obteniéndose un valor de  $0,0073 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Es importante destacar que el valor obtenido se encuentra dentro del orden de los valores reportados en la literatura para cepas de *Bacillus* utilizando residuos como sustrato (Tabla 2.1). Sin embargo, otros autores han reportado valores de productividad superiores. Por ejemplo, Bhattacharyya *et al.* (2012) reportaron una productividad de PHB de  $0,21 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  utilizando vinaza como sustrato y *Haloferax mediterranei* como cepa productora.

### 2.3.3.1 Validación

Para validar el modelo se consideraron tres puntos: el óptimo (Pto óptimo) y dos puntos en su entorno (Pto 1 y Pto 2). Los resultados se encuentran dentro de los límites del intervalo de confianza para el valor predicho (Tabla 2.8).

**Tabla 2.8:** Validación del modelo de producción de PHB. Comparación de los valores predichos por el modelo con los valores experimentales para la composición óptima del medio de cultivo

<b>Punto</b>	<b>C (g·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>N (g·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>F (g·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>P<sub>mod.</sub> (g·L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>P<sub>exp.</sub> (g·L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>
1	4	0,25	1,19	0,0033	0,0026 ± 0,0003
2	6	0,1	1,19	0,0051	0,0042 ± 0,0004
Óptimo	4	0,1	1,19	0,0073	0,0066 ± 0,0005

La productividad obtenida experimentalmente empleando la composición óptima del medio de cultivo fue de 0,0066 g·L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Comparando con el valor alcanzado empleando el medio de cultivo propuesto por López Jimenez (2011) (0,0028 g·L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), se logró mejorar la productividad en un factor de 2,4.

Con el fin de mejorar aún más la productividad de PHB por *B. megaterium* empleando vinaza como sustrato, se realizó un diseño experimental adicional para optimizar la relación C/N y las condiciones de cultivo (tiempo y temperatura de fermentación). Por lo tanto, se realizaron los 15 experimentos dados por el diseño experimental de Box-Behnken y se obtuvieron valores de productividad de PHB (P) experimentales y los predichos por el modelo (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9:** Valores de productividad experimental ( $P_{exp}$ ) y estimadas por el modelo ( $P_{mod}$ ) en la optimización de las condiciones de fermentación para la producción de PHB por *B. megaterium* utilizando vinaza como fuente de carbono

Corrida	$P_{exp}$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$P_{mod}$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	0,0051	0,0053
2	0,0054	0,0045
3	0,0044	0,0052
4	0,0040	0,0038
5	0,0097	0,0099
6	0,0040	0,0052
7	0,0030	0,0018
8	0,0045	0,0044
9	0,0103	0,0100
10	0,0095	0,0084
11	0,0033	0,0043
12	0,0048	0,0052
13	0,0069	0,0066
14	0,0063	0,0066
15	0,0065	0,0066

La muestra de vinaza utilizada en estos ensayos como fuente de carbono fue V<sub>2018</sub>. El valor de  $p$  para las tres variables y sus interacciones se muestran en la Tabla 2.10. Teniendo en cuenta las diferentes variables independientes, el tiempo de fermentación tuvo un efecto estadísticamente significativo en la productividad de PHB ( $p = 0,0031$ ). Mientras que, la temperatura de fermentación y la relación C/N no afectaron significativamente la productividad de PHB por *B. megaterium* ( $p = 0,6724$  y  $0,2581$ , respectivamente). En cuanto a la interacción entre las variables, la única que influyó notablemente en la productividad de PHB fue la relación C/N y el tiempo ( $p =$

0,0278). Los términos cuadráticos no fueron destacables sobre la productividad de PHB, excepto el término  $(C/N)^2$  ( $p = 0,0350$ ).

**Tabla 2.10:** Valores de p para cada variable independiente (C/N, T y t) y sus interacciones, obtenidos a partir de la optimización de las condiciones de fermentación

Variable	p
C/N	0,2581
T	0,6724
t	0,0031
C/N-T	0,8002
C/N-t	0,0278
T-t	0,3561
$(C/N)^2$	0,0350
$T^2$	0,8897
$t^2$	0,3561

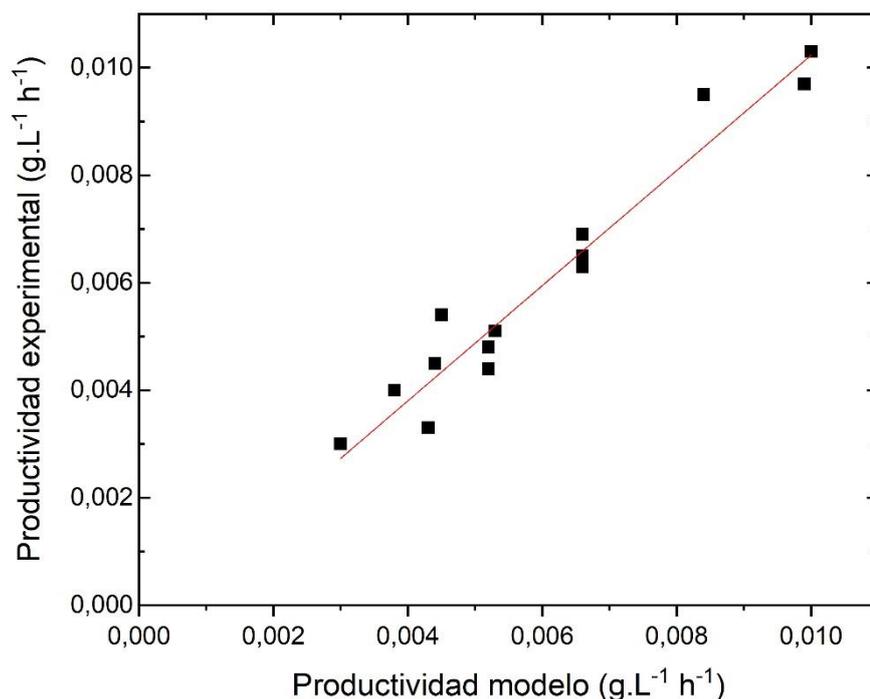
C/N: relación carbono/nitrógeno; T: temperatura fermentación; t: tiempo fermentación.

La ecuación 2.5 describe el modelo cuadrático que se ajustó bien a los datos experimentales con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9093.

$$\begin{aligned}
 P = & 0,0101 + 0,0008 \frac{C}{N} + 0,0002 T - 0,0006 t - 0,00002 \left(\frac{C}{N}\right)^2 \\
 & - 0,000004 \frac{C}{N} T + 0,000007 \frac{C}{N} t - 0,000007 T^2 \\
 & + 0,000007 T t + 0,000008 t^2
 \end{aligned} \tag{2.5}$$

donde P es la productividad de PHB ( $g.L^{-1} h^{-1}$ ), C/N es la relación de carbono a nitrógeno, t es el tiempo de fermentación (h) y T es la temperatura de fermentación ( $^{\circ}C$ ).

La representación de los valores de productividad obtenidos experimentalmente en función de los ajustados (estimados) se presenta en la Figura 2.6 indicando una buena correlación entre ambos y con ello un buen ajuste del modelo.

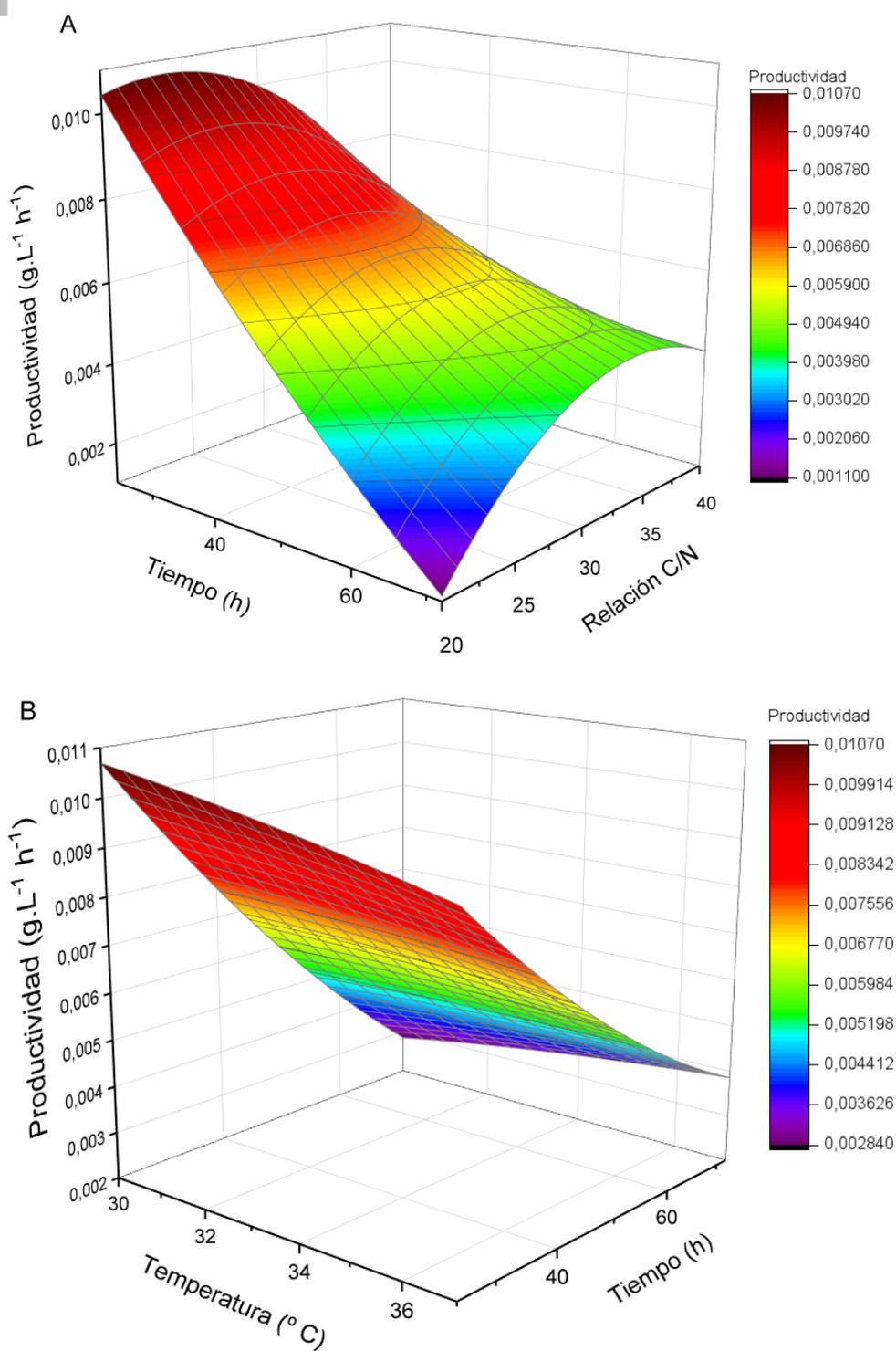


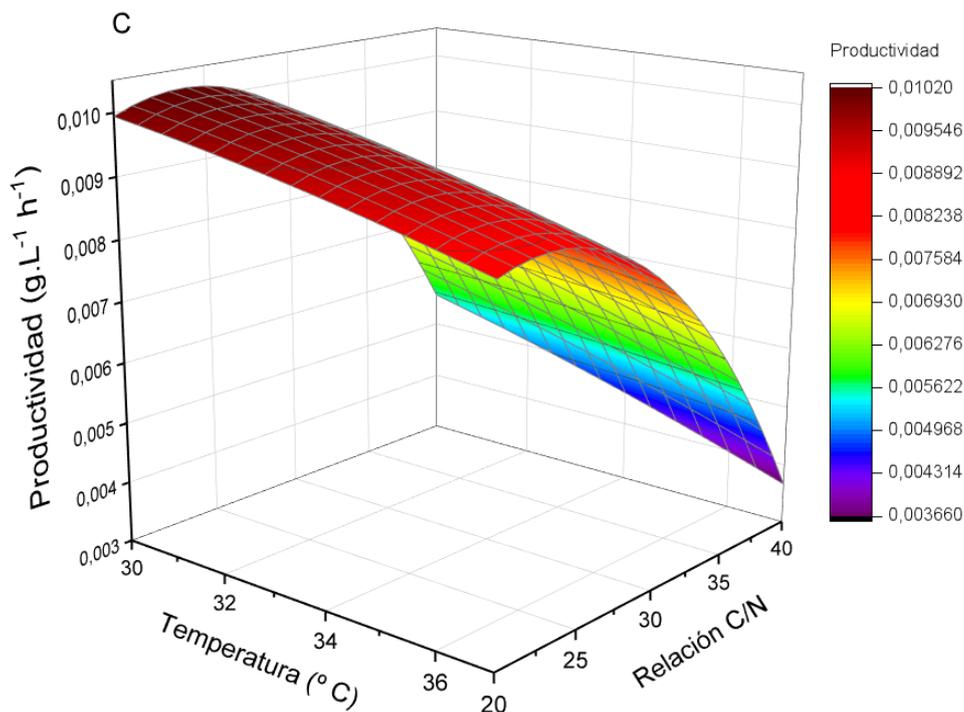
**Figura 2.6:** Productividad de PHB: valores experimentales versus valores estimados por el modelo.  $R^2=0,95$

En la Figura 2.7 se muestran los gráficos de superficie de respuesta de la productividad en función de la relación C/N y el tiempo de fermentación (Figura 2.7a), en función de la temperatura y el tiempo de fermentación (Figura 2.7b), y en función de la relación C/N y la temperatura (Figura 2.7c). La única interacción significativa fue entre C/N y t; la producción de PHB aumenta cuando el valor de t es mínimo y la relación C/N aumenta. Además, cuando t alcanza su valor más alto, la pendiente de producción de PHB en función de C/N se vuelve negativa (Figura 2.7a). El factor asociado a la contribución cuadrática de C/N presenta su valor máximo en el entorno del punto central. Así, la producción máxima de PHB tiene lugar cuando la relación C/N alcanza un valor de 23,95 (Figura 2.7a, c). Por otra parte, la productividad de PHB (Figura 2.7b, c) no se ve afectada de manera significativa por el rango de temperatura utilizado en estas

experiencias. Esto podría atribuirse a que dichos valores están dentro del rango óptimo

de temperatura de crecimiento para esta cepa (Porras et al. 2017).





**Figura 2.7:** Superficie de respuesta de la productividad de PHB en función de: a) la relación C/N y el tiempo, b) la temperatura y el tiempo y c) la relación C/N y la temperatura.

La variable tiempo conduce a una disminución en la productividad de PHB; cuanto mayor es el tiempo de fermentación, menor es la productividad. Esta tendencia podría atribuirse a la baja tasa de producción de PHB, tal como se evidencia en la Figura 2.3. Un comportamiento similar fue informado por Dalsasso *et al.* (2019) estudiando la producción de PHB por *C. necator* usando una mezcla de vinaza y melaza de caña de azúcar como sustrato. Los coeficientes cuadráticos y los de las interacciones entre variables resultaron despreciables, excepto el correspondiente a la interacción C/N y t, atribuido principalmente al efecto del tiempo de fermentación.

Los valores óptimos de la relación C/N, el tiempo y la temperatura de fermentación para producir PHB por *B. megaterium* y vinaza como fuente de carbono fueron 24,6, 30 °C y 24 h.

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxi-butarato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

El valor óptimo de productividad en este caso, predicho por el modelo, fue de 0,0107 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### 2.3.3.1 Validación

Para validar el modelo, se consideraron tres puntos: el óptimo (Pto óptimo 2) y dos puntos en su entorno (Pto 3 y Pto 4). Los resultados se encuentran dentro de los límites del intervalo de confianza para el valor predicho (Tabla 2.11).

**Tabla 2.11:** Validación del modelo de producción de PHB. Comparación de los valores predichos por el modelo con los valores experimentales para las condiciones óptimas de fermentación

Punto	C/N	T (°C)	t (h)	P <sub>mod.</sub> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	P <sub>exp.</sub> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
3	24,6	30	48	0,0064	0,0060 ± 0,0003
4	40	30	24	0,0061	0,0055 ± 0,0005
Óptimo 2	24,6	30	24	0,0107	0,0105 ± 0,0021

Para verificar la buena correlación del modelo, se realizaron fermentaciones con las condiciones óptimas que teóricamente maximizan la productividad de PHB y el valor experimental resultó ser 0,0105 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. El valor obtenido a través de la optimización fue de 0,0107 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, lo cual respalda la efectividad del modelo, ya que ambos valores son similares. Pramanik *et al.* (2012), reportaron una productividad similar de PHB (0,015 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) utilizando un medio de cultivo con 10 % de vinaza cruda como fuente de carbono y como cepa *Haloarcula marismortui*.

**Tabla 2.12:** Productividades reportadas utilizando *B. megaterium* y diferentes fuentes de carbono

Fuente de Carbono	P (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referencia
Glicerol	0,032	(Ramos <i>et al.</i> , 2019)
Almidón soluble	0,023	(Porras <i>et al.</i> , 2016)
Vinaza	0,011	Este trabajo

Los valores de producción de PHB por *B. megaterium* reportados por otros autores son muy variables según la fuente de carbono utilizada. En la Tabla 2.12 se presentan las productividades previamente reportadas para esta cepa al utilizar diversas fuentes de carbono.

La productividad obtenida experimentalmente empleando la composición óptima del medio de cultivo y las condiciones óptimas de fermentación fue de 0,0105 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Comparando con el valor alcanzado empleando el medio de cultivo y las condiciones de fermentación propuestas por López Jimenez (2011) (0,0028 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), se logró mejorar la productividad en un factor de 3,7.

## 2.4 Conclusiones

Se optimizó la composición de un medio de cultivo y las condiciones de fermentación para maximizar la producción de PHB empleando *B. megaterium* como cepa productora y vinaza como sustrato. En tal sentido, se implementó un diseño de experimentos Box-Behnken, utilizando la metodología de superficie de respuesta, a partir de la realización de un número acotado de experiencias que permitió evaluar el efecto de diferentes variables independientes (concentración de carbono,

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

concentración de nitrógeno y concentración de fósforo, relación C/N, temperatura y tiempo) sobre la productividad de PHB (única variable respuesta). El uso de esta herramienta estadística permitió incrementar la productividad 3,7 veces respecto a los ensayos preliminares. Sin embargo, los valores de productividad obtenidos resultaron bajos comparados con los valores reportados para *Bacillus* con fuentes de carbono convencionales. Una alternativa para mejorar la productividad empleando vinaza como sustrato, podría ser un pretratamiento de este residuo para disminuir su fitotoxicidad. Por otra parte, el control de variables de fermentación tales como pH y oxígeno disuelto podrían conducir a un incremento mayor en la productividad.

## 2.5 Referencias

- Acosta-Cárdenas A, Alcaraz-zapata W, Cardona-betancur M (2018) Sugarcane molasses y vinasse as a substrate for polyhydroxyalkanoates (PHA) production - Melazas y vinaza de la caña de azúcar como sustrato para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA). *RevistasUnalEduCo* 85:220–225. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n206.68279>
- Yler R, Pino V, Moya F, Soto E, Valdés C, Yreeßen C (2021) Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source . *Int J Biobased Plast* 3:98–111. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1882049>
- Aristya GR, Lin YJ, Chang JS, Chang JJ, Yen HW (2022) Polyhydroxybutyrate (PHB) production from crude glycerol by genetic engineering of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol Reports* 18:101048. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101048>
- Berekaa MM, Al Thawadi AM (2012) Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters. *African J Microbiol Res* 6: 838-845. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1382>

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

Bhattacharyya A, Pramanik A, Maji SK, Haldar S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012)

Utilization of vinasse for production of *Haloferax mediterranei*. 1–10 AMB Expr 2, 34.

<https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-34>

Biedendieck R, Gamer M, Jaensch L, Meyer S, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D (2007) A sucrose-

inducible promoter system for the intra- y extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. J Biotechnol 132:426–430. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.494>

Bora L (2013) Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Bacillus megaterium* y Optimization of

Process Parameters Using Response Surface Methodology. J Polym Environ 21:415–420.

<https://doi.org/10.1007/s10924-012-0529-z>

Bradstreet RB (1954) Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Anal Chem 26:185–187.

<https://doi.org/10.1021/ac60085a028>

Burke RW, Mavrodineanu R (1977) Certification y Use of Acidic Potassium Dichromate Solutions

as an Ultraviolet Absorbance Standard SRM 935. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards, Washington, DC

Carrilho ENVM, Labuto G, Kamogawa MY (2016) Destination of Vinasse, a Residue From Alcohol

Industry: Resource Recovery y Prevention of Pollution. Elsevier Inc 21-43.

Dalsasso RR, Pavan FA, Bordignon SE, De Aragão GMF, Poletto P (2019) Polyhydroxybutyrate

(PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse y molasses as mixed substrate. Process Biochem 85:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>

de Godoi LAG, Camiloti PR, Bernardes AN, Sanchez BLS, Rodrigues Torres AP, Gomes AC, Botta

LS (2019) Seasonal variation of the organic y inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. Environ Sci Pollut Res 26:29267–29282.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>

Fagier MA, Elmugdad AA, Aziz ME., Gabra NM (2018) Characterization of Sugarcane Vinasse. J

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

Fac Sci Int Univ Africa

Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD (2007) Box-Behnken design : An alternative for the optimization of analytical methods. Anal Chim Acta 597(2):179-86.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>

Fukushima NA, Palacios-Bereche MC, Palacios-Bereche R, Nebra SA (2019) Energy analysis of the ethanol industry considering vinasse concentration y incineration. Renew Energy 142:96–

109. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.085>

Grothe E, Moo-young M, Chisti Y (1999) Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme Microb Technol 25:132–141.

[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00023-X)

Halami PM (2008) Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. World J Microbiol Biotechnol 24: 805–812 . [https://doi.org/10.1007/s11274-](https://doi.org/10.1007/s11274-007-9543-z)

007-9543-z

Kanekar P, Kulkarni SO, Nilegaonkar N, Sarnaik SS, Kshirsagar P, Ponraj M, Kanekar S (2015)

Polymers for packaging applications. Apple Academic Press Inc. Apple Academic Press for

Khattab AM, Esmael ME, Farrag AA, Ibrahim MIA (2021) Structural assessment of the bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) produced by *Bacillus flexus* Azu-A2 through cheese whey

valorization. Int J Biol Macromol 190:319–332.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.090>

López JA, Naranjo JM, Higuera JC, Cubitto MA, Cardona CA, Villar MA (2012) Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain : Outlook on Future Developments with

Endospore Forming Bacteria. Biotechnol Bioprocess Eng 17:250–258.

<https://doi.org/10.1007/s12257-011-0448-1>

López Jimenez JA (2011) Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

polyhidroxibutirato (PHB). Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur

Mohapatra S, Maity S, Dash HR, Das S, Pattnaik S, Rath CC, Samantaray D (2017) *Bacillus* y

biopolymer : Prospects y challenges. 12:206–213.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>

Mohd Yatim AF, Syafiq IM, Huong KH, Abdullah Amirul AA, Mohd Effendy AW, Bhubalan K (2017)

Bioconversion of novel y renewable agro-industry by-products into a biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) by marine *Bacillus megaterium* UMTKB-1 strain. *Biotechnologia* 98:141–

151. <https://doi.org/10.5114/bta.2017.68313>

Nakashima RN, de Oliveira Junior S (2020) Comparative exergy assessment of vinasse disposal

alternatives: Concentration, anaerobic digestion y fertirrigation. *Renew Energy* 147:1969–

1978. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.124>

Nor NM, Mohamed MS, Loh TC, Foo H, Rahim R, Tan J, Mohamad R (2017) Comparative analyses

on medium optimization using one-factor-at-a-time, response surface methodology, y artificial neural network for lysine – methionine biosynthesis by *Pediococcus pentosaceus*

RF-1. *Biotechnol Equip* 31:935–947.

<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1335177>

Nygaard D, Yashchuk O, Hermida B (2019) Evaluation of culture medium on poly(3-

hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697 : application of the response surface methodology. *Heliyon* 5: 1–18.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01374>

Pal A, Prabhu A, Kumar AA, Rajagopal B, Dadhe K, Ponnama V, Shivakumar S (2009) Optimization

of process paramters for maximum poly(-β-) hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of Microbiology* 58:149-154.

Parsaee M, Kiani M, Kiani D, Karimi K (2019) A review of biogas production from sugarcane

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

vinasse. Biomass y Bioenergy 122:117–125.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>

Popolizio DAT (2017) Efecto de la aplicación de vinazas de la industria del tequila en el cultivo del maíz y en la asociación planta-hongos micorrízicos arbusculares (hma). Tesis doctoral. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Porras MA Producción de poli(hidroxialcanoatos)s (PHA)s a partir de fuentes renovables de bajo costo (2016) Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur

Porras MA, Villar MA, Cubitto MA (2017) Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. J Biotechnol 255:28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.012>

Pramanik A, Mitra A, Arumugam, Meyyappan A, Bhattacharyya A, Sadhukhan S, Ray A, Haldar S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012) Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. Folia Microbiol (Praha) 57:71–79. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0092-3>

Prambudy H, Supriyatin T, Setiawan Akademi F (2019) The testing of Chemical Oxygen Demy (COD) y Biological Oxygen Demy (BOD) of river water in Cipager Cirebon. In: International Symposium on Sciences, Engineering, y Technology. IOP Publishing Ltdl pp 0–6

Ramos FD (2019) Producción de poli(hidroxialcanoato)s (PHA)S: Estudios experimentales y diseño óptimo de biorrefinerías. Tesis Doctoral. Univesidad Nacional del Sur

Reddy MV, Watanabe A, Onodera R, Mawatari Y, Tsukiori Y, Watanabe A, Kudou M, Chang YC (2020) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using single or mixture of fatty acids with *Bacillus* sp. CYR1: Identification of PHA synthesis genes. Bioresour Technol Reports 11:100483. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100483>

Riis V, Mai W (1988) Gas chromatographic determination of poly-hydroxybutyric acid in microbial

Capítulo 2: Producción de poli(hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza como fuente de carbono

biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J Chromatogr* 445:285–289.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)84535-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)84535-0)

Sangkharak K, Prasertsan P (2013) The production of polyhydroxyalkanoate by *Bacillus licheniformis* using sequential mutagenesis y optimization. *Biotechnol Bioprocess Eng*

18:272–279. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0615-z>

Suryawanshi SS, Sarje SS, Loni PC, Kamble PP (2020) Bioconversion of Sugarcane Molasses into Bioplastic (Polyhydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* 2156 under Statistically Optimized

Culture Conditions. *7928:80-92*. <https://doi.org/10.1080/22297928.2020.1746197>

Tsuge T, Hyakutake M, Mizuno K (2015) Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases y PHA-producing *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:6231–6240.

<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6777-9>

Wang B, Sharma-Shivappa RR, Olson JW, Khan SA (2013) Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Ind Crops Prod* 43:802–811.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.011>

Yolmeh M, Jafari SM (2017) Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioprocess Technol* 10:413–433. [https://doi.org/10.1007/s11947-016-](https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2)

1855-2

Zanfonato K, Schmidt M, Quines LK, Santos C, Willibaldo G, de Aragão MF (2018) Can vinasse be used as carbon source for Poly(3-hidroxybutyrate). Production by *Cupriavidus necator* DSM

545. *Brazilian J Chem Eng* 35:901–908. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170265>

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

## Capítulo 3: Evaluación de la factibilidad económica de la producción de PHAs a partir de vinaza

---

### 3.1 Introducción

Los poli(hidroxicanoato)s (PHAs) muestran propiedades físicas similares a algunos termoplásticos y elastómeros, por lo que se consideran una buena alternativa para reemplazar a los polímeros sintéticos (Roohi *et al.* 2018). A pesar de las ventajas de este biopolímero, el alto costo de producción limita su uso masivo. Del total de los costos de producción, el 40-48 % se atribuye a la fuente de carbono (Gonzalez *et al.* 2021). Con el fin de que la producción de PHAs sea más rentable, se han llevado a cabo investigaciones sobre el uso de sustratos derivados de residuos (Mannina *et al.* 2020, Peña-Jurado *et al.* 2019, Nakashima y de Oliveira Junior 2020, Penkhrue *et al.* 2020). En este sentido, se han reportado trabajos científicos con el uso de vinaza como un sustrato adecuado para obtener PHAs a un menor costo. Entre ellos, Bhattacharyya *et al.* (2012) y Pramanik *et al.* (2012), han investigado el potencial de los microorganismos halófilos vinaza como sustrato para la producción de PHAs mostrando diferentes niveles de productividad. Sin embargo, además del costo de la materia prima, varios factores como la productividad del microorganismo, el rendimiento del sustrato, o los métodos de extracción influyen en el valor final del PHA obtenido (Dietrich *et al.* 2019) por lo que la reducción de costos a escala industrial dependerá, en gran medida, de la optimización del proceso integral (Ramos *et al.*, 2017). En la literatura se pueden encontrar evaluaciones técnico-económicas sobre la producción de PHAs y se ha

destacado la importancia de la optimización del proceso de producción para lograr un producto de alta calidad y económicamente competitivo. La elección de la estrategia de fermentación y la selección de cepas de bacterias productoras de PHAs también son factores importantes que pueden afectar los costos de producción (Posada *et al.* 2011, Lopez-Arenas *et al.* 2017, Shahzad *et al.* 2017).

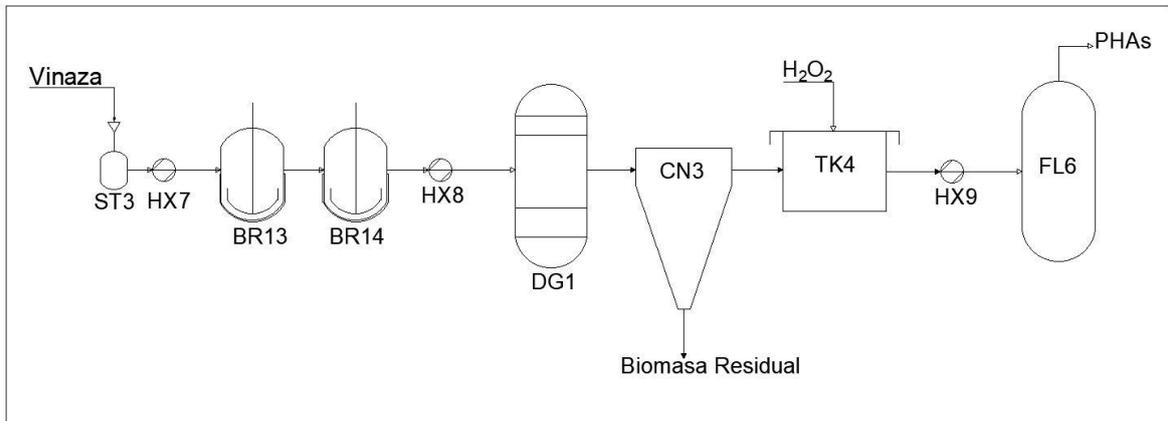
En este sentido, Ramos *et al.* (2019) desarrolló un modelo de superestructura para la optimización del proceso de síntesis de PHAs, utilizando programación matemática, incluidos balances de masa y energía, ecuaciones de diseño y dimensionamiento, así como correlaciones detalladas para el costo de capital de los equipos. De esta manera, el objetivo de este capítulo fue evaluar la viabilidad económica de producir PHAs a partir de vinaza utilizando diferentes microorganismos y empleando la superestructura ya desarrollada por Ramos *et al.* (2019). La función objetivo para el problema de optimización es la maximización del Valor Presente Neto (VPN). El modelo tiene en cuenta varias productividades y microorganismos que se reportaron utilizando vinaza como fuente de carbono y se analiza una comparación de diferentes escenarios desde el punto de vista técnico-económico y ambiental.

## 3.2 Materiales y métodos

La Figura 3.1 muestra el esquema de producción de PHAs basado en el proceso reportado por Ramos *et al.* (2019). Para evitar la presencia de otros microorganismos, los medios de cultivo deben esterilizarse utilizando métodos como el autoclavado, que utiliza vapor a presión como agente esterilizante (ST3). Este paso reduce la posibilidad de que crezcan otros microorganismos que puedan competir con la cepa productora de los biopolímeros. Las fermentaciones se realizan en dos etapas. En la primera etapa

tiene lugar el cultivo de biomasa (BR13) y en la segunda la producción de PHAs (BR14); donde se impuso una limitación de nutrientes para aumentar la producción de los biopolímeros. La extracción es la última etapa de los procesos de producción de PHAs. Para la recuperación de los biopolímeros se han desarrollado varios métodos, siendo la extracción por solventes, principalmente con cloroformo, la más comúnmente realizada. Por otro lado, la digestión enzimática es un método ventajoso porque es un proceso selectivo y energéticamente eficiente, además de ofrecer un menor riesgo de daño al producto en comparación con otras metodologías (Laste Macagnan *et al.* 2019). Las enzimas a menudo requieren condiciones operativas suaves de pH y temperatura, lo que hace que su aplicación sea amigable con el ambiente. La extracción enzimática a menudo es asistida por un choque térmico a la biomasa para facilitar el proceso de extracción (Kumar *et al.* 2020), por lo tanto, el primer paso en la extracción enzimática es un tratamiento térmico a 85 °C (HX8) (Posada *et al.* 2011). Luego se utiliza un digestor (DG1), donde se lleva a cabo la lisis de la membrana celular mediante el uso de la enzima pancreatina al 2 % en peso. Para mejorar la disolución de la membrana celular se añaden 0,5 kg de NaOCl al 30 % por cada kg de biomasa total (Ramos *et al.* 2019). Se supone que este proceso es capaz de extraer el 90 % del biopolímero presente en la biomasa de microorganismos. La biomasa residual, disuelta en la solución de NaOCl, se extrae mediante centrifugación (CN3). La corriente de PHAs re-suspendida se trata en un tanque (TK4) con una solución concentrada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,73 % en peso, con una proporción peso de solución:PHAs de 3,05:1, para blanquear el polímero (Jacquel *et al.* 2008). Finalmente, el agua se elimina parcialmente a través de la evaporación

instantánea (FL6), para obtener una corriente de PHAs con un 53 % en peso (Posada *et al.* 2011).



**Figura 3.1:** Biorrefinería de producción de PHAs utilizando vinaza como fuente de carbono. Código de los equipos: ST3: esterilizador, BR13: biorreactor, BR14: biorreactor, DG1: digestor, CN3: centrífuga, TK4: tanque, FL6: evaporación instantánea.

### 3.2.1 Modelo matemático

Se planteó la superestructura como un problema de programación no lineal mixta entera (MINLP) con un enfoque en objetivos económicos, y se implementó en GAMS 32.2.0. El modelo se enfocó en una planta de producción de 10,000 toneladas anuales de PHAs, utilizando vinaza como sustrato y maximizando el Valor Presente Neto (VPN) bajo una serie de restricciones, incluyendo balances de masa y energía, diseño detallado de equipos y ecuaciones de costos de capital.

#### 3.2.1.1 Balances de masa

Se formularon balances de masa para cada unidad en la superestructura. Las unidades no reactivas ( $\theta$ ) se representan en la ecuación 3.1:

$$\sum_k^K f_{\theta,j}^k = \sum_r^R f_{r,j}^\theta \quad \forall \theta \in \vartheta \quad \forall j \in J \quad [3.1]$$

donde,

$f_{\theta,j}^k$  : Caudal másico de componente j desde la corriente de entrada k a la unidad  $\theta$  [kg j/h].

$f_{r,j}^\theta$  : Caudal másico de componente j desde  $\theta$  a la corriente de salida r [kg j/h].

Los balances de masa totales para las unidades reactivas ( $\theta'$ ) se formularon como se muestra en la ecuación 3.2:

$$f_{r,j}^\theta = \sum_k^K f_{\theta,j}^k + \sum_h^H \xi_{j,s_h}^h \cdot C_h \cdot \sum_k^K f_{\theta,sh}^k \quad \forall \theta \in \vartheta' \quad \forall r \in R \quad \forall j \in J \quad \forall sh \in SH \quad [3.2]$$

donde,

$f_{r,j}^\theta$  : Caudal másico de componente j desde  $\theta$  hacia la corriente de salida r [kg j/h].

$f_{\theta,j}^k$  : Caudal másico del componente j desde la corriente de entrada k hacia la unidad  $\theta$  [kg j/h].

$\xi_{j,s_h}^h$  : Coeficiente de masa entre j y  $s_h$  para la reacción h [kg j/kg  $s_h$ ], es positivo para los productos y negativo para los reactivos.

$C_h$  : Conversión del reactivo limitante para la reacción h.

$f_{\theta,sh}^k$  : Caudal másico del reactivo limitante sh desde la corriente de entrada k hacia la unidad  $\theta$  [kg j/h].

### 3.2.1.2 Balances de energía

En los balances de energía se tuvo en cuenta la cantidad de energía requerida para operar los equipos de la superestructura propuesta. Estos requerimientos se

pueden satisfacer mediante energía eléctrica (motores, agitación, etc.) o térmica (calentamiento o enfriamiento de corrientes de proceso). Para los intercambiadores de calor se empleó un balance general de energía en estado estacionario para las corrientes calientes y frías considerando despreciables la transferencia de calor entre el intercambiador y los alrededores, como así también la energía potencial y cinética. Conociendo las entalpías de entrada ( $h_e$ ) y salida ( $h_s$ ) de las corrientes másicas totales de entrada y salida, respectivamente, se pudo calcular el calor intercambiado ( $Q_\theta$ ) en cada intercambiador mediante el uso de la ecuación 3.3:

$$Q_\theta = \sum_k^K \sum_j^J f_{\theta,j}^k \cdot h_k - \sum_r^R \sum_j^J f_{r,j}^\theta \cdot h_r \quad \forall \theta \in \vartheta \cup \vartheta' \quad [3.3]$$

donde,

$Q_\theta$ : Calor intercambiado en la unidad  $\theta$  en KJ/h

$h_k$ : Entalpías de la corriente de entrada k de la unidad  $\theta$ .

$h_r$ : Entalpías de la corriente de salida k de la unidad  $\theta$ .

Por su parte, la energía eléctrica requerida por centrífugas, reactores, digestores, homogeneizadores y biorreactores se calculó mediante aproximaciones, las cuales resultan no lineales según la ecuación 3.4:

$$EC_\theta = ECR_\theta \cdot \left( \sum_k^K \sum_j^J f_{\theta,j}^k \right) \quad \forall \theta \in \vartheta \cup \vartheta' \quad [3.4]$$

donde:

$EC_\theta$ : Consumo de energía eléctrica en KJ/h

$ECR_{\theta}$ : Relación de consumo de energía por unidad de caudal másico relativo a la unidad  $\theta$  en KJ/kg

### 3.2.1.3 Restricciones enteras y mixtas

Las posibles unidades involucradas en la superestructura se asocian con variables binarias ( $y_i$ ) que son las variables de decisión para determinar la ruta tecnológica óptima. Las variables binarias se tienen en cuenta en los balances de masa mediante la lógica proposicional y las formulaciones de Big M, como se muestra en la ecuación 3.5:

$$\sum_k^K \sum_j^J f_{\theta,j}^k - BM \cdot y_i \leq 0 \quad \forall \theta \in \vartheta \cup \vartheta' \quad \forall i \in I \quad [3.5]$$

Además, se utilizan variables binarias para la adición de restricciones enteras en orden de enumerar las diferentes alternativas subóptimas para la producción de PHAs. Esto podría ser importante porque otras rutas tecnológicas también podrían tener un potencial económico. Este proceso de iteración implica en primer lugar la solución del modelo y, posteriormente, la adición de restricciones específicas para excluir la última mejor solución. El proceso puede expresarse matemáticamente mediante la ecuación 3.6:

$$\sum_{i \in A^n} y_i - \sum_{i \in B^n} y_i \leq |A^n| - 1 \quad [3.6]$$

donde,

$A^n = \{i | y_i^k = 1\}$ ,  $B^n = \{i | y_i^k = 0\}$ , siendo n: número de cortes enteros

Para determinar la viabilidad económica de los distintos escenarios se utilizó el Valor Presente Neto (VPN), la Tasa Interna de Retorno (TIR), el Periodo de Recuperación (PBP) y el Retorno de la Inversión (ROI). El VPN es una medida del valor actual de los flujos de efectivo futuros generados por un proyecto, descontados a una tasa de interés determinada. Si el VPN es positivo, significa que el proyecto es rentable y se espera que genere ganancias en el futuro. La TIR es la tasa de interés a la cual el VPN es igual a cero. Es decir, es la tasa a la que el valor presente de los flujos de efectivo es igual al costo inicial del proyecto. Una TIR mayor a la tasa de descuento indica que el proyecto es rentable. El PBP es el tiempo que tarda un proyecto en generar flujos de efectivo suficientes para recuperar la inversión inicial. Cuanto más corto sea el PBP, más rápido se recupera la inversión. El ROI es una medida del rendimiento de la inversión y se expresa como un porcentaje de la inversión inicial. Si el ROI es mayor que cero, significa que el proyecto es rentable y ha generado beneficios en relación a la inversión inicial. Estas métricas son herramientas clave para evaluar la viabilidad financiera de un proyecto de inversión y tomar decisiones informadas sobre su ejecución (Lopez-Arenas *et al.* 2017).

En la Tabla 3.1 se muestran las principales variables de biosíntesis de PHAs para los diferentes escenarios estudiados. Los datos reportados son cepas, rendimiento ( $Y_p/s$ ), porcentaje de PHA acumulado y fuente de carbono utilizada para la obtención del biopolímero. El rendimiento de PHA corresponde a la relación entre el PHA obtenido tras la extracción y el sustrato consumido, ambos expresados en  $g.L^{-1}$ . El porcentaje de acumulación de PHA se refiere a la cantidad de biopolímero en relación con el peso de biomasa seca.

**Tabla 3.1:** Principales variables de biosíntesis de PHAs para diferentes escenarios

Cepa	$Y_{P/S}^a$	PHA <sub>acum.</sub> <sup>b</sup> (%)	Fuente de Carbono	Referencia
<i>H. mediterranei</i> DSM 1411	0,87	70	25 % vinaza pretratada	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2012)
<i>H. mediterranei</i> DSM 1411	0,52	66	50 % vinaza pretratada	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2012)
<i>C. necator</i>	0,17	69	Melaza de caña de azúcar + vinaza + MSM <sup>c</sup>	(Acosta-Cárdenas <i>et al.</i> 2018)
<i>C. necator</i>	0,25	58	Melaza de caña de azúcar + vinaza	(Dalsasso <i>et al.</i> 2019)
<i>C. necator</i>	0,11	26	Vinaza + MSM	(Zanfonato <i>et al.</i> 2018)
<i>H. marismortui</i>	0,32	30	100 % vinaza pretratada	(Pramanik <i>et al.</i> 2012)
<i>B. megaterium</i>	0,26	45	10 % vinaza cruda	(Trapé <i>et al.</i> 2021)

<sup>a</sup>  $Y_{P/S}$ : relación entre PHA obtenido tras la extracción y el sustrato consumido, ambos expresados en g.L<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> PHA<sub>acum.</sub>: cantidad de biopolímero en relación con el peso de la célula seca, expresado en porcentaje.

<sup>c</sup> MSM: medio salino

### 3.2.2 Análisis de sensibilidad

Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad con el objetivo de evaluar el impacto que tiene la incertidumbre de ciertos parámetros sobre la función objetivo. Del mismo modo, este estudio aporta información valiosa con respecto a las potenciales mejoras tecnológicas y de mercado que pueden ser implementadas para lograr un mayor beneficio económico.

### 3.3 Resultados y discusión

Se empleó la superestructura desarrollada por Ramos *et al.* (2019) para calcular el VPN de los diferentes escenarios y evaluar la factibilidad económica de la obtención de PHAs empleando diferentes cepas y vinaza como sustrato. Los resultados derivados de la superestructura modificada desarrollada se presentan en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2:** Resultados obtenidos de la superestructura para la producción de PHB

Escenario	Cepa	VPN (MM USD)	Costo de producción (USD.kg <sup>-1</sup> )	Consumo de vinaza (10 <sup>6</sup> kg.h <sup>-1</sup> )
1	<i>H. mediterranei</i> DSM 1411	35,09	2,56	1992,2
2	<i>H. mediterranei</i> DSM 1411	29,05	2,26	3409,7
3	<i>C. necator</i>	24,03	2,27	10429,6
4	<i>C. necator</i>	13,30	2,56	7092,1
5	<i>C. necator</i>	-5,43	3,02	5719,5
6	<i>H. marismortui</i>	-5,08	3,03	5540,7
7	<i>B. megaterium</i>	-5,50	3,02	6819,4

Como se puede observar, varios valores de VPN resultaron negativos, indicando que no se obtendrían beneficios o que no cumplirían con las expectativas del proyecto de inversión (Kholis *et al.* 2022). Por esta razón, los escenarios con VPN negativo no serán considerados en la discusión. Los valores negativos de VPN podrían atribuirse a la baja acumulación de PHAs y al bajo rendimiento de producción. Además, el microorganismo sería otro factor a tener en cuenta a la hora de diseñar una planta de producción de PHAs.

El VPN más alto obtenido fue de 35,09 millones de dólares. Este valor es considerable, indicando la factibilidad de la instalación de una planta de PHAs junto a una planta de bioetanol a partir de caña de azúcar. Este valor se obtuvo con el escenario propuesto a partir de los datos publicados por Bhattacharyya *et al.* (2012), quienes utilizaron como microorganismo *H. mediterranei* y vinaza pretratada con carbón activado, con una concentración de 25 % como sustrato (escenario 1). Estos autores repitieron esta experiencia, pero con una concentración de vinaza pretratada del 50 %. Esta alternativa se presenta como el segundo valor más alto de VPN siendo de 29,05 millones de dólares (escenario 2). Si bien los porcentajes de PHAs acumulados por el microorganismo en ambos escenarios fueron similares, 70 y 66 % respectivamente, el rendimiento de PHA respecto al sustrato consumido fue significativamente mayor en el escenario 1, 0,87 contra 0,52 obtenido en el escenario 2. Por lo tanto, la elección del medio de cultivo sería un factor fundamental a tener en cuenta a la hora de diseñar una planta de producción de PHAs. En este caso, se demostró que cuyo el medio de cultivo está compuesto por mayor cantidad de vinaza pretratada, se logra un menor rendimiento de PHAs respecto al sustrato consumido.

También se obtuvieron valores positivos de VPN utilizando *C. necator* como microorganismo productor. Acosta-Cárdenas *et al.* (2018) utilizaron este microorganismo con una combinación de melaza y vinaza como fuente de carbono en una proporción de 25:75, con un suplemento de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) y sales en el medio de cultivo (escenario 3). El VPN obtenido en este escenario fue de 24,03 millones de dólares. Por otro lado, Dalsasso *et al.* (2019) también utilizaron *C. necator* con una combinación de melaza y vinaza como fuente de carbono, sin la adición de sales en el medio de cultivo (escenario 4). Para este caso, el porcentaje de acumulación de PHAs

fue del 58 %, en contraste con el 69 % correspondiente al escenario 3. De los datos reportados por estos autores, se obtuvo un valor de VPN considerablemente menor (13,30 millones de dólares) que el correspondiente al escenario 3. La presencia de sales en el medio de cultivo también podría contribuir a una mayor producción de PHAs. De acuerdo con esto, según lo informado por Soto *et al.* (2019) se lograron rendimientos de producción de PHAs más altos al utilizar un residuo obtenido de la producción de hidrógeno a partir de paja de trigo hidrolizada y agregar un medio mínimo de sales (MSM). El MSM contiene por litro: 9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,02 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,0012 g  $\text{Fe(III)NH}_4$ -citrato, 1 mL de solución de oligoelementos (que contiene por litro): 50 g EDTA, 8,3 g  $\text{FeCl}_3$ , 0,84 g  $\text{ZnCl}_2$ , 0,13 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,016 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0,1 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

El modelo también permite calcular el costo potencial del biopolímero. En el caso del escenario 1, el costo de producción fue de 2,56  $\text{USD} \cdot \text{kg}^{-1}$ , encontrándose este valor en el rango 1,41-2,6  $\text{USD} \cdot \text{kg}^{-1}$  reportado por otros autores (Shahzad *et al.* 2017, Jacques *et al.* 2008, Chidambarampadmavathy *et al.* 2017). Cabe señalar que, no se consideró ningún costo asociado al transporte de la vinaza ya que la superestructura considera que la planta de producción de PHAs está anexa a una planta de bioetanol. Para una planta de PHAs alejada de la producción de etanol, se debe tener en cuenta el costo de transporte, el cual se puede suponer de 0,52  $\text{USD} \cdot \text{ton}^{-1} \text{ km}^{-1}$  (Shahzad *et al.* 2017). Los costos de producción de los demás escenarios analizados fueron ligeramente inferiores a los correspondientes al escenario 1, ubicándose en el rango de 2,26-2,56  $\text{USD} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Si bien el costo de producción de PHAs aún es alto en comparación con la producción de polímeros sintéticos como el polietileno (PE) y el polipropileno (PP), que se encuentran en el rango de 0,23-0,48  $\text{USD} \cdot \text{kg}^{-1}$ , la propuesta de utilizar vinaza como fuente de

carbono y obtener un producto de alto valor agregado podría reducir el impacto ambiental negativo de este subproducto ya que representa un gran problema ambiental y económico para las empresas de bioetanol.

El consumo de vinaza para la producción de PHAs es muy variable en los escenarios estudiados, oscilando entre 17.451 y 91.363 ton.año<sup>-1</sup>. Por ejemplo, el escenario 1 mostró una menor cantidad de vinaza requerida, siendo esta cantidad de 17.451 ton.año<sup>-1</sup>, esto se debe a su alto desempeño en el consumo del sustrato. Los consumos de vinaza están muy por debajo de la producción anual de vinaza en Argentina ya que se estima que anualmente se generan 4,1 millones de toneladas de vinazas en la producción de bioetanol (Ortiz y Erazzú 2019). La gran disponibilidad de vinaza favorecería la viabilidad de la producción de PHAs a partir de este subproducto.

El consumo total de energía para cada escenario se reporta en la Tabla 3.5. El consumo de energía para el escenario 1 se estimó en 11,9 MJ.kg<sup>-1</sup> de PHA. Otros escenarios estudiados presentaron un consumo similar entre ellos, variando entre 12 y 14 MJ.kg<sup>-1</sup> de PHA. Estos resultados son comparables con los valores disponibles en la literatura. Lopez-Arenas *et al.* (2017) informaron un consumo de alrededor de 10 MJ.kg<sup>-1</sup> de PHA para una planta con una capacidad de 1.000 ton.año<sup>-1</sup> que usa sacarosa como fuente de carbono. Leong *et al.* (2017) reportaron un consumo de energía eléctrica de 10 MJ.kg<sup>-1</sup> usando glicerol como sustrato para lograr 9.000 ton.año<sup>-1</sup> de producción de PHA.

**Tabla 3.3:** Consumo y costo de energía de diferentes escenarios de biosíntesis de PHAs

Escenario	Cepa	Energía Eléctrica (KJ/h)	Energía Térmica (KJ/h)	Costo de energía (USD/año)	Referencia
1	<i>H. mediterranei</i> <i>DSM 1411</i>	1,08 10 <sup>6</sup>	1,25 10 <sup>7</sup>	5,66 10 <sup>5</sup>	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2012)
2	<i>H. mediterranei</i> <i>DSM 1411</i>	1,58 10 <sup>6</sup>	1,26 10 <sup>7</sup>	6,54 10 <sup>5</sup>	(Bhattacharyya <i>et al.</i> 2012)
3	<i>C. necator</i>	3,83 10 <sup>6</sup>	1,25 10 <sup>7</sup>	1,02 10 <sup>6</sup>	(Acosta-Cárdenas <i>et al.</i> 2018)
4	<i>C. necator</i>	2,90 10 <sup>6</sup>	1,29 10 <sup>7</sup>	8,80 10 <sup>5</sup>	(Dalsasso <i>et al.</i> 2019)

El consumo de energía se puede subdividir en energía térmica y eléctrica. En particular, para el escenario 1, que fue el valor óptimo desde el punto de vista de la viabilidad económica, tuvo un consumo de energía térmica de 10,95 MJ.kg<sup>-1</sup> y eléctrico de 0,95 MJ.kg<sup>-1</sup>. Considerando que el costo de la energía térmica y eléctrica es de 0,01279 y 0,0678 USD.kW<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (Ramos *et al.* 2019), respectivamente, para este escenario el costo total de la energía fue de 880.000 USD.

La energía térmica requerida para la producción de PHAs utilizando vinaza como fuente de carbono podría obtenerse del bioetanol producido. En este sentido, considerando un costo de producción de bioetanol de 0,27 USD.L<sup>-1</sup>, el costo asociado a la energía térmica sería de 1,57 M USD.

Otra alternativa podría ser el uso de vinaza para generar energía. Según Muñoz Solares (2015), se requiere una mezcla del 10-30 % con un combustible fósil para que sea factible. En el caso de utilizar una mezcla de vinaza con bioetanol, el costo asociado sería mayor. Cabe señalar que, si bien el costo aumenta al utilizar biocombustibles, el

uso de energías renovables y residuos es una idea atractiva a la hora de generar un proceso con un menor impacto ambiental.

El costo de inversión inicial varió entre 7 y 13 M USD según el escenario. En particular, el escenario 1 representó el menor costo de inversión con un valor de 7,89 M USD. Cabe señalar que, para el cálculo de la inversión total se tuvo en cuenta el costo de capital requerido para la construcción de la planta, la puesta en marcha de la biorrefinería, el capital de trabajo y el costo de los equipos. Este valor es similar al encontrado en la bibliografía, Vaz Rossell *et al.* (2008) obtuvo una inversión de 15 M USD para una planta de PHAs a partir de caña de azúcar. Por otro lado, Ramos *et al.* (2019) obtuvo una inversión de 21 M USD para una planta de producción de PHAs a partir de caña de azúcar. Cabe señalar que, este valor incluye el procesamiento de la caña de azúcar para la obtención de su jugo que se utiliza para la obtención de biopolímeros. Tanto Vaz Rossell *et al.* (2008) como Ramos *et al.* (2019) consideraron plantas de 10.000 ton.año<sup>-1</sup>.

En la literatura abierta se pueden encontrar diferentes alternativas para la disposición de la vinaza. La concentración de vinaza y la posterior fertirrigación es una alternativa que cuenta con una inversión inicial de 4 M USD. La fertirrigación no requiere de una inversión inicial, sin embargo, se debe considerar el costo de transporte para el traslado de la vinaza. Otra alternativa es la digestión anaeróbica de vinaza para generar biogás, la inversión inicial requerida es de 7,8 M USD. Si bien el biogás se puede utilizar para generar electricidad y calor, se requiere un paso previo de limpieza. La digestión anaeróbica para la obtención de este gas renovable tiene una inversión de 8,1 M USD. Como se puede apreciar, estas alternativas tienen un costo de inversión inicial de la misma magnitud que la propuesta en este trabajo, sin embargo el uso de vinaza para la

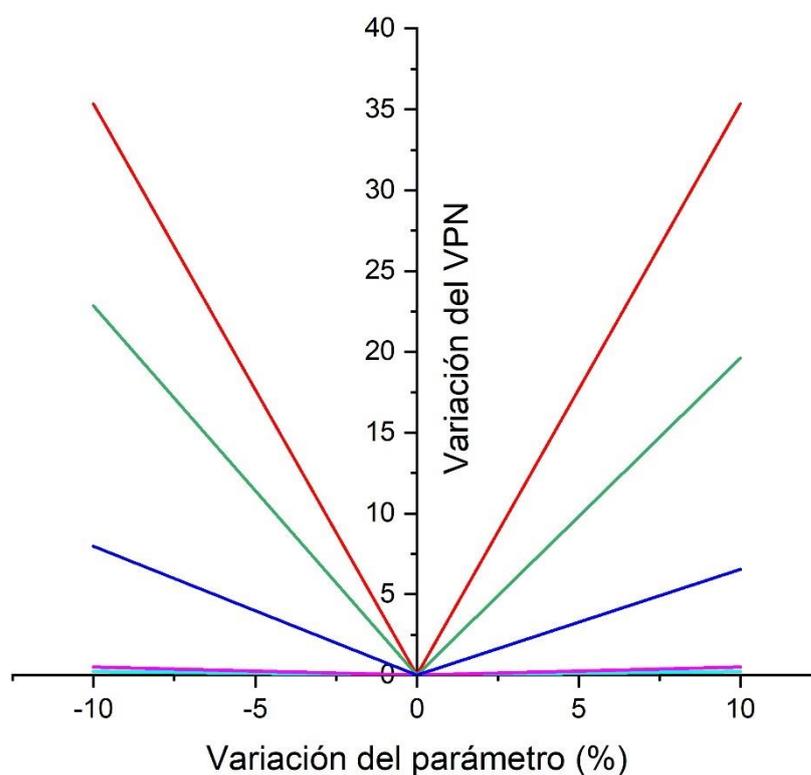
producción de PHAs generaría un beneficio económico ya que no solo se podría tratar un desecho, sino además se obtendría un producto de alto valor agregado (de Abreu *et al.* 2019).

Para estimar el resultado económico, se evaluó la viabilidad de la inversión utilizando la Tasa Interna de Retorno (TIR) del proyecto. La diferencia entre la TIR y la tasa de descuento puede considerarse como un indicador de la mayor rentabilidad del proyecto. En este proyecto se utilizó una tasa de descuento del 10 %. El escenario 1 tendría una TIR del 55 %, siendo un valor superior a los encontrados en la bibliografía. de Abreu *et al.* (2019) informaron una TIR del 24,1 %, y el PHB se obtuvo a partir de ácido succínico del hidrolizado de hemicelulosa junto con un 75 % de glucosa. Estos valores fueron similares a los obtenidos para el escenario 3 que sería del 28 %. Ramos *et al.* (2019) obtuvo un valor de TIR de 52 % utilizando caña de azúcar como fuente de carbono, similar al obtenido para los escenarios 1 y 2 que serían de 55 y 56 %, respectivamente. Lopez-Arenas *et al.* (2017) reportaron una TIR de 34,2 % utilizando sacarosa como fuente de carbono.

En cuanto al periodo de recuperación (PBP), este sería de 1-2 años en todos los escenarios excepto en el escenario 4 que sería de 2-3 años. Estos valores son inferiores a los encontrados en la bibliografía. Por ejemplo, Shahzad *et al.* (2017) reportaron un PBP de 3,25 a 4,5 años para una planta de PHAs que usa corrientes de la industria de procesamiento animal como fuente de carbono. Por otro lado, Lopez-Arenas *et al.* (2017) presentaron un PBP de 2,9 años para una planta de PHAs a partir de sacarosa.

El Retorno de la Inversión (ROI) obtenido en los escenarios 1 y 2 fue superior al 20 %, (27 y 21 %, respectivamente). Un valor superior al 20 % indica que el proceso puede ser rentable (Lopez-Arenas *et al.* 2017).

Se realizó un análisis de sensibilidad en el escenario 1 para evaluar la influencia de los diferentes valores de los parámetros sobre el VPN. En la Figura 3.2 se puede observar que el polímero acumulado por el microorganismo y el precio de venta del PHA son los parámetros más significativos. Por otro lado, el costo de la energía eléctrica y térmica tiene poca influencia en la función objetivo. El rendimiento de PHA tiene una menor influencia en el VPN que el PHA acumulado, esto se debe a que no se considera el costo del sustrato.



**Figura 3.2:** Análisis de sensibilidad realizado en el escenario 1 para evaluar la influencia de diferentes valores de los parámetros sobre el VNP. Símbolos: (---) Costo energía térmica, (---) Rendimiento PHA, (---) Costo energía eléctrica, (---) PHA acumulado y (---) Precio PHA.

### 3.4 Conclusiones

Los resultados de la superestructura analizada demostraron que es rentable obtener poli(hidroxialcanoato)s a partir de vinaza, un residuo contaminante de la producción de bioetanol. Los valores de VPN se ven afectados principalmente por dos de las variables estudiadas: biopolímero acumulado por la biomasa y rendimiento de PHA. Estas variables pueden incrementarse seleccionando una cepa productora de PHAs que acumule mayores cantidades de biopolímero y un medio de cultivo optimizado. En cuanto a los medios de cultivo, se recomienda pretratar la vinaza para obtener nutrientes más accesibles para los microorganismos. En caso de utilizar vinaza cruda, se sugiere mezclarla con otras fuentes de carbono como la melaza de caña de azúcar. Además, la presencia de sales inorgánicas en el medio favorecería la acumulación de PHAs.

### 3.5 Referencias

- Acosta-Cárdenas A, Alcaraz-Zapata W, Cardona-Betancur M (2018) Sugarcane molasses y vinasse as a substrate for polyhydroxyalkanoates ( PHA ) production - Melazas y vinaza de la caña de azúcar como sustrato para la producción de polihidroxialcanoatos ( PHA ). *RevistasUnalEduCo* 85:220–225. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n206.68279>
- Bhattacharyya A, Pramanik A, Maji SK, Halder S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012) Utilization of vinasse for production of *Haloferax mediterranei*. *AMB Express* 2:1-10 4. [doi:10.1186/2191-0855-2-34](https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-34)
- Chidambarampadmavathy K, Karthikeyan OP, Heimann K (2017) Sustainable bio-plastic production through lyfill methane recycling. *Renew Sustain Energy Rev* 71:555–562. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.083>

Dalsasso RR, Pavan FA, Bordignon SE, Falcão de Aragão GM, Patrícia Poletto (2019) Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse y molasses as mixed substrate. *Process Biochem* 85:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>

de Abreu FV, Gaya de Figueiredo MA, Alberton AL (2019) The Weight of Environment Aspect in the Choice of Vinasse Processing with New Technology through Economic Assessment. *J Environ Sci Eng A* 8:113–129. <https://doi.org/10.17265/2162-5298/2019.03.004>

Dietrich K, Dumont MJ, Del Rio LF, Orsat V (2019) Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *N Biotechnol* 49:161–168. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.004>

Gonzalez K, Navia R, Liu S, Cea M (2021) Biological Approaches in Polyhydroxyalkanoates Recovery. *Curr Microbiol* 78:1-10. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02263-1>

Jacquel N, Lo CW, Wei YH, Wu HS, Wang SS (2008) Isolation y purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem Eng J* 39:15–27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>

Kholis A, Maipita I, Fitrawaty, Herkules, Sagala GH, \*, Prayogo RR (2022) Feasibility Study of Hydroponics as a Home Industry. *Proceedings 2<sup>nd</sup> Int Conf Strateg Issues Econ, Bus y, Educ (ICoSIEBE 2021)* 204:109–112. <https://doi.org/10.2991/aebmr.k.220104.016>

Kourmentza C, Plácido J, Venetsaneas N, Burniol-Figols A, Varrone C, Gavala HN, Reis M (2017) Recent Advances y Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioeng* 4:1–43. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>

Kumar L, Kumar LR, Giri N, Kumar Kashyap B (2020) Waste to Energy: Prospects y Applications. *Waste to Energy Prospect Appl*. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-4347-4>

Laste Macagnan K, Igansi Alves M, Moreira A da S (2019) Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates. In: *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. In:

Kalia, V. (eds) Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_15)

Leong YK, Show PL, Lan JCW, Loh H, Lam HL, Ling T (2017) Economic y environmental analysis of PHAs production process. *Clean Technol Environ Policy* 19:1941–1953. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1377-2>

Lopez-Arenas T, González-Contreras M, Anaya-Reza O, Sales-Cruz M (2017) Analysis of the fermentation strategy y its impact on the economics of the production process of PHB (polyhydroxybutyrate). *Comput Chem Eng* 107:140–150. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2017.03.009>

Mannina G, Presti D, Montiel-Jarillo G, Carrera J, Suárez-Ojeda ME (2020) Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresour Technol* 297:122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478>

Muñoz Solares M (2015) Potential Energy Vinaza for Use As Fuel. *Mem Present Result* 2014 2015

Nakashima RN, de Oliveira Junior S (2020) Comparative exergy assessment of vinasse disposal alternatives: Concentration, anaerobic digestion y fertirrigation. *Renew Energy* 147:1969–1978. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.124>

Ortiz JM, Erazzú L (2019) Sugarcane energy : potential electricity production from vinasse produced by the ethanol industry. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 30:1595–1602.

Peña-Jurado E, Pérez-Vega S, Zavala-Díaz de la Serna FJ, Pérez-Reyes I, Gutiérrez-Méndez N, Vazquez J (2019) Production of poly (3-hydroxybutyrate) from a dairy industry wastewater using *Bacillus subtilis* EPAH18: Bioprocess development y simulation. *Biochem Eng J* 151:107324. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107324>

Penkhrue W, Jendrossek D, Khanongnuch C, Pathom-Aree W, Aizawa T, Behrens RL, Lumyong S (2020) Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. *PLoS One* 15:1–21.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230443>

Posada JA, Naranjo JM, López JA, Higuera J, Cardona CA (2011) Design y analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochem* 46:310–317.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.003>

Pramanik A, Mitra A, Arumugam M, Bhattacharyya A, Sadhukhan S, Ray A, Haldar S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012) Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiol (Praha)* 57:71–79.

<https://doi.org/10.1007/s12223-011-0092-3>

Ramos FD, Delpino CA, Villar MA, Diaz MS (2019) Design y optimization of poly(hydroxyalkanoate)s production plants using alternative substrates. *Bioresour Technol* 289:121699.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121699>

Roohi, Zaheer MR, Kuddus M (2018) PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) y its enzymatic degradation.

*Polym Adv Technol* 29:30–40. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>

Shahzad K, Narodoslowsky M, Sagir M, Ali N, Ali S, Rashid MI, Ismail I, Koller M (2017) Techno-economic feasibility of waste biorefinery: Using slaughtering waste streams as starting material for biopolyester production. *Waste Manag* 67:73–85.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.047>

Soto LR, Byrne E, van Niel EWJ, Sayed M, Carrasco Villanueva C, Hatti-Kaul R (2019) Hydrogen y polyhydroxybutyrate production from wheat straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor* species y *Ralstonia eutropha* in a coupled process. *Bioresour Technol* 272:259–266.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.142>

Trapé D V., López O V., Villar MA (2021) Vinasse: from a residue to a high added value biopolymer. *Bioresour Bioprocess* 8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00476-1>

Vaz Rossell CE, Mantelatto PE, Agnelli JAM, Nascimento J (2008) Sugar-based Biorefinery -

Technology for Integrated Production of Poly(3-hydroxybutyrate), Sugar, y Ethanol. In Biorefineries-Industrial Processes y Products (eds B. Kamm, P.R. Gruber y M. Kamm). <https://doi.org/10.1002/9783527619849.ch10>

Xu Y, Wang RH, Koutinas AA, Webb C (2010) Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochem* 45:153–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.001>

Zanfonato K, Schmidt M, Quines LK, Gai Santos C, Schmidell W, Falcão de Aragão GM (2018) Can vinasse be used as carbon source for Poly(3-hidroxybutyrate). Production by *Cupriavidus necator* DSM 545. *Brazilian J Chem Eng* 35:901–908. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170265>

# Capítulo 4: Optimización del proceso de secado de vinaza

---

## 4.1 Introducción

El proceso de obtención de bioetanol a partir de la caña de azúcar genera un subproducto conocido como vinaza que, si no se elimina adecuadamente, puede tener consecuencias ambientales negativas. Sin embargo, se ha demostrado que este residuo puede ser aprovechado para la producción de compuestos valiosos, como los polihidroxicanoatos (PHAs), mediante procesos biotecnológicos. La integración de la producción de PHAs utilizando vinaza en una planta de bioetanol puede generar beneficios económicos y ambientales. Es importante destacar que, el transporte de la vinaza desde la planta de bioetanol hasta la planta de PHAs puede ser costoso debido a los grandes volúmenes generados. Una solución para reducir los costos de transporte es la deshidratación de la vinaza, obteniendo un polvo de menor volumen. La obtención de un producto en polvo presenta otras ventajas tales como la facilidad de manejo y una vida útil más larga.

El secado por aspersión es una técnica de deshidratación que se utiliza para convertir un sistema líquido, como soluciones, dispersiones y emulsiones, en un polvo de partículas secas. En este proceso, el sistema líquido se atomiza en pequeñas gotas que se secan mediante el contacto con un medio de secado, generalmente aire a alta temperatura. Durante el proceso de secado por aspersión, las gotas se reducen y el solvente, que suele ser agua, se evapora. El secado por aspersión se caracteriza por su alta eficiencia de evaporación y su corto tiempo de contacto con el medio de secado, lo

que proporciona un costo de procesamiento bajo, una capacidad de producción alta y productos de alta calidad (Zhang *et al.* 2018).

Durante el proceso de secado por aspersión, las condiciones de procesamiento pueden ocasionar la formación de productos pegajosos, especialmente cuando la composición de la alimentación es rica en azúcares y ácidos. La adherencia de partículas a la pared interna de la cámara de secado puede generar aglomeración y reducir el rendimiento del producto. Bhyari *et al.* (1997) señalan que el comportamiento pegajoso de los materiales ricos en azúcar se atribuye principalmente al contenido de azúcares de bajo peso molecular, que tienen bajas temperaturas de transición vítrea. Para solucionar este problema, se ha investigado ampliamente el uso de agentes coadyuvantes como maltodextrinas, gomas, pectinas, fibras vegetales y almidones que facilitan el procesamiento de secado por aspersión. Estos aditivos se utilizan para proteger las sustancias de la humedad y la oxidación, y mejorar su estabilidad y calidad (Braga *et al.* 2020).

La maltodextrina (MD) es un producto derivado del almidón que se presenta como un polvo blanco. Su obtención se logra mediante un proceso de hidrólisis parcial del almidón, el cual conduce a la formación de fragmentos más pequeños de carbohidratos, tales como dextrinas y maltosas (Xiao *et al.* 2022). Las dextrinas son cadenas cortas de moléculas de glucosa, mientras que la maltosa es un disacárido que se forma a partir de dos moléculas de glucosa. En términos de composición, la MD contiene entre un 2 y un 3 % de glucosa, y entre un 5 y un 7 % de maltosa. Además, se caracteriza por ser ligeramente dulce, soluble en agua y poco o casi insoluble en alcohol (Xiao *et al.* 2022).

Es importante destacar que, la composición química y estructura de la MD pueden variar en función de diversos factores como el grado de polimerización y la fuente de almidón utilizada en su producción. El grado de depolimerización del almidón se puede medir mediante el valor equivalente de dextrosa (DE), que indica la cantidad de enlaces de glucosídico que se han roto en el almidón. Por otro lado, el valor inverso del grado medio de polimerización (DP) de las unidades de glucosa deshidratada también puede utilizarse para evaluar el grado de depolimerización del almidón. Un DP más bajo indica que el almidón se ha hidrolizado en fragmentos más pequeños (Garnero *et al.* 2013). En el caso de la MD, su valor DE oscila entre 3 y 20, lo que sugiere que su cadena de carbohidratos es larga y está compuesta por una mezcla compleja de polímeros de mediano y bajo peso molecular (Zhang *et al.* 2018). Como resultado de la digestión del almidón, la MD presenta una estructura parcialmente hidrolizada de amilosa y amilopectina, con unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces  $\alpha$ -(1→4) y segmentos ramificados unidos por enlaces  $\alpha$ -(1→6)(Garnero *et al.* 2013).

Las condiciones operativas del secado por atomización y la relación MD/sustrato influyen en el rendimiento del secado. La aplicación de diseños de experimentos permite la evaluación simultánea de varios factores, evitando la realización de numerosas corridas independientes que caracteriza a la tradicional aproximación paso a paso (Molla-Alizadeh-Zavardehi *et al.* 2013). En este capítulo se optimizaron las condiciones de secado por atomización de la vinaza utilizando maltodextrina (MD) como coadyuvante, mediante un diseño experimental de Box-Behnken. El producto seco obtenido se empleó para la producción de PHAs, específicamente polihidroxi butirato (PHB), mediante fermentaciones con *Bacillus megaterium* como microorganismo.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Materiales

Se empleó maltodextrina (MD) marca Globe 019150, con un valor de dextrosa equivalente (DE) de 15, y vinaza proporcionada por una empresa sucroalcoholera ubicada en Famaillá (Tucumán, Argentina). Cabe destacar que, en este capítulo se utilizó una muestra de vinaza distinta a las empleadas en los capítulos 2 y 3, denominada V<sub>2020</sub>.

### 4.2.2 Caracterización de la vinaza

Se determinó el Carbono Orgánico Total (COT) y el pH, de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 2 (2.2 Materiales y métodos 2.2.2 Sustrato). Además, se determinaron los Sólidos Totales (ST) por el Método Estándar 2540 D. Los ST son los residuos de material que quedan después de la evaporación en estufa a 103 - 105 °C. Estos métodos se encuentran descritos en la 20ª edición de los Métodos Estándar para el examen de agua y aguas residuales (Li *et al.* 2011).

### 4.2.3 Secado de vinaza

El diseño experimental Box-Behnken contempló 4 factores evaluados en 3 niveles (Tabla 4.1). Las variables independientes fueron las siguientes: temperatura de secado (°C), caudal de alimentación líquida (L.h<sup>-1</sup>), caudal de aire de atomización (L.h<sup>-1</sup>) y concentración de MD (%). Los niveles bajo, medio y alto de cada factor, codificados como -1, 0 y +1, respectivamente, fueron seleccionados en base experiencias preliminares (Tabla 4.1). Para todas las experiencias, se registró la temperatura de salida y se colectó el material depositado en la cámara de secado.

**Tabla 4.1:** Variables independientes con sus valores codificados y niveles correspondientes

Nivel	Temperatura de secado (°C)	Caudal de alimentación líquida (L.h <sup>-1</sup> )	Caudal de aire de atomización (L.h <sup>-1</sup> )	Concentración de MD (%)
Alta (+1)	160	0,09	357	50
Central (0)	145	0,17	479	40
Baja (-1)	130	0,24	601	30

La matriz de diseño para los 27 experimentos se presenta en la Tabla 4.2. Las variables de respuesta fueron el rendimiento de secado (%) y la productividad de PHB (g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) empleando las muestras de vinaza secadas. Se prepararon las mezclas de vinaza y MD de acuerdo a las formulaciones arrojadas por el diseño de experimentos. Las preparaciones líquidas se atomizaron en un secadero Büchi B-290 Mini Spray Dryer (Büchi, Suiza) modificando las condiciones operativas de: temperatura de entrada del aire de secado (T); caudal de alimentación y el caudal de aire de atomización de acuerdo al diseño de experimentos.

**Tabla 4.2:** Valores de los factores para las variables independientes de los experimentos para optimizar las condiciones de secado por aspersion de vinaza

Corrida	Temperatura de secado (°C)	Caudal de aire de atomización (L.h <sup>-1</sup> )	Caudal de alimentación líquida (L.h <sup>-1</sup> )	Concentración de MD (%)
1	1	-1	0	0
2	0	0	1	-1
3	-1	-1	0	0
4	0	1	1	0
5	1	0	-1	0
6	1	0	1	0
7	-1	0	0	1
8	0	0	1	1
9	1	0	0	-1
10	0	-1	1	0
11	0	0	-1	-1

12	0	-1	0	-1
13	-1	0	0	-1
14	0	0	-1	1
15	0	-1	0	1
16	0	-1	-1	0
17	0	1	-1	0
18	0	1	0	1
19	0	1	0	-1
20	-1	0	1	0
21	1	0	0	1
22	-1	1	0	0
23	1	1	0	0
24	-1	0	-1	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Por otro lado, el caudal de aire de secado se mantuvo en 35 - 38 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> (correspondiente al 100 % de aspiración). Con el objeto de mantener la homogeneidad, las suspensiones se mantuvieron en agitación mientras la alimentación era bombeada.

#### 4.2.3.1 Rendimiento de secado

A partir de los sólidos recuperados del ciclón de separación gas-sólido, los del vaso recolector de producto y el contenido total de sólidos alimentados se calculó el rendimiento de secado (RS) según la ecuación 4.1:

$$RS [\%] = \frac{\text{Masa Sólidos Recuperados}}{\text{Masa Sólidos Alimentados}} \cdot 100 \quad [4.1]$$

#### 4.2.3.2 Determinación del COT de los polvos obtenidos

Una vez obtenidos los polvos se determinó el COT de cada uno de ellos, de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 2.

#### 4.2.4 Obtención de PHB a partir de vinaza seca

Las fermentaciones se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 250 mL, que contenían 100 mL de medio de cultivo, a 30 °C durante 24 h y 200 rpm en un agitador orbital. El medio de cultivo utilizado fue: 2,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 0,5 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,9 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,17 g.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y vinaza seca. La cantidad de vinaza agregada al medio de cultivo varió en función del valor de COT para mantener una concentración de carbono (C) de 4 g.L<sup>-1</sup>. Por otra parte, el pH del medio fue ajustado a 7,0 con NaOH 2,5 M. Cabe destacar que, la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación empleadas corresponden a las optimizadas en el Capítulo 2.

La cuantificación del PHB acumulado se llevó a cabo también según lo descrito en el Capítulo 2.

#### 4.2.5 Optimización global del proceso de secado: deseabilidad individual (d) y global (D)

En muchas ocasiones, la calidad de un producto manufacturado no puede ser caracterizada por una única respuesta, sino por un conjunto de respuestas que pueden estar correlacionadas o no. Cada una de estas respuestas está determinada en unidades y escalas de medición diferentes, lo que hace que se requieran diferentes criterios de optimización. En este escenario, lograr una optimización global del sistema se vuelve complicado, ya que un conjunto único de condiciones óptimas no garantiza que todas las respuestas sean optimizadas simultáneamente. Para abordar esta optimización simultánea global, se han utilizado diversas metodologías heurísticas que combinan los requerimientos individuales de cada respuesta en un único requerimiento compuesto. (Raissi y Farsani 2009). En este contexto, en 1965, Harrington desarrolló la función de

deseabilidad para optimizar simultáneamente múltiples respuestas. Desde entonces, la función ha sido modificada para mejorar su aplicabilidad (Kuhn 2016) y se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para la optimización multi-respuesta. La estrategia de la función de deseabilidad consiste en transformar cada una de las funciones de superficie de respuesta ( $Y_i'$ ) en su correspondiente función de deseabilidad individual ( $d_i$ ), y luego combinarlas para formar la función de deseabilidad global ( $D$ ) como único objetivo de optimización.

#### 4.2.5.1 Función de deseabilidad individual ( $d$ )

La respuesta individual puede ser diseñada de forma que su deseabilidad se establezca en 1 cuyo se alcance el nivel deseado de respuesta, ya sea mínimo, máximo u objetivo, y tienda a 0 a medida que se aleje de dicho valor (Kuhn 2016). Por lo tanto, se pueden proponer tres formas diferentes de la función de deseabilidad ( $d$ ) en función del objetivo de optimización ( $d_{\min}$ ,  $d_{\max}$ ,  $d_{\text{obj}}$ ). En los casos en los que se busca maximizar la función variable de respuesta, se define  $d_{\max}$  de acuerdo a la ecuación 4.2:

$$d_{\max} = \begin{cases} 0, & Y' < L \\ [(Y' - L)/(U - L)]^s, & L < Y' < U \\ 1, & Y' > U \end{cases} \quad [4.2]$$

donde  $L$  y  $U$  son los límites inferior y superior del intervalo donde se desea que se encuentre la respuesta, independientemente del objetivo de optimización. El peso  $s$  establece la linealidad de la función deseabilidad con respecto al modelo.

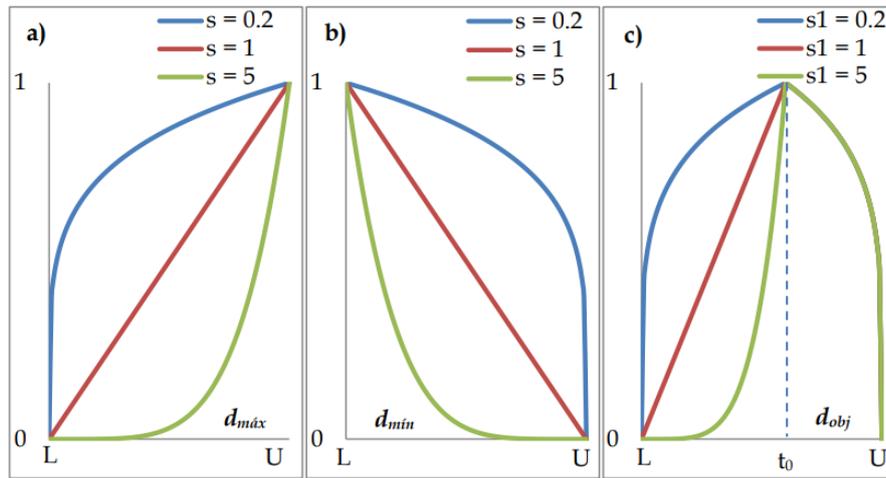
Por otro lado, en los casos en que  $Y'$  desea ser minimizada, la deseabilidad se define como  $d_{\min}$  de acuerdo a la ecuación 4.3:

$$d_{min} = \begin{cases} 0, & Y' > U \\ [(Y' - U)/(L - U)]^s, & L < Y' < U \\ 1, & Y' < L \end{cases} \quad [4.3]$$

Finalmente, cuyo se busca que la variable de respuesta tenga un valor específico ( $t^*$ ), su función de deseabilidad se define como  $d_{obj}$ , tal que tome el valor 1 en ese punto y se definen nuevas expresiones a ambos lados del punto objetivo de acuerdo a la ecuación 4.4:

$$d_{obj} = \begin{cases} [(Y' - U)/(L - U)]^{s_1}, & L < Y' < t^* \\ [(Y' - U)/(L - U)]^{s_2}, & t^* < Y' < U \\ 1, & \text{En cualquier otro caso} \end{cases} \quad [4.4]$$

En todos los casos, fuera del intervalo  $L - U$  la deseabilidad se anula (Raissi y Farsani 2009). Los valores de  $s$ ,  $s_1$  y  $s_2$  se eligen de acuerdo a la facilidad o dificultad con la que se satisfacen las condiciones. Un valor de  $s = 1$  establece una relación lineal entre la función ajustada de la respuesta y la deseabilidad. Cuyo se desea penalizar las situaciones en las que la función ajustada se aleja del óptimo, se debe considerar un valor de  $s > 1$ , de modo que la deseabilidad caiga abruptamente a medida que las condiciones se alejan del óptimo. Finalmente, un valor de  $s < 1$  se aplica en una situación más flexible, es decir cuyo se espera que la deseabilidad se encuentre cercana a 1 aún en lejanías de los puntos óptimos (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Funciones de deseabilidad. Se desea que la respuesta de interés alcance: a) un valor máximo ( $d_{m\acute{a}x}$ ); b) un valor mínimo ( $d_{mín}$ ) o c) un valor objetivo ( $d_{obj}$ )

#### 4.2.5.2 Función de deseabilidad global (D)

Una vez establecida la función de deseabilidad para cada una de las respuestas de interés, éstas pueden ser combinadas para formar una única función deseabilidad compuesta (o global) que convierte el problema multi-respuesta en uno de respuesta simple (Raissi y Farsani 2009). La función de deseabilidad global (D) se define como la media geométrica de las deseabilidades individuales ( $d_i$ ) (Kuhn 2016), de acuerdo a la ecuación 4.5:

$$D = \left( \prod_i^n (d_i) \right)^{\frac{1}{n}} \quad [4.5]$$

donde n es el número total de respuestas involucradas.

Así, si todas las características de calidad alcanzan su valor ideal, la deseabilidad es 1 para todas las respuestas individuales ( $d_i = 1$  para todo i); si alguna respuesta no alcanza su valor ideal, su deseabilidad es menor a 1, por lo tanto la global también lo es;

y si alguna de las respuestas cae fuera de los requerimientos de calidad, su deseabilidad es 0 y entonces la deseabilidad total también es nula (Raissi y Farsani 2009).

El proceso de optimización global consiste entonces en encontrar las condiciones que conducen a un máximo valor de deseabilidad global, que puede ser resuelto mediante técnicas computacionales. En el caso particular del proceso de optimización de secado de la vinaza, se construyeron las funciones de deseabilidad máxima individual en base a las superficies de respuestas obtenidas para el rendimiento de secado y la productividad de PHB. A partir de estas deseabilidades individuales se construyó la función de deseabilidad global con el fin de lograr una optimización integral del proceso de secado. Para este estudio se utilizaron las herramientas de análisis del software Statgraphics Centurion XV.11 X64.

#### 4.2.6 Ensayos de caracterización de las muestras de vinaza seca

##### 4.2.6.1 Tamaño de partículas

La distribución de tamaño de partículas en suspensión se determinó utilizando un equipo de difracción láser Horiba LA - 950 V2 (Horiba Ltd., Japón). El tamaño promedio de las partículas se expresó como el diámetro volumétrico medio  $D[4,3]$ .

##### 4.2.6.2 Fluidez

Para determinar las propiedades de flujo se calculó el Índice de Carr. Para ello, el polvo se vertió en una probeta de  $10 \text{ cm}^3$  previamente tarada y se pesó para determinar la masa del mismo. La densidad a granel ( $\text{Dens}_G$ ) se calculó como la relación entre la masa de polvo y el volumen ocupado por el mismo (graduado en la probeta). La densidad empaquetada ( $\text{Dens}_E$ ) se determinó sometiendo la probeta con el polvo pesado a una serie de impactos verticales suaves hasta que el volumen final ocupado no presentó variaciones. La  $\text{Dens}_E$  se calculó como la relación entre la masa de polvo y el volumen

ocupado por el mismo después de los impactos. La fluidez del polvo se determinó utilizando el Índice de Carr (Schüssele y Bauer-Bryl, 2003) según la ecuación 4.6:

$$IC = \frac{DES_E - DES_G}{DES_E} 100 \% \quad [4.6]$$

Valores de IC por debajo del 10 % indican flujo excelente, valores entre 11 y 15 % son representativos de buena fluidez, desde 16 y hasta 20 % el flujo es razonable, mientras que entre 21 y 25 % el material presenta aceptables propiedades de flujo. El polvo posee pobre fluidez cuando los valores de IC se encuentran entre 26 y 31 %.

### 4.3 Resultados y Discusión

#### 4.3.1 Caracterización de la muestra de vinaza

El COT, el pH y los ST de la muestra de vinaza V<sub>2020</sub> se muestran en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3:** Propiedades fisicoquímicas de las muestras de vinaza

Propiedades fisicoquímicas	Vinaza		
	V <sub>2017</sub>	V <sub>2018</sub>	V <sub>2020</sub>
COT (g.L <sup>-1</sup> )	40,5 ± 0.5	16,3 ± 0.5	42,0 ± 1,5
pH	4,8	4,6	4,7
ST (mg.L <sup>-1</sup> )	nd	nd	114,56 ± 1,34

**COT:** Carbono Orgánico Total; **ST:** Sólidos Totales. **nd:** no determinado.

Con respecto al contenido de COT, se observó un valor similar entre las muestras V<sub>2020</sub> y V<sub>2017</sub>. Los valores de pH de las muestras de vinaza se encontraron dentro del rango reportado en la literatura (Fukushima *et al.* 2019), lo que representa un desafío en términos de disposición de este subproducto debido a su pH bajo.

El valor de ST se encuentra dentro del rango reportado en la bibliografía, que va de 113,4 a 599,4 mg L<sup>-1</sup> (Ortegón, 2016). El valor de ST obtenido se utilizó para calcular los sólidos alimentados en el secadero y posteriormente el rendimiento del secado.

#### 4.3.2 Secado de vinaza

##### 4.3.2.1 Optimización del proceso para maximizar el rendimiento del secado

Para optimizar el secado de la vinaza se llevaron a cabo 27 experimentos, dados por el diseño experimental de Box-Behnken, y se obtuvieron los valores de rendimiento (RS) que se incluyen en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4:** Valores de la variable de respuesta rendimiento de secado (RS) experimentales y estimados por el modelo para optimizar el secado de vinaza por aspersion

Corrida	RS <sub>exp.</sub> (%)	RS <sub>mod.</sub> (%)
1	80,4	76,1
2	84,7	83,2
3	82,7	76,6
4	87,5	84,2
5	42,2	36,7
6	49,5	46,2
7	82,5	78,2
8	76,0	73,9
9	42,7	44,0
10	45,7	50,1
11	76,9	77,4
12	82,4	86,0
13	67,0	68,4
14	74,2	77,9
15	78,5	79,7
16	68,2	71,7
17	60,1	65,4
18	81,0	80,4
19	72,3	75,6
20	77,9	75,3
21	45,8	47,6

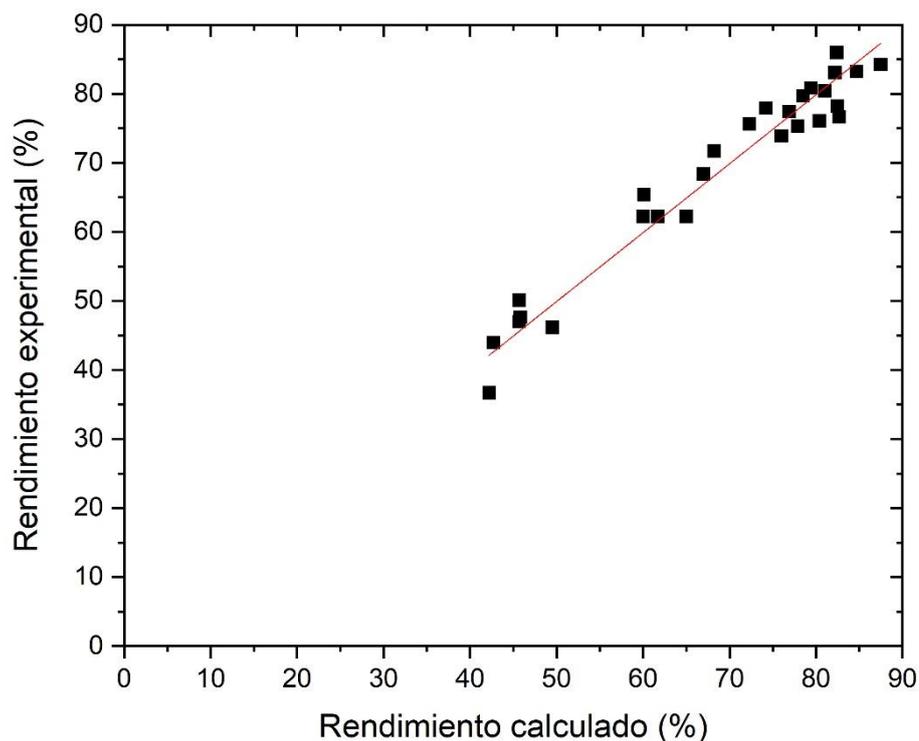
<b>22</b>	45,7	47,0
<b>23</b>	79,4	80,8
<b>24</b>	82,2	83,1
<b>25</b>	61,7	62,2
<b>26</b>	60,0	62,2
<b>27</b>	65,0	62,2

De acuerdo con la Tabla 4.4, el rendimiento de secado obtenido experimentalmente estuvo comprendido entre 87,5 (corrida 4) y 42,2 % (corrida 5). A continuación, se presenta el modelo cuadrático ajustado para el rendimiento de secado (RS), en función de las variables independientes estudiadas y sus interacciones.

$$\begin{aligned}
 RS = & 762,18 - 6,258 MD - 11,249 T + 12,005 CL + 6,780 CA + 0,087 MD^2 + \\
 & 0,0008 MD T - 0,0765 MD CL + 0,006 MD CL + 0,040 T^2 - 0,058 T CL + \quad [4.6] \\
 & 0,005 T CA + 0,126 CL^2 - 0,069 CL CA - 0,066 CA^2
 \end{aligned}$$

donde MD es la concentración de maltodextrina (%), T es la temperatura de secado (°C), CL es el caudal de alimentación líquida (L.h<sup>-1</sup>) y CA es el caudal de aire de atomización (L.h<sup>-1</sup>).

El R<sup>2</sup> obtenido fue de 95,36 %. La representación de los valores obtenidos experimentalmente en función de los ajustados (estimados) se presenta en la Figura 4.2 indicando una buena correlación entre ambos y con ello un buen ajuste del modelo.



**Figura 4.2:** Rendimiento de secado experimental en función de los obtenidos por el modelo cuadrático ajustado.  $R^2=0,99$

Realizando un análisis de la varianza de los valores obtenidos, se estudiaron las variables que afectaron significativamente a la respuesta de interés ( $p < 0,05$ ). Los valores de  $p$  para las cuatro variables independientes y sus interacciones se reportan en la Tabla 4.5. Es importante notar que, no todas las variables afectaron al rendimiento de secado de la misma manera. Se puede observar que el caudal de aire de atomización (CA) y la concentración de MD influyeron estadísticamente en el rendimiento del secado, considerando un nivel de significación de 0,05 ( $p = 0,0000$  y  $0,0185$ , respectivamente). Por otro lado, la temperatura de secado (T) y el caudal de alimentación líquida (CL) no fueron estadísticamente significativos ( $p = 0,7767$  y  $0,3606$ , respectivamente). Las interacciones entre las variables estudiadas no fueron

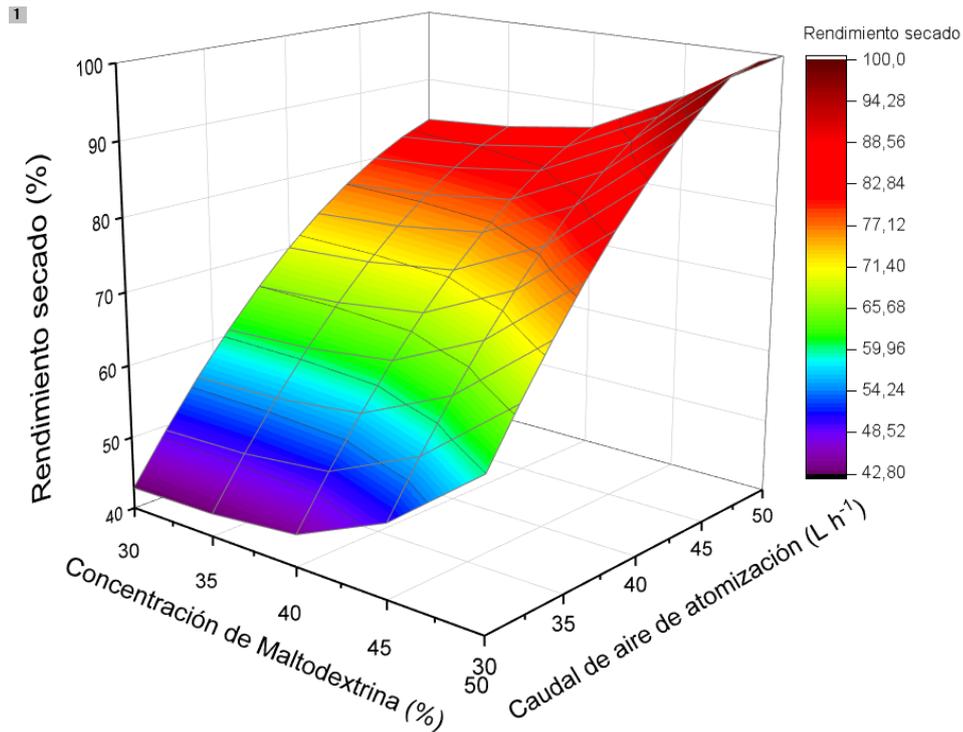
destacables sobre el rendimiento de secado y los efectos de orden superior que resultaron significativos fueron la concentración de MD, la temperatura de secado (T) y el caudal de alimentación (CA) ( $p = 0,0010, 0,0008$  y  $0,0066$ , respectivamente).

**Tabla 4.5:** Valores de  $p$  para las variables independientes y sus interacciones, obtenidas a partir de la optimización del proceso para maximizar el rendimiento del secado.

Variable	$p$
MD	0,0185
T	0,7767
CL	0,3606
CA	0,0000
MD <sup>2</sup>	0,0010
MD T	0,9582
MD CL	0,1278
MD CA	0,7938
T <sup>2</sup>	0,0008
T CL	0,0859
T CA	0,7618
CL <sup>2</sup>	0,1443
CL CA	0,1659
CA <sup>2</sup>	0,0066

MD = Concentración de maltodextrina (%), T = Temperatura de secado (°C), CL = Caudal de alimentación líquida (L.h<sup>-1</sup>), CA = Caudal de aire de atomización (L.h<sup>-1</sup>)

Estos efectos se vieron reflejados en la Figura 4.3, la cual presenta la superficie de respuesta ajustada del rendimiento de secado para las variables independientes que tienen una influencia significativa en esta variable (MD y CA).



**Figura 4.3:** Superficie de respuesta del rendimiento de secado de vinaza en función de la concentración de maltodextrina y del caudal de aire de atomización

El rendimiento de secado fue mayor a elevados caudales de aire de atomización y las mayores concentraciones de maltodextrina empleada (Figura 4.3). El análisis de la varianza evidenció como parámetro influyente sobre el rendimiento al caudal de atomización, tanto en su término lineal como cuadrático. Una mayor energía aplicada al proceso de atomización (observada en este caso como caudal de aire de atomización) conduce a partículas con tamaños cada vez menores, aumentando así el área total de transferencia de calor por unidad de volumen y, por ende, la transferencia de calor y masa (Phisut 2012). Por otra parte, cuyo los tamaños de partícula son más pequeños, el cono de atomización formado es más estrecho, por lo que las gotas generadas tienen menos posibilidad de alcanzar las paredes de la cámara de secado y, cuyo lo hacen (hacia el final de la longitud total de la cámara), éstas ya se encuentran casi secas, reduciendo

así las pérdidas por pegado (Di Battista 2015). La concentración de MD también mostró un impacto significativo sobre el rendimiento de secado, pero de menor importancia. El orden cuadrático prepondera sobre el lineal. El aumento en la proporción de MD se asoció con un aumento en el rendimiento del proceso de secado. Este resultado es consistente con estudios previos, como el realizado por Fang y Bhyari (2012) sobre el secado por atomización de jugo de bayas, quienes encontraron la misma tendencia. Además, el estudio realizado por Koç y Dirim (2018) sobre el secado por atomización de jugo de espinaca demostró que una mayor concentración de MD condujo a un mayor rendimiento de secado. Las mejores condiciones para el rendimiento de secado ajustado por el modelo se encontraron cuando ambos factores (caudal de alimentación y concentración de MD) estaban en su nivel alto.

Después de desarrollar la ecuación que modela el rendimiento de secado en función de las variables independientes, se determinaron las condiciones óptimas para esta respuesta. Estas condiciones son: temperatura de secado de 156 °C, caudal de atomización de 553 L.h<sup>-1</sup> en el rotámetro, apertura de la bomba de alimentación del 0,09 L.h<sup>-1</sup> y concentración de MD de 49,7 %. Siguiendo estas condiciones, se podría alcanzar un rendimiento de secado del 100 %.

#### 4.3.2.2 Determinación del COT de las muestras de vinaza seca

En la Tabla 4.6 se muestra el valor del COT determinado para las muestras de vinaza secas, el cual varió entre 68,5 y 112,6 mg.L<sup>-1</sup>. Este valor de COT se utilizó posteriormente para la preparación de los medios de cultivo utilizados en la producción de PHB por *B. megaterium*.

**Tabla 4.6:** Valores de Carbono Orgánico Total (COT) de las muestras de vinaza secas

Corrida	COT (mg.L <sup>-1</sup> )
1	74,6
2	79,8
3	80,1
4	83,8
5	84,6
6	90,0
7	72,5
8	85,7
9	79,0
10	70,7
11	83,7
12	89,7
13	83,1
14	93,2
15	73,4
16	72,2
17	112,6
18	106,5
19	75,1
20	69,8
21	76,0
22	69,5
23	79,2
24	72,3
25	86,3
26	68,5
27	94,3

#### 4.3.2.3 Optimización de proceso de secado para maximizar la productividad de PHB

Luego de obtener las 27 muestras de vinaza seca y determinar su COT, se llevó a cabo la preparación de los medios de cultivo, las fermentaciones correspondientes y la determinación de la productividad de PHB (Tabla 4.7). De acuerdo con los resultados, la

productividad obtenida experimentalmente estuvo comprendida entre 0,0052 (corrida 9) y 0,0285 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (corrida 2).

**Tabla 4.7:** Valores productividad experimental de PHB (P) y estimada por el modelo para optimizar el secado de vinaza por aspersión

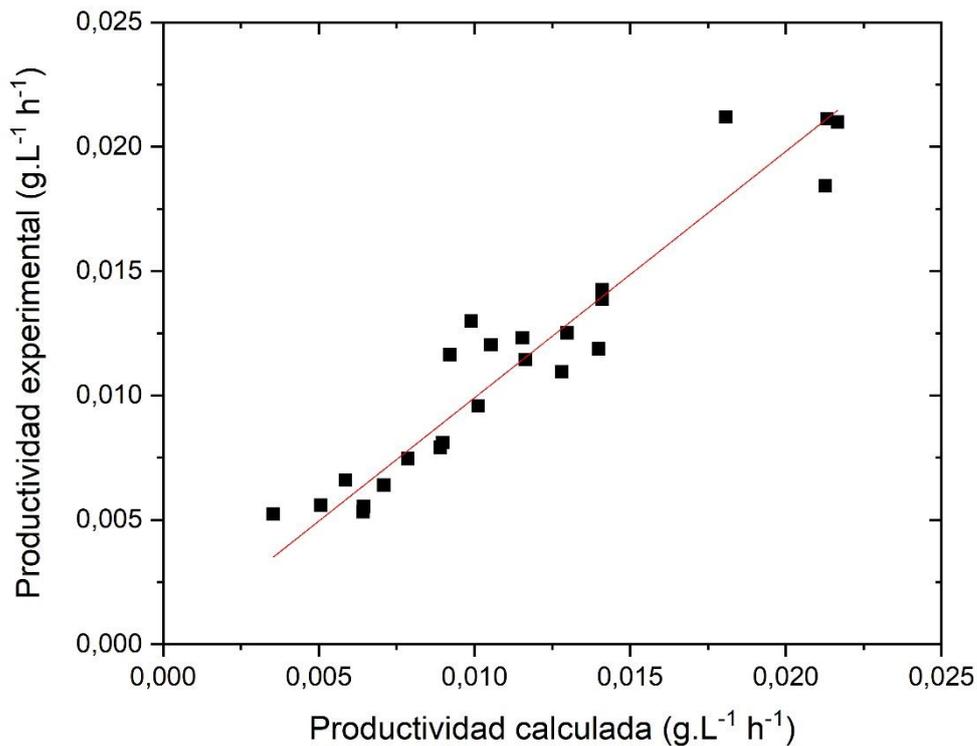
<b>Corrida</b>	<b>P<sub>exp.</sub> (g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>P<sub>mod.</sub> (g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>
1	0,0066	0,0072
2	0,0285	0,0216
3	0,0055	0,0103
4	0,0212	0,0226
5	0,0120	0,0203
6	0,0123	0,0120
7	0,0130	0,0204
8	0,0116	0,0098
9	0,0052	0,0094
10	0,0184	0,0237
11	0,0056	0,0087
12	0,0128	0,0171
13	0,0119	0,0204
14	0,0096	0,0157
15	0,0110	0,0084
16	0,0114	0,0004
17	0,0053	0,0129
18	0,0210	0,0372
19	0,0064	0,0062
20	0,0211	0,0042
21	0,0125	0,0138
22	0,0075	0,0103
23	0,0079	0,0076
24	0,0081	0,0142
25	0,0143	0,0170
26	0,0139	0,0170
27	0,0142	0,0170

El modelo cuadrático ajustado para la productividad (P) en función de las variables independientes estudiadas y sus interacciones se describe en la ecuación 4.7:

$$\begin{aligned}
 P = & -0,1569 + 0,0023 MD + 0,0015 T - 0,0002 CL + 0,0019 CA + \\
 & 0,000007 MD^2 - 0,00001 MD T - 0,000005 MD CL - \\
 & 0,00001 MD CA - 0,000006 T^2 + 0,000009 T CL - \\
 & 0,00003 CL^2 - 0,000008 CL CA - 0,00003 CA^2
 \end{aligned}
 \tag{4.7}$$

donde MD es la concentración de maltodextrina (%), T es la temperatura de secado (°C), CL es el caudal de alimentación líquida (L.h<sup>-1</sup>) y CA es el caudal de aire de atomización (L.h<sup>-1</sup>).

El R<sup>2</sup> obtenido fue de 89,42 %. Los valores de productividad obtenidos experimentalmente en función de los predichos por el modelo se muestran en la Figura 4.4, indicando una buena correlación entre ambos y con ello un buen ajuste del modelo.



**Figura 4.4:** Productividad de PHB experimental en función de los obtenidos por el modelo cuadrático ajustado.  $R^2=0,99$

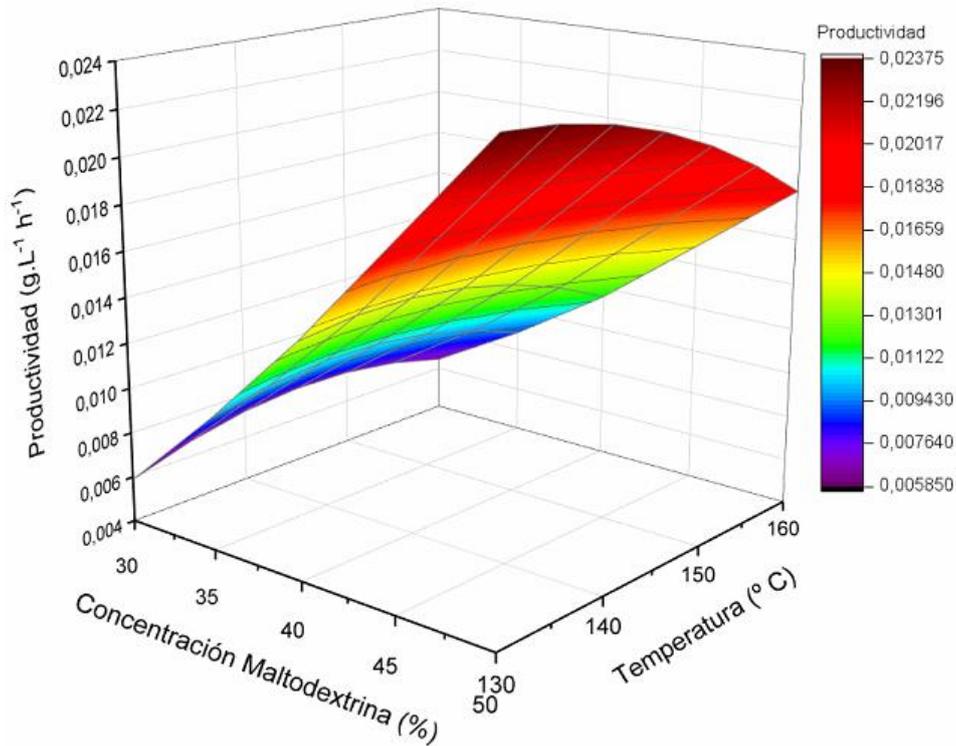
Realizando un análisis de la varianza de los valores observados, se encontró que la concentración de MD afectó significativamente a la respuesta de interés ( $p = 0,000$ ). Los valores de  $p$  para las cuatro variables independientes y sus interacciones se reportan en la Tabla 4.8. Se puede observar que el caudal de aire de atomización (CA), la temperatura de secado (T) y el caudal de alimentación (CL) no influyeron estadísticamente en la productividad de PHB, considerando un nivel de significación de 0,05 ( $p = 0,3721, 0,1416$  y  $0,9187$ , respectivamente). Las interacciones entre las variables estudiadas no fueron destacables sobre la productividad y el efecto cuadrático que resultó significativo fue  $CA^2$  ( $p = 0,0226$ ).

**Tabla 4.8:** Valores de  $p$  para las variables independientes y sus interacciones, obtenidas a partir de la optimización del proceso para maximizar la productividad de PHB

Variable	$p$
MD	0,0000
T	0,1416
CL	0,9187
CA	0,3721
MD <sup>2</sup>	0,5704
MD T	0,2851
MD CL	0,8598
MD CA	0,3002
T <sup>2</sup>	0,3043
T CL	0,6349
T CA	0,3665
CL <sup>2</sup>	0,5840
CL CA	0,7643
CA <sup>2</sup>	0,0226

MD = concentración de maltodextrina (%), T = Temperatura de secado (°C), CL = Caudal de alimentación líquida (L.h<sup>-1</sup>), CA = Caudal de aire de atomización (L.h<sup>-1</sup>)

Estos efectos se vieron reflejados en la Figura 4.5, que muestra la superficie de respuesta ajustada de la productividad en función de la concentración de maltodextrina y la temperatura de secado.



**Figura 4.5:** Superficie de respuesta de la productividad de PHB en función de la concentración de maltodextrina y de la temperatura del aire de atomización.

Se obtuvo un aumento significativo en la productividad de PHB al incrementar la concentración de maltodextrina, lo cual sugiere que ésta es una fuente de carbono adecuada para el crecimiento y acumulación de PHB por *B. megaterium*. Una vez establecida la ecuación que modela el comportamiento de la productividad con las variables independientes, se buscó y encontró el conjunto de condiciones óptimas para

esta respuesta. En efecto, estableciendo una temperatura de secado de 130°C, un caudal de atomización correspondiente a 404 L.h<sup>-1</sup>, 0,14 L.h<sup>-1</sup> de caudal de alimentación líquida y una concentración de maltodextrina del 50 %, se podría alcanzar una productividad de 0,0248 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

El valor de productividad de PHB alcanzado fue significativamente mayor que el obtenido en el Capítulo 2 empleando vinaza líquida (0,0105 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), lo que confirma la influencia positiva de la MD en la producción de PHB por *Bacillus megaterium*. Aunque la producción de PHB empleando hidrolizados de almidón ha sido abordada por diversos autores, son pocos los estudios que han utilizado cepas del género *Bacillus*. En este sentido, Ramadas *et al.* (2009) reportó una productividad similar a la obtenida en este capítulo, alcanzando un valor de 0,0197 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> empleando hidrolizado de almidón de papa y *Bacillus sphaericus* NCIM 5149 como microorganismo. Asimismo, Porras (2016) obtuvo una productividad de 0,023 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> empleando este microorganismo y almidón soluble. Según los resultados obtenidos y los reportados por otros autores, la vinaza por sí sola no proporcionaría una fuente de carbono suficiente para lograr grandes cantidades de producción de biomasa y PHB. Por lo que, complementar el cultivo con una fuente de carbono adicional resultaría beneficioso. En este sentido, Acosta Cardenas *et al.* (2018) utilizó como sustrato una combinación de vinaza y melaza de caña de azúcar reportando una mejora significativa en la productividad de PHAs.

#### 4.3.2.4 Optimización de las condiciones de secado para maximizar el rendimiento del proceso y la productividad de PHB

En la sección precedente se obtuvieron las condiciones de secado que conducen al óptimo de cada respuesta individual. Las condiciones para maximizar el rendimiento del secado y la productividad de PHB fueron diferentes entre sí. En consecuencia, resulta

imposible establecer un único conjunto de variables para el cual todas las respuestas se encuentren en su valor máximo. Por lo tanto, la deseabilidad es una herramienta útil para determinar las condiciones que aseguren la optimización global del proceso.

De acuerdo con esto, y empleando la ecuación [4.2], se establecieron las funciones de deseabilidad individual ( $d_i$ ) para cada una de las respuestas de interés. Cada  $d_i$  fue definida en términos de la ecuación de ajuste de la respectiva respuesta (ecuaciones [4.6] y [4.7]). Para cada función, el correspondiente intervalo de valores se estableció considerando los valores experimentales mínimo y máximo de cada respuesta. Además, en todos los casos el peso  $s$  se estableció igual a 1. Así, para el rendimiento del secado ( $d_1$ ), la función deseabilidad quedó definida según la ecuación 4.8:

$$d_1 = \begin{cases} 0, & Y' < 42,2 \\ [(Y' - 42,2)/(87,4 - 42,2)]^1, & 42,2 < Y' < 87,4 \\ 1, & Y' > 87,4 \end{cases} \quad [4.8]$$

Por su parte, la deseabilidad asociada a la productividad ( $d_2$ ) se define según la ecuación 4.9:

$$d_2 = \begin{cases} 0, & Y' < 0,0052 \\ [(Y' - 0,0052)/(0,0285 - 0,0052)]^1, & 0,0052 < Y' < 0,0285 \\ 1, & Y' > 0,0285 \end{cases} \quad [4.9]$$

Una vez establecidas las deseabilidades individuales, se definió, la función global (D) de acuerdo a la ecuación 4.10.

$$D = (d_1 d_2)^{\frac{1}{2}} \quad [4.10]$$

Una vez especificada la función deseabilidad global ajustada fue posible predecir las condiciones operativas del proceso de secado que conducirían a un óptimo global dentro de la ventana operativa de diseño utilizando la opción de optimización de múltiples respuestas del software Statgraphics. Los valores obtenidos para cada variable independiente como así también la deseabilidad global estimada se presentan en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9:** Condiciones óptimas del proceso de secado y deseabilidad global estimada

MD (%)	50
T (°C)	130,6
CA (L.h <sup>-1</sup> )	500
CL (L.h <sup>-1</sup> )	0,09
Deseabilidad global estimada	0,879

Se realizó un ensayo experimental por duplicado del punto óptimo bajo las condiciones descritas en la Tabla 4.9 y se calcularon los rendimientos del proceso de secado. Posteriormente, las muestras de vinaza seca obtenidas bajo estas condiciones se emplearon para llevar a cabo fermentaciones con *B. megaterium* y se calcularon las productividades de PHB. Los resultados experimentales de las respuestas de interés del diseño (rendimiento de secado y productividad de PHB) se emplearon para calcular las deseabilidades individuales y posteriormente la deseabilidad global experimental (Tabla 4.10). Tal como se puede observar la deseabilidad global experimental (0,853) resultó muy próxima a la deseabilidad global estimada por la función ajustada (0,879). Además, en la Tabla 4.10 se muestran los valores estimados y los intervalos de confianza del 95 % para el rendimiento de secado bajo las condiciones óptimas y la productividad de PHB empleando la vinaza secada bajo esas condiciones. Los resultados obtenidos

demuestran la validez del modelo y la utilidad de estas herramientas estadísticas para la optimización del proceso de secado de vinaza.

**Tabla 4.10:** Valores experimentales óptimos y predichos del proceso de secado

	Valor Experimental	Valor Predicho	Intervalo de confianza
Rendimiento (%)	87,0 ± 2,8	87,5	79,7-95,5
Productividad (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,0227± 0,0020	0,0232	0,0186-0,0278
Deseabilidad global experimental	0,853 ± 0,080		

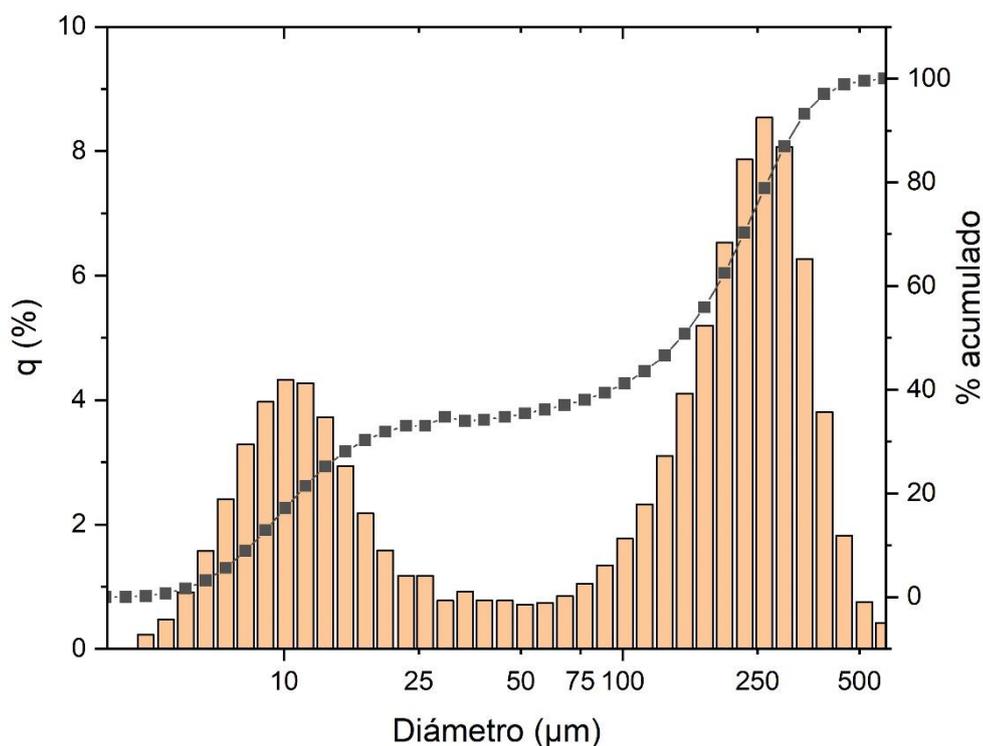
#### 4.3.3 Caracterización de las muestras de vinaza seca

Se realizaron ensayos de caracterización de la vinaza seca obtenida empleando las condiciones óptimas descritas en la Tabla 4.9.

##### 4.3.3.1 Tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partículas de las muestras de vinaza seca reveló una naturaleza bimodal, caracterizada por la presencia de dos poblaciones distintas. Estas poblaciones se describen mediante distribuciones log-normales separadas. El primer grupo, denominado "partículas pequeñas", exhibe un rango de tamaño que varía entre 3,9 y 12,5 µm con un tamaño de partícula medio de 11,1 ± 1,2 µm. Por otro lado, el segundo grupo corresponde a las "partículas grandes", cuyo rango de tamaño se sitúa entre 12,5 y 394,2 µm con un tamaño de partícula medio de 164,1 ± 28,4 µm.

Además de identificar las dos poblaciones, se determinaron los valores del diámetro medio y la desviación estándar geométrica para cada grupo. Estos parámetros proporcionan una medida cuantitativa de la tendencia central y la dispersión de los tamaños de partículas en cada distribución



**Figura 4.6:** Distribución de tamaño de partícula en la muestra de vinaza seca.

#### 4.3.3.2 Fluidez

El polvo exhibió una fluidez pobre, ya que sus valores de índice de Carr se sitúan alrededor de 26 %. En situaciones que requieran un polvo con una buena fluidez, se deberá realizar un acondicionamiento previo antes de su uso.

## 4.4 Conclusiones

Se estudió y demostró la factibilidad de obtener muestras de vinaza seca mediante un proceso de secado por aspersión, obteniendo rendimientos entre 42,2 y 87,5 %. Las muestras de vinaza seca se emplearon como sustrato para realizar fermentaciones con *B. megaterium* para obtener PHB, alcanzando valores de productividad entre 0,0052 y 0,0285 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Mediante un diseño experimental se logró optimizar el proceso de secado de manera tal de maximizar simultáneamente el rendimiento del mismo y la productividad de PHB a partir de vinaza seca. A partir de la maximización de la función deseabilidad global, se encontraron las condiciones óptimas de secado que permitieron alcanzar un rendimiento del proceso del 87 % y una productividad de PHB de  $0,0227 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Dichos valores experimentales resultaron similares a los estimados por las superficies de respuestas validando el modelo estadístico.

Cabe destacar que, la productividad de PHB obtenida empleando vinaza seca ( $0,0227 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) como sustrato resultó el doble que la obtenida a partir de vinaza líquida ( $0,0105 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Esta diferencia podría atribuirse a la presencia de maltodextrina en la vinaza seca que constituye una fuente de carbono más accesible a los microorganismos, favoreciendo la producción del biopolímero.

#### 4.5 Referencias

- Bhyari BR, Datta N, Howes T (1997) *Drying Technology : An International Journal Problems Associated With Spray Drying of Sugar-Rice Foods.* 15: 37–41. <https://doi.org/10.1080/07373939708917253>
- Braga V, Guidi LR, de Santana RC, Zotarelli MF (2020) *Production y characterization of pineapple-mint juice by spray drying. Powder Technol* 375:409–419. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.08.012>
- Di Battista CA, Constenla D, Ramírez-Rigo MV, Piña J (2015) *The use of Arabic gum, maltodextrin y surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. Powder Technology* 286:193-201. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>
- Fang Z, Bhyari B (2012) *Comparing the efficiency of protein y maltodextrin on spray drying of bayberry juice. Food Res Int* 48:478–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.025>

#### Capítulo 4: Optimización del proceso de secado de vinaza

- Fukushima NA, Palacios-Bereche MC, Palacios-Bereche R, Nebra SA (2019) Energy analysis of the ethanol industry considering vinasse concentration y incineration. *Renew Energy* 142:96–109. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.085>
- Garnero C, Aloisio C, Longhi M (2013) Ibuprofen-Maltodextrin Interaction: Study of Enantiomeric Recognition y Complex Characterization. *Pharmacology & Pharmacy* 4:18–30. <https://doi.org/10.4236/pp.2013.41003>
- Kaur P, Singh SK, Garg V, Gulati M, Vaidya Y (2015) Optimization of spray drying process for formulation of solid dispersion containing polypeptide-k powder through quality by design approach. *Powder Technology* 284:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.06.034>
- Koç GÇ, Dirim SN (2018) Spray dried spinach juice: powder properties. *J Food Meas Charact* 12:1654–1668. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9781-9>
- Kuhn M (2016) The desirability Package. 1–17
- Li Y, Helmreich B, Horn H (2011) Biosorption of Cu(II) Ions from Aqueous Solution by Red Alga (*Palmaria palmata*) y Beer Draff. *Mater Sci Appl* 2:70–80. <https://doi.org/10.4236/msa.2011.22010>
- Molla-Alizadeh-Zavardehi S, Sadi Nezhad S, Tavakkoli-Moghaddam R, Yazdani M (2013) Solving a fuzzy fixed charge solid transportation problem by metaheuristics. *Math Comput Model* 57:1543–1558. <https://doi.org/10.1016/j.mcm.2012.12.031>
- Phisut N (2012) Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. *Int Food Res J* 19:1297–1306.
- Porras MA (2016) Producción de poli(hidroxialcanoato)s (PHA)s a partir de fuentes renovables de bajo costo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur
- Raissi S, Farsani R-E (2009) Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology. *Engineering y Technology* 51: 267-271.
- Ramadas N V., Singh SK, Soccol CR, Pyey A (2009) Polyhydroxybutyrate production using agro-

#### Capítulo 4: Optimización del proceso de secado de vinaza

industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. Brazilian Arch Biol Technol 52:17–23. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100003>

Xiao Z, Xia J, Zhao Q, Niu Y, Zhao D (2022) Maltodextrin as wall material for microcapsules: A review. Carbohydr Polym 298:120113. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120113>

Zhang L, Zeng X, Fu N, Tang X, Sun Y (2018) Maltodextrin: A consummate carrier for spray drying of xylooligosaccharides. Food Res Int 18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.004>

## Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

---

### 5.1 Introducción

Los PHAs son polímeros semicristalinos que exhiben una amplia variedad de propiedades mecánicas dependiendo de su composición y tipo de monómeros constituyentes (Costa *et al.* 2018). Como se mencionó en el Capítulo 1, los PHAs se pueden clasificar en diferentes tipos según la longitud de la cadena de carbono: PHAs de cadena corta (scl-PHA), PHAs de cadena media (mcl-PHA) y PHAs de cadena larga (lcl-PHA). La longitud de la unidad de monómero influye en las propiedades del polímero. En el caso de los scl-PHA, compuestos por monómeros de 3-5 carbonos, son termoplásticos con un alto grado de cristalinidad en el rango de 60 a 80 % (Anjum *et al.* 2016), rígidos y quebradizos, y se utilizan mayoritariamente para la producción de artículos desechables y envases para alimentos (Nigmatullin *et al.* 2015). Por otro lado, los mcl-PHA, constituidos por unidades monoméricas de 6-14 carbonos, son elastómeros cristalinos, flexibles y elásticos, tienen bajo grado de cristalinidad (20-25 %), baja resistencia a la tracción y alta elongación a la rotura (Grigore *et al.* 2019). Además, tienen una temperatura de transición vítrea baja y menor masa molecular en comparación con los scl-PHA. Finalmente, los biopolíesteres que contienen monómeros de 15 o más carbonos se denominan lcl-PHA (Riaz *et al.* 2021). Un PHA será un polímero de cadena corta o media según la enzima responsable de la síntesis (sintasa) ya que la misma es específica del sustrato y puede actuar sobre monómeros con diferente número de átomos de carbono. Por lo tanto, la composición química de los PHAs

dependerá del sustrato, la enzima PHA-sintasa y la ruta metabólica involucrada (Lemos Delgado y Mina Cordoba 2015). En este sentido, *B. megaterium* posee enzimas sintasas de Clase IV, capaces de polimerizar principalmente unidades monoméricas de cadena corta. Se ha reportado que *B. megaterium* produce P(3HB) a partir de azúcares y P(3HB-co-3HV) a partir de precursores de 3HV como propionato y valerato (Chen *et al.* 2010, Park *et al.* 1997). A pesar de la adición de un precursor de 4-hidroxibutirato (4HB), no se observó la incorporación de 4HB en el polihidroxialcanoato (PHA) producido por la cepa de *B. megaterium* (Tay *et al.* 2010). Existen pocos reportes de *B. megaterium* DSM509, produciendo PHAs de longitud de cadena media o larga (Shahid *et al.* 2013, Zribi-Maaloul *et al.* 2013).

Las propiedades térmicas de los PHAs pueden ser caracterizadas en términos de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) para la fase amorfa y la temperatura de fusión ( $T_f$ ) para la fase cristalina. De acuerdo con Grigore *et al.* (2019), el aumento de la longitud de la cadena lateral de 1 a 7 carbonos reduce la  $T_g$ , mientras que un cambio de 4 a 7 carbonos aumenta la  $T_f$  de 45 a 69 °C. La adición de otros ácidos hidroxialcanoicos (HA) puede modificar la  $T_f$ , como se observa en el copolímero PHBV, donde el aumento del contenido de 3HV disminuye la  $T_f$  sin afectar significativamente la degradación térmica (Melendez-Rodriguez *et al.* 2021). En consecuencia, se puede ajustar el contenido de 3HV durante la fermentación para controlar las propiedades térmicas y lograr una mayor ventana de procesamiento térmico sin degradación. La Tabla 5.1 presenta valores de propiedades mecánicas y térmicas de diversos PHAs.

**Tabla 5.1:** Propiedades térmicas y mecánicas del PHB y otros PHAs (Anjum *et al.* 2016)

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de transición vítrea (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a la rotura (%)
P(3HB)	173-180	5-9	3,5-4	40	3-8
P(3HB-co-3HV) (3 mol% 3HV)	170	nr	2,9	38	nr
P(3HB-co-3HV) (9 mol% 3HV)	162	nr	1,9	37	nr
P(3HB-co-3HV) (14 mol% 3HV)	150	nr	1,5	35	nr
P(3HB-co-3HV) (20 mol% HV)	145	-1	1,2	32	nr
P(3HB-co-3HV) (25 mol% 3HV)	137	nr	0,7	30	nr
P(4HB)	53	-50	149	104	1000
P(3HB-co-4HB) (3 mol% 4HB)	166	nr	nr	28	45
P(3HB-co-4HB) (10 mol% 4HB)	159	nr	nr	24	242
P(3HB-co-4HB) (16 mol% 4HB)	130	-7	nr	26	444
P(3HB-co-4HB) (64 mol% 4HB)	50	-35	30	17	591
P(3HB-co-4HB) (90 mol% 4HB)	50	-42	100	65	1080
P(3HB-co-3HA) (6 mol% 3HA)	133	-8	0,2	17	680
P(3HB-co-HP) (67 mol% HP)	44	-19	nr	nr	nr
P(3HB-co-3HHx)	52	-4	nr	20	850

nr: no reportado

Las propiedades finales de los PHAs se pueden controlar durante la fermentación empleando diferentes sustratos y en diferentes proporciones. Las propiedades del PHA

obtenido dependen de fuente de carbono empleada, las rutas metabólicas que utilizan las bacterias para convertir los precursores y la especificidad del sustrato enzimático involucrado; además, también debe tenerse en cuenta los métodos de recuperación y purificación, entre otros. El tiempo de fermentación también afecta las propiedades de los PHAs, por ejemplo, en la fase estacionaria tardía del cultivo, la degradación de los PHAs intracelulares causada por las PHA-despolimerasas endógenas puede disminuir drásticamente el peso molecular del polímero (Volova *et al.* 2021). Además, otros factores no relacionados con la biosíntesis, como la técnica utilizada para extraer el polímero de la biomasa celular, el tipo de agente de extracción utilizado y el método de purificación, pueden modificar las propiedades del biopolímero sintetizado.

El PHB es el miembro más estudiado entre los PHAs. Sus propiedades mecánicas, como el módulo de Young y la resistencia a la tracción, son muy similares al poli(propileno), aunque el alargamiento a la rotura es menor que el de otros polímeros sintéticos (Byun y Kim 2013). La principal desventaja del PHB es el alto grado de cristalinidad que da como resultado un material frágil. La incorporación de otros HA, como hidroxivalerato (HV), hidroxihexanoato (HHx), 3-hidroxipropionato y 4-hidroxibutirato, para formar copolímeros puede reducir su fragilidad, volverlo menos cristalino y más flexible (Domínguez-Díaz *et al.* 2015).

En el presente capítulo, se realizó el seguimiento del proceso de fermentación optimizado en el Capítulo 2 empleando como sustratos vinaza líquida y la vinaza seca obtenida en el Capítulo 4. En tal sentido, se determinó la concentración de biomasa, la acumulación del biopolímero, el consumo de glucosa y la variación de pH a lo largo del proceso fermentativo a escala Erlenmeyer y mini-biorreactor. Los PHAs fueron extraídos

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

y caracterizados estructuralmente mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y se determinaron sus propiedades térmicas a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Fermentaciones para la producción de PHAs

#### 5.2.1.1 Fermentaciones en Erlenmeyers (shake flasks)

Se llevaron a cabo fermentaciones en Erlenmeyers siguiendo las condiciones óptimas de fermentación obtenidas en el Capítulo 2. Se prepararon dos medios de cultivo: uno utilizando vinaza líquida y otro utilizando vinaza seca. Las fermentaciones se realizaron en Erlenmeyers de 250 mL, que contenían 100 mL de medio de cultivo, a una temperatura de 30 °C durante 24 horas, con una velocidad de agitación de 200 rpm en un agitador orbital.

El medio de cultivo utilizado consistió en los siguientes componentes: 2,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 0,5 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05 g.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,9 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 0,17 g.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. La cantidad de vinaza agregada al medio de cultivo varió según el valor de COT (Carbono Orgánico Total) para mantener una concentración de carbono (C) de 4 g.L<sup>-1</sup>. Además, el pH del medio se ajustó a 7,0 mediante el uso de NaOH 2,5 M. Es importante destacar que, la vinaza seca utilizada fue aquella obtenida mediante las condiciones de secado que condujeron a una deseabilidad global óptima.

#### 5.2.1.2 Fermentaciones en mini-biorreactor

Se empleó un mini-biorreactor con una capacidad de 150 mL (Figura 5.1), perteneciente a los Laboratorios de Sistemas Organizados y Desarrollos Analíticos (SIODA) del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur. Este dispositivo cuenta con un sistema de control de temperatura y agitación, el cual se lleva

a cabo mediante el uso de impulsores que rotan alrededor de un eje central en el interior del biorreactor. El vaso del biorreactor fue esterilizado durante 15 min a 121 °C. La temperatura de operación fue mantenida a 30 °C durante la fermentación. Una vez que se alcanzó la temperatura de operación, el inóculo que contiene las células fue introducido asépticamente en el biorreactor. En todos los casos, este inóculo representó el 10 % del volumen de trabajo del biorreactor.



**Figura 5.1:** Mini-biorreactor usado en esta tesis.

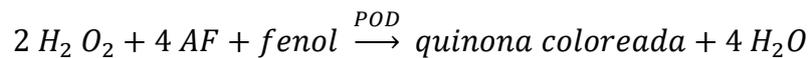
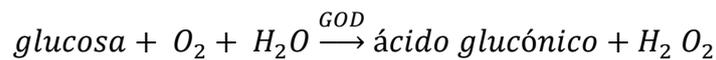
### 5.2.2 Métodos analíticos empleados para el seguimiento de las fermentaciones

Durante las fermentaciones llevadas a cabo en Erlenmeyers y mini-biorreactor se tomaron alícuotas del medio de cultivo a diferentes tiempos con fin de determinar la concentración de biomasa celular, el PHB acumulado, el consumo de glucosa y la variación de pH. La determinación de la concentración de biomasa celular, la cuantificación del PHB acumulado y la variación de pH se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 2.

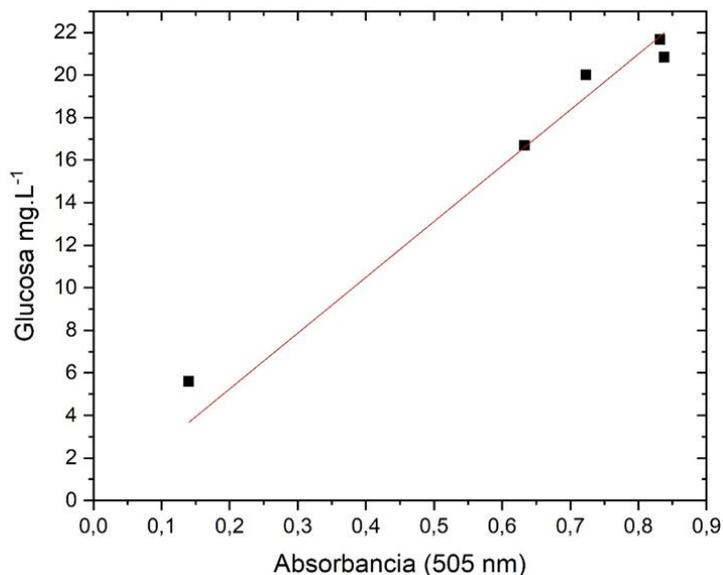
La cuantificación de glucosa remanente en el medio de cultivo se realizó con el método enzimático-colorimétrico de la glucosa oxidasa/peroxidasa, empleando un kit

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

enzimático (Wiener, Argentina) para la determinación de glucosa en suero o plasma en medio acuoso. En primer lugar, se combinan ambos reactivos del kit enzimático y se adiciona 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla resultante con 2  $\mu\text{L}$  de la muestra que se quiere cuantificar. A continuación, la solución obtenida se homogenizó e incubó durante 10 min en un baño de agua a 37 °C. Finalmente, se retiró la muestra del baño y se realizó una medida de la absorbancia en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 505 nm. La técnica se fundamenta en el uso de dos reacciones acopladas catalizadas por las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa que convierten la glucosa en quinoneimina (García *et al.* 2017), compuesto que absorbe a 505 nm.



Para la construcción de la curva de calibración de la glucosa en el medio de cultivo relativo a un estándar, se aplicó la misma metodología descrita previamente. Como muestra estándar, se utilizó glucosa con una concentración de 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a la que se le realizaron diluciones sucesivas y luego se la hizo reaccionar con los reactivos del kit enzimático. La curva de calibrado para la glucosa se muestra en la Figura 5.2.



**Figura 5.2:** Curva de calibración para el cálculo de la concentración de glucosa. Glucosa

$$(\text{mg.L}^{-1}) = 26,22 \times \text{Absorbancia. } R^2=0,99$$

### 5.2.3 Extracción del biopolímero

Las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min y posteriormente se liofilizaron (Rificor, L-A-B3-C). Las células liofilizadas fueron colocadas directamente en un equipo Soxhlet usando cloroformo como solvente y extraídas durante 48 h. El rendimiento (R) se calculó mediante la ecuación 5.1:

$$R (\%) = \frac{\text{Biopolímero}_{\text{extraído}}}{\text{Peso células secas}} \times 100 \quad [5.1]$$

donde  $\text{Biopolímero}_{\text{extraído}}$  corresponde al biopolímero obtenido tras la extracción con el disolvente y  $\text{Peso células secas}$  es la cantidad de células liofilizadas utilizadas, ambos expresados en  $\text{g.L}^{-1}$ .

### 5.2.4 Caracterización estructural y térmica

Para la caracterización estructural y térmica de los PHAs se emplearon los biopolímeros extraídos. Por otra parte, los resultados obtenidos fueron comparados con los de un PHB comercial (Biomer, Alemania).

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

#### 5.2.4.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR se realizó utilizando un espectrofotómetro Thermo Nicolet Nexus (USA), empleando una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , realizando 100 escaneos en el rango de  $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  en el modo transmitancia. Las muestras se mezclaron con KBr (Sigma-Aldrich, 99 % de pureza) al 1 % p/p y se prensaron para obtener discos transparentes.

#### 5.2.4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas se evaluaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro Perkin-Elmer en atmósfera de nitrógeno. La muestra ( $\sim 8\text{ mg}$ ) fue calentada de  $25$  a  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , seguido de un enfriamiento posterior a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  y, finalmente, un segundo calentamiento hasta  $200\text{ }^\circ\text{C}$ . Todas las rampas térmicas se realizaron a una velocidad de  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . La temperatura de fusión ( $T_F$ ) y la entalpía de fusión ( $\Delta H_F$ ) se obtuvieron a partir de los termogramas correspondientes a la segunda etapa de calentamiento. El grado de cristalinidad ( $X_c$ ) se estimó mediante la ecuación 5.2:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_F}{\Delta H_F^0} 100 \quad [5.2]$$

donde  $\Delta H_F$  es la entalpía de fusión de la muestra expresada en  $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $\Delta H_F^0$  es la entalpía de fusión de una muestra 100 % cristalina de PHB con un valor de  $146\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$  (Bluhm et al. 1986).

#### 5.2.4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

La degradación térmica se estudió utilizando una balanza termogravimétrica Discovery TA Instruments. Las muestras ( $\sim 8\text{ mg}$ ) se calentaron de  $25$  a  $700\text{ }^\circ\text{C}$ , en atmósfera de nitrógeno, a  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se obtuvieron curvas masa-temperatura y se

calculó la primera derivada. El pico de la primera derivada indica la temperatura máxima de degradación térmica ( $T_d$ ), punto de máxima tasa de cambio en la curva de masa.

## 5.3 Resultados y discusión

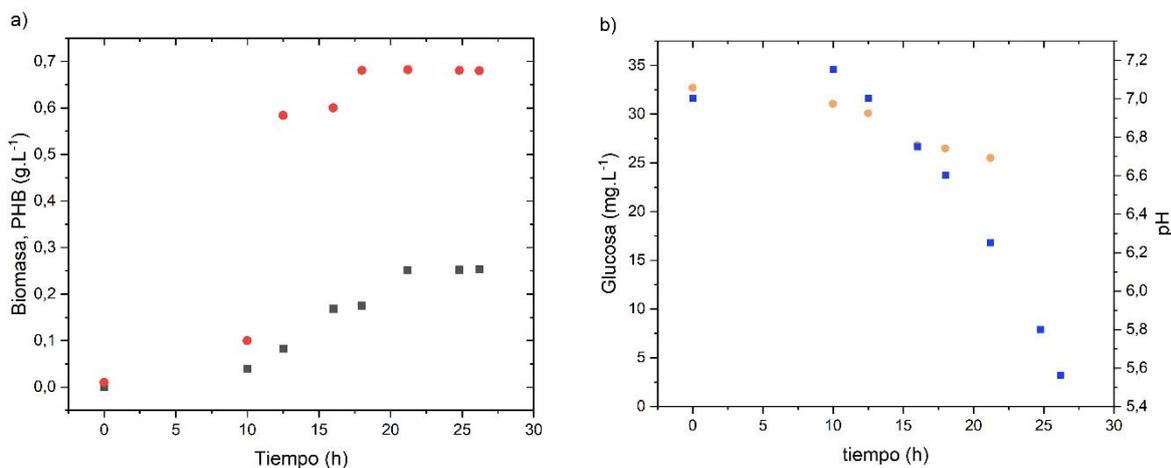
### 5.3.1 Seguimiento de las fermentaciones para la producción de PHAs

#### 5.3.1.1 Fermentaciones en Erlenmeyers utilizando vinaza líquida como sustrato

En la Figura 5.3 se muestran los gráficos correspondientes a la concentración de biomasa, el PHB acumulado, la concentración de glucosa y la variación de pH durante el proceso de fermentación en Erlenmeyer empleando vinaza líquida como sustrato. Se puede observar la tendencia sigmoideal tanto de la concentración de biomasa como del PHB acumulado en función del tiempo (Figura 5.3a). Teniendo en cuenta la concentración de PHB y de biomasa a las 24 horas de fermentación, se alcanzó una acumulación del biopolímero del 37 %. Se encontraron valores similares en la literatura utilizando vinaza como sustrato. En este sentido, Pramanik *et al.* (2012), empleando como cepa *Haloarcula marismortui*, obtuvieron una acumulación de PHA del 23 %, mientras que Zanfonato *et al.* (2018) reportaron una acumulación máxima de PHA del 26 % utilizando *C. necator*. Dentro del género *Bacillus*, Valappil *et al.* (2008) informaron un valor del 31 % al utilizar glucosa como sustrato y *B. cereus* como microorganismo, similar al obtenido en este trabajo. Por otro lado, Ramos (2019) informó una acumulación del 37 % utilizando glicerol y *B. megaterium*, en fermentaciones realizadas en Erlenmeyers. La productividad alcanzada fue de  $0,0102 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

En la Figura 5.3b se observa la disminución de la concentración de glucosa a lo largo de la fermentación conforme aumenta la producción de PHB por *Bacillus*. Se observa una disminución marcada del pH del medio de cultivo la cual puede ser atribuida

a la producción de ácido láctico, ácido tartárico y ácido acético de *B. megaterium* debido a la utilización de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fuente de fósforo (Zhong 2017).



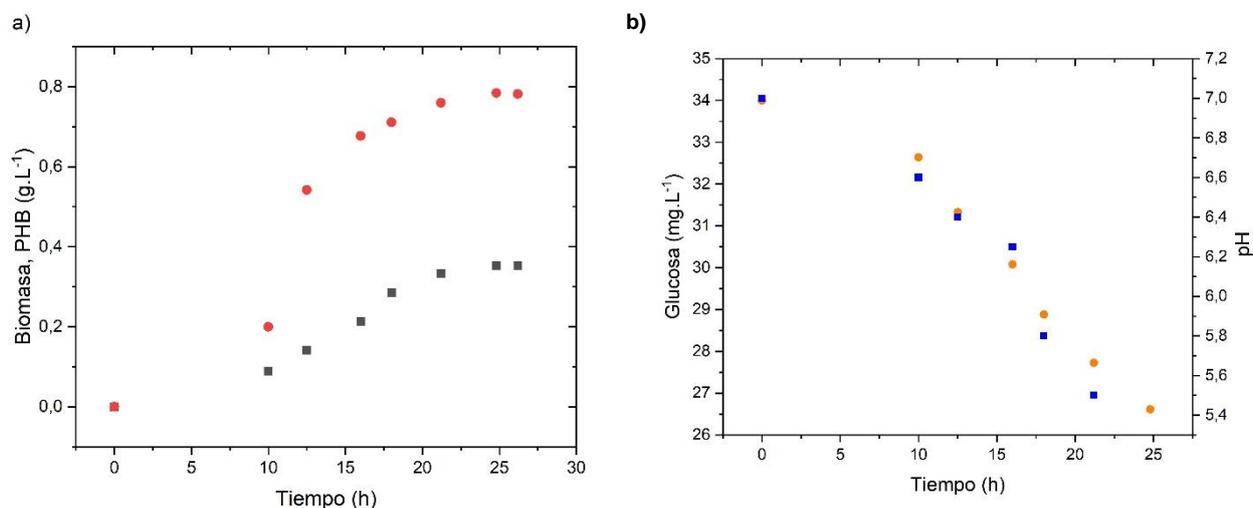
**Figura 5.3:** Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en Erlenmeyers empleando vinaza líquida y *B. megaterium*.

Símbolos: a) (●) biomasa y (■) PHB y b) (●) glucosa y (■) pH.

#### 5.3.1.2 Fermentaciones en mini-biorreactor utilizando vinaza líquida como sustrato

En la Figura 5.4 se muestran los gráficos correspondientes a la concentración de biomasa, el PHB acumulado, la concentración de glucosa y la variación de pH durante el proceso de fermentación en mini-biorreactor empleando vinaza líquida como sustrato. La tendencia observada para las cuatro curvas en función del tiempo de fermentación es similar a la obtenida para las fermentaciones en Erlenmeyers. Sin embargo, se registró un mayor porcentaje de acumulación de PHB (45 %) y un aumento en la biomasa en comparación con las fermentaciones realizadas en Erlenmeyers, alcanzando un valor de  $0,784 \text{ g.L}^{-1}$  en contraste con los  $0,681 \text{ g.L}^{-1}$  obtenidos anteriormente. Este incremento en la biomasa podría atribuirse a la mayor disponibilidad de sustratos en el medio de cultivo. Es importante destacar que la principal distinción de este equipo es que está equipado con paletas, lo que posibilita una homogeneización más efectiva del medio de

cultivo. La productividad también se incrementó, alcanzando un valor de  $0,0147 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 5.4:** Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en mini-biorreactor empleando vinaza líquida y *B. megaterium*.

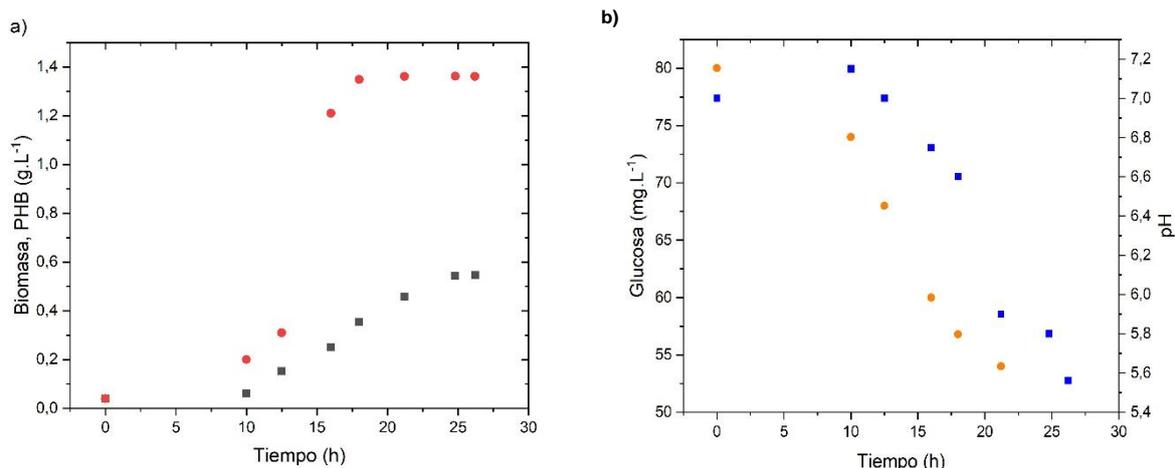
Símbolos: a) (●) biomasa y (■) PHB y b) (●) glucosa y (■) pH.

Aunque el porcentaje de acumulación aumentó, se han reportado valores de acumulación superiores empleando cepas de *Bacillus*. Por ejemplo, Mohanrasu *et al.* (2020) reportaron una acumulación del 54,6 % utilizando glucosa y *B. megaterium*. Además, se han registrado valores de acumulación más elevados utilizando la cepa empleada en esta investigación, como el 59 % utilizando glucosa como fuente de carbono (López *et al.* 2012) y el 68 % utilizando glicerol como fuente de carbono (Ramos 2019). Es relevante mencionar que, estas fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores que permitieron el control de variables críticas como el pH, el oxígeno disuelto, la temperatura y la agitación.

### 5.3.1.3 Fermentaciones en Erlenmeyers utilizando vinaza seca como sustrato

En la Figura 5.5 se muestran los gráficos correspondientes a la concentración de biomasa, el PHB acumulado, la concentración de glucosa y la variación de pH durante el proceso de fermentación en Erlenmeyer empleando vinaza seca como sustrato. Si bien la tendencia de las curvas resultó similar a las de fermentaciones con vinaza líquida, se observaron diferencias significativas en los valores registrados. El incremento en la concentración de biomasa comparado con las fermentaciones en Erlenmeyer utilizando vinaza líquida como sustrato, podría atribuirse a la presencia de maltodextrina que resulta una fuente de carbono más accesible para los microorganismos (Figura 5.5a). Sin embargo, el porcentaje de acumulación de PHB resultó ser del 39 %, comparable al obtenido en las fermentaciones realizadas a partir de vinaza líquida en Erlenmeyers (Figura 5.5a). Como se mencionó anteriormente, esta acumulación es similar a la reportada por otros autores en fermentaciones a esta escala (Pramanik *et al.* (2012), Zanfonato *et al.* (2018) y Valappil *et al.* (2008)). La productividad obtenida fue de  $0,0220 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

La concentración inicial de glucosa en el medio fue mayor utilizando vinaza seca como sustrato debido al agregado de maltodextrina durante el secado de la vinaza (Figura 5.5b).



**Figura 5.5:** Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en Erlenmeyers empleando vinaza seca y *B. megaterium*.

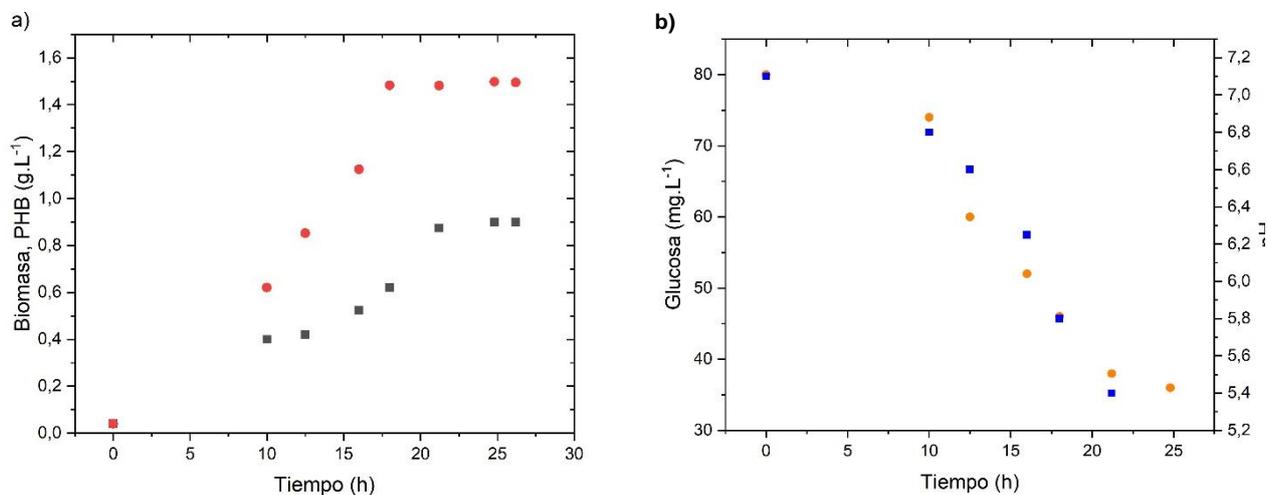
Símbolos: a) (●) biomasa y (■) PHB y b) (●) glucosa y (■) pH.

#### 5.3.1.4 Fermentaciones en mini-biorreactor utilizando vinaza seca como sustrato

En la Figura 5.6 se muestran los gráficos correspondientes a la concentración de biomasa, el PHB acumulado, la concentración de glucosa y la variación de pH durante el proceso de fermentación en mini-biorreactor empleando vinaza seca como sustrato. Es importante destacar que la principal distinción de este equipo es que está equipado con paletas, lo que posibilita una homogeneización más efectiva del medio de cultivo.

Se registró un porcentaje de acumulación de PHB del 48 % y se observó un aumento en la concentración de biomasa en comparación con las fermentaciones realizadas en Erlenmeyer, alcanzando un valor de 1,495 g.L<sup>-1</sup>. La productividad también se incrementó, alcanzando un valor de 0,0230 g.L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Estos valores son más altos que los alcanzados con vinaza líquida, debido principalmente a la maltodextrina que se agrega durante el proceso de secado. Estos resultados demuestran la necesidad de complementar el cultivo con una fuente de carbono adicional debido a que las vinazas

por sí solas no proporcionarían una fuente de carbono suficiente para lograr buenas cantidades de biomasa y producción de PHAs.

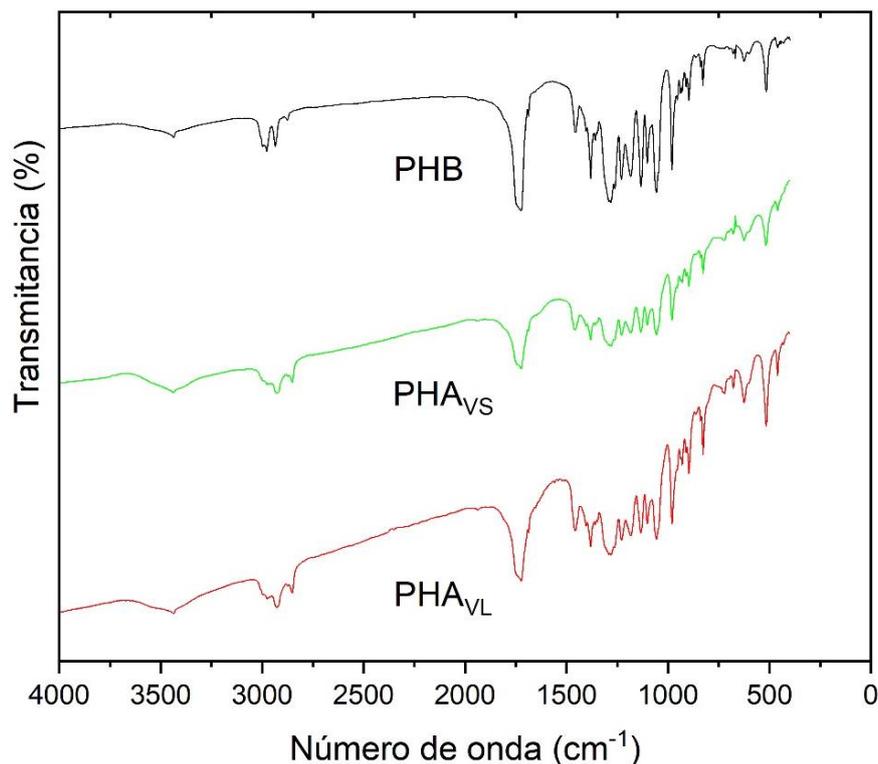


**Figura 5.6:** Evolución de las variables de la fermentación con el tiempo para cultivo en mini-biorreactor empleando vinaza seca y *B. megaterium*.

Símbolos: a) (●) biomasa y (■) PHB y b) (●) glucosa y (■) pH.

### 5.3.2 Caracterización estructural y térmica

Se utilizó la técnica de FTIR para caracterizar molecularmente los PHAs obtenidos a partir de *B. megaterium* empleando vinaza líquida (PHA<sub>VL</sub>) y vinaza seca (PHA<sub>VS</sub>) como sustrato. En la Figura 5.7 se presentan los espectros correspondientes a las muestras obtenidas en este trabajo como así también el de un PHB comercial a modo de comparación. Los espectros FTIR de todas las muestras fueron prácticamente idénticos. Es importante destacar que la técnica de espectroscopia infrarroja no permite identificar diferentes monómeros debido a la similitud de los grupos químicos que los componen (Bayari y Severcan 2005). Por lo tanto, en este estudio, se utilizó esta técnica de caracterización para confirmar la producción de PHAs a partir de este microorganismo, pero no para identificar la composición química de los mismos.

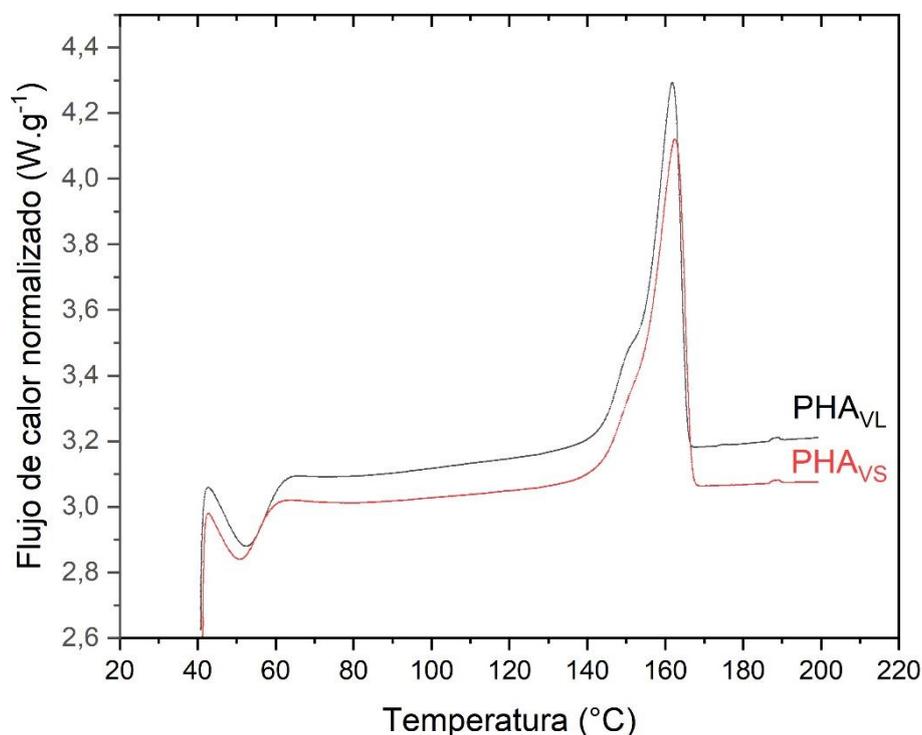


**Figura 5.7:** Espectro FTIR de los PHAs producidos por *B. megaterium* empleando vinaza líquida y sólida.

Se observaron bandas características a 1724 y 1278  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden al grupo carbonilo de la unión éster y al grupo  $-\text{CH}$ , respectivamente. Según Hong et al. (1999), estas dos bandas son completamente características de los PHAs. La banda observada a 1456  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la deformación asimétrica del enlace C–H en los grupos  $\text{CH}_2$ , mientras que la banda a 1380  $\text{cm}^{-1}$  se asigna al movimiento simétrico de los grupos  $\text{CH}_3$ . La banda a 1280  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de conformaciones de cadenas helicoidales, mientras que las bandas a 1186 y 1132  $\text{cm}^{-1}$  son características de las vibraciones asimétrica y simétrica del grupo C–O–C, respectivamente. Las bandas restantes, localizadas entre 1000 y 1300  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a la vibración del enlace C–O del grupo éster presente en los PHAs. Las bandas a 3438  $\text{cm}^{-1}$  se deben a los grupos OH terminales (Bayari y Severcan 2005).

La Figura 5.8 muestra los termogramas correspondiente al segundo calentamiento de las muestras de PHAs obtenidas a partir de *B. megaterium* y vinaza líquida y seca como sustrato. Para ambas muestras, durante el primer calentamiento se detectaron dos picos en la región de fusión: el primero puede atribuirse a la fusión de cristales más irregulares y el segundo a los cristales más ordenados. En el segundo calentamiento se detectó la presencia de un pico asociado a la cristalización a 52,8°C con una entalpía de 11,3 J.g<sup>-1</sup> para el PHA<sub>VL</sub> y a 51,2 °C con una entalpía de 8,5 J.g<sup>-1</sup> para el PHA<sub>VS</sub>. Según Ramos Wellen *et al.* (2015), la cristalización del PHB ocurre parcialmente durante la etapa de enfriamiento (desde el estado fundido) y parcialmente durante la etapa de recalentamiento (como cristalización en frío). Por lo tanto, probablemente el PHB se cristalizó totalmente durante la etapa de calentamiento a 10 °C/min. Las temperaturas de fusión de los PHAs obtenidos se determinaron a partir del máximo del pico endotérmico en el segundo calentamiento. Para el PHA<sub>VL</sub> se observó un único pico de fusión a 161,8 °C, con un pequeño hombro a una temperatura más baja mientras que para el PHA<sub>VS</sub> la T<sub>F</sub> fue de 162,6 °C observándose un hombro menor a temperaturas más

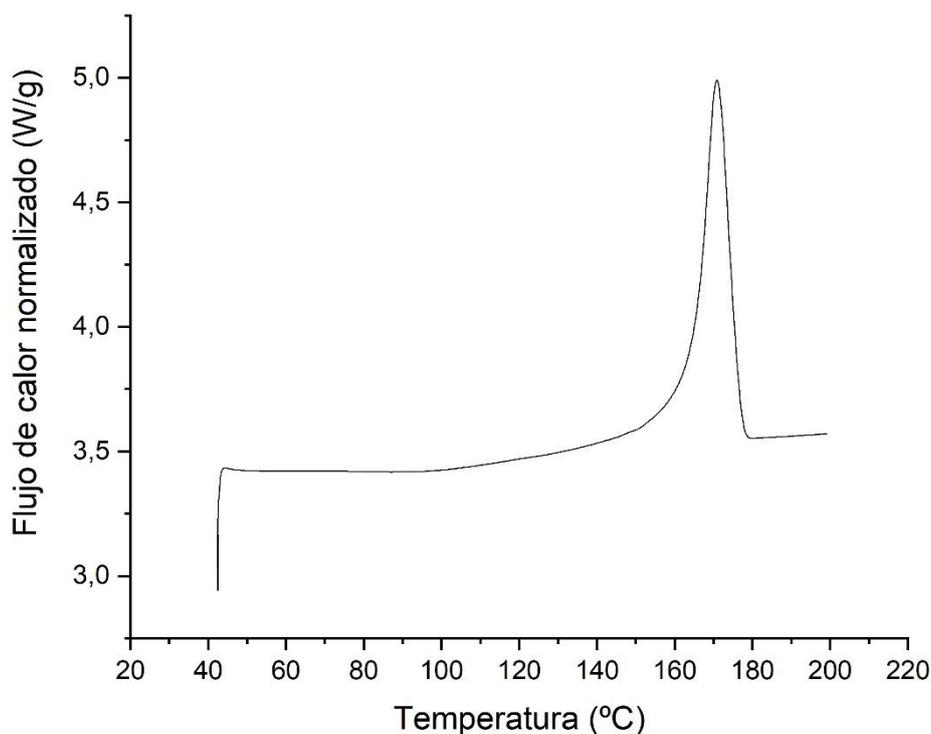
bajas. Los picos de fusión del PHA<sub>VL</sub> y PHA<sub>VS</sub> presentaron una entalpía de 67,1 y 69,1 J.g<sup>-1</sup> y un grado de cristalinidad del 46 y 47,3 % respectivamente.



**Figura 5.8:** Termogramas correspondientes a las muestras de PHAs obtenido a partir de *Bacillus megaterium* y vinaza líquida o seca como sustrato.

En la Figura 5.9 se muestra el termograma correspondiente al segundo calentamiento de la muestra de PHB comercial. En este caso se obtuvo un pico de fusión a 170, 8°C; siendo este valor mayor con respecto a la T<sub>F</sub> de los PHAs obtenidos en este trabajo empleando vinaza líquida y seca (161,8 y 162,6°C). En consecuencia, se puede resaltar la ampliación de la ventana de procesamiento del biopolímero el cual puede ser fundido a menor temperatura (Mannina *et al.* 2019). Por otro lado, el grado de cristalinidad de los polímeros obtenidos resultó menor que el calculado para el PHB comercial (56,1 %). Un menor índice de cristalinidad implica un incremento en la velocidad de degradación ya que las regiones amorfas del polímero pueden ser degradadas más rápidamente que las regiones cristalinas (Ramos 2019).

Adicionalmente, un menor grado de cristalinidad, facilita el uso de estos biopolímeros en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, entre otras (Valappil *et al.* 2008).



**Figura 5.9:** Termograma correspondiente a la muestra de PHB comercial.

En la Tabla 5.2 se reportan los valores de  $T_F$ ,  $\Delta H_F$  y el grado de cristalinidad ( $X_c$ ) de los PHAs obtenidos, junto con el PHB comercial y otros PHAs reportados en la literatura.

**Tabla 5.2:** Propiedades térmicas de los PHAs obtenidos empleando vinaza líquida y seca

Biopolímero	$T_F$ (°C)	$\Delta H_F$ (J/g)	$X_c$ (%)	Referencia
PHA <sub>VL</sub>	161,8	67,1	46	Este trabajo
PHA <sub>VS</sub>	162,6	69,1	47,3	Este trabajo

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

PHB <sub>comercial</sub>	170,8	81,9	56,1	Este trabajo
PHB	170,6	91,8	61,5	(López Jimenez 2011)
PHB	165,2	36,5	50	(Sindhu <i>et al.</i> 2011)
PHB	168,5	n.r	n.r	(Mohanrasu <i>et al.</i> 2020)
PHB	181,7	n.r	48,1	(Baikar y Rane 2017)
PHB	165,1	136,8	n.r	(Soni <i>et al.</i> 2020)
PHB	176	33	23	(Pradhan 2018)
P(3HB-co-3HV)	148,9	70,8	48,5	(Ramos 2019)
	158,5			

---

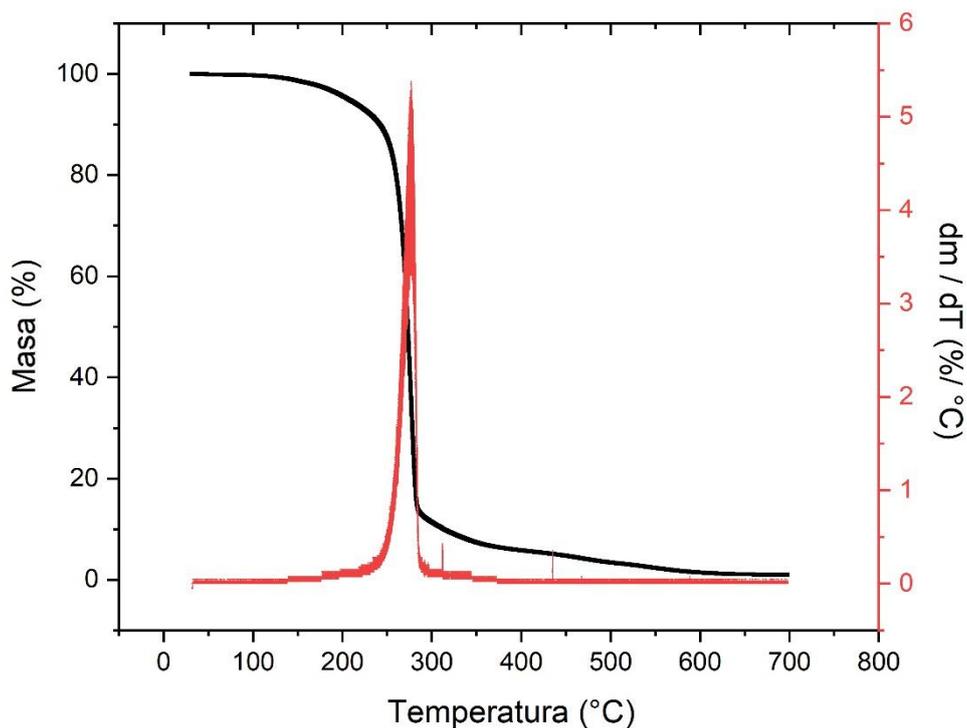
La  $T_F$  de los PHAs obtenidos con vinaza líquida y vinaza seca es unos grados menor que los valores reportados por Nya *et al.* (2022) y Sindhu *et al.* (2011) (165,1 y 165,2 °C, respectivamente) para el PHB obtenido utilizando cepas del género *Bacillus*. Sin embargo, la temperatura de fusión obtenida es un indicio de la producción de un copolímero por parte de *B. megaterium*. Bloebergen *et al.* (1986) demostraron que la  $T_F$  del copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) P(3HB-co-3HV) es proporcional al contenido de 3HV en el mismo (Tabla 5.3). Dichos autores mencionan que la inclusión de unidades de HV dentro de la red cristalina del PHB provoca una disminución en la temperatura de fusión del polímero.

**Tabla 5.3:** Variación de la temperatura de fusión del P(3HB-co-3HV) en función de la composición molar de 3HV (Ramos 2019)

<b>P(3HB-co-3HV)</b> <b>(mol% HV)</b>	<b>T<sub>F</sub></b> <b>(°C)</b>
3	170
9	162
14	150
20	145

En base a los resultados reportados en la literatura y considerando la temperatura de fusión determinada experimentalmente para el biopolímero producido, se puede estimar que el mismo podría tener aproximadamente un 9 % de 3HV, o algún otro monómero de cadena más larga, en su estructura. En este sentido, Anjum *et al.* (2016) reportó una T<sub>F</sub> de 162 °C para un P(3HB-co-3HV) con un 9 % de 3HV.

El análisis termogravimétrico de las muestras de PHAs obtenidas fue llevado a cabo con el objetivo de estudiar la estabilidad térmica de los biopolímeros en función de la temperatura. Las curvas de masa en función de la temperatura se presentan en las Figuras 5.10 y 5.11; la temperatura de degradación (T<sub>d</sub>) de los PHAs obtenidos se obtuvo a partir de la derivada primera de dichas curvas.

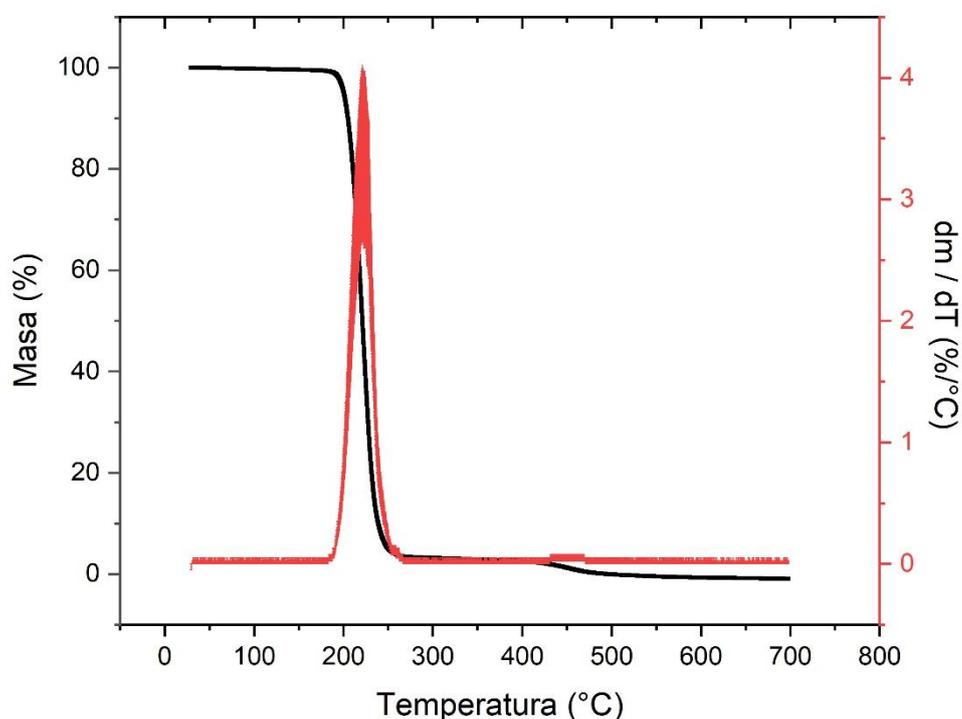


**Figura 5.10:** Termograma correspondiente a la muestra de PHA obtenido a partir de *B. megaterium* empleando vinaza líquida.

El PHA obtenido utilizando vinaza líquida como sustrato exhibió, en atmósfera de nitrógeno, un máximo en la degradación térmica a 277 °C, con una curva caracterizada por una única etapa de pérdida de masa. Este resultado es consistente con los informados por López Jimenez (2011) (281,5 °C) y Sindhu *et al.* (2019), quienes también utilizaron cepas del género *Bacillus*.

Por otro lado, el PHB comercial mostró una  $T_d$  menor, observándose el máximo de la degradación térmica a 221 °C (Figura 5.11). El incremento en la  $T_d$  observado en el PHA sintetizado podría sugerir la presencia de hidroxivalerato o monómeros de cadena más larga en su estructura. En este sentido, investigaciones previas realizadas por Carrasco *et al.* (2006) demostraron que la incorporación de hidroxivalerato en el

copolímero conduce a un material con mayor estabilidad térmica, lo que amplía su ventana de procesamiento. La Tabla 5.4 proporciona los valores de temperatura de degradación de los biopolímeros obtenidos, así como del PHB comercial y los reportados por otros autores. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por diversos investigadores en la literatura para los polímeros estudiados. Cabe destacar que los termogramas corroboraron la ausencia de residuos inorgánicos tanto en las muestras de biopolímero sintetizado como en el comercial.



**Figura 5.11:** Termograma correspondiente a la muestra de PHB comercial

**Tabla 5.4:** Temperatura de degradación de PHB y P(3HB-co-3HV)

Biopolímero	Atmósfera	$T_d$ (°C)	Referencia
PHA <sub>VL</sub>	Nitrógeno	277	Este trabajo
PHB <sub>comercial</sub>	Nitrógeno	221	Este trabajo

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

P(3HB)	Nitrógeno	291	(López Jimenez 2011)
P(3HB)	Nitrógeno	249	(Sindhu <i>et al.</i> 2011)
P(3HB-co-HV)	Nitrógeno	277,8	(Pradhan 2018)
P(3HB-co-HV)	Nitrógeno	284	(Senthil Muthu Kumar <i>et al.</i> 2019)

---

## 5.4 Conclusiones

En este capítulo, se utilizaron diversas técnicas de caracterización de polímeros para identificar la estructura de los PHAs producidos a partir de *Bacillus megaterium* BBST4 empleando vinaza líquida y seca como fuente de carbono. Teniendo en cuenta los valores de temperatura de fusión y grado de cristalinidad de los PHAs obtenidos se puede suponer que *Bacillus megaterium* es capaz de producir P(3HB-co-3HV) con una concentración aproximada de 9 mol% de HV u otros copolímeros conteniendo 3HB y monómeros de cadena más larga. Estos hallazgos son alentadores, ya que además de utilizar subproductos industriales generados en grandes cantidades cada año como la vinaza se podrían obtener copolímeros con mejores propiedades finales que el PHB.

## 5.5 Referencias

- Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S (2016) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) y its copolymers: A review of recent advancements. *Int J Biol Macromol* 89:161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Baikar V, Rane A (2017) Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by *Bacillus megaterium* VB89 Isolated from Nisargruna Biogas Plant. 241–253. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2441-4>
- Bayari S, Severcan F (2005) FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) y P(3HB-co-3HV). *J Mol Struct* 744–747:529–534. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.12.029>

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

Bluhm TL, Hamer GK, Marchessault RH, Robert H, Colin A, Veregin, Richard P (1986) Isodimorphism in Bacterial Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate). *Macromolecules* 19:2871–2876. <https://doi.org/10.1021/ma00165a035>

Byun Y, Kim YT (2013) Bioplastics for Food Packaging: Chemistry y Physics 353-368. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00014-X>

Carrasco F, Dionisi D, Martinelli A, Majone M (2006) Thermal stability of polyhydroxyalkanoates. *J Appl Polym Sci* 100:2111–2121. <https://doi.org/10.1002/app.23586>

Chen HJ, Tsai TK, Pan SC, Lin JS, Tseng CL, Shaw GC (2010) The master transcription factor Spo0A is required for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation y expression of genes involved in PHB biosynthesis in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 304:74–81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01888.x>

Costa SS, Mirya AL, Yrade BB, de Jesus Assis D, Oliveira Souza C, Greque de Morais M, Vieira Costa JA, Izabel Druzian J (2018) Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, y properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *Int J Biol Macromol* 116:552–562. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064>

Domínguez-Díaz M, Meneses-Acosta A, Romo-Uribe A, Espin G (2015) Thermo-mechanical properties, microstructure y biocompatibility in poly- $\beta$ -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP y OPN strains of *Azotobacter vinelyii*. *Eur Polym J* 63:101–112. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.12.002>

García ADP, Hernández AGS, Diaz PAR, Gómez Camargo DE, Gómez Alegría CJ (2017) Determinación colorimétrica de glucosa y consumo de glucosa en cultivos de células adiposas 3T3-L1. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 51:195–202

Grigore ME, Grigorescu RM, Iancu L, Ion RM, Zaharia C, Yrei ER (2019) Methods of synthesis, properties y biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *J Biomater Sci Polym Ed* 30:695–712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

Hong K, Sun S, Tian W, Chen GQ, Huang W (1999) A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:523–526. <https://doi.org/10.1007/s002530051427>

Lemos Delgado AC, Mina Cordoba A (2015) Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Inf Técnico* 79:93–101. <https://doi.org/10.23850/22565035.139>

López JA, Naranjo JM, Higuera JC, Cubitto MA, Cardona CA, Villar MA (2012) Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain : Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. *Biotechnol Bioprocess Eng* 17:250–258. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0448-1>

López Jimenez JA (2011) Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur

Mannina G, Presti D, Montiel-Jarillo G, Suárez ME (2019) Bioplastic recovery from wastewater : a new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresour Technol* 282:361-369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.037>

Melendez-Rodríguez B, Torres-Giner S, Reis MAM, Silva F, Matos M, Cabedo L, Lagarón JM (2021) Blends of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) with Fruit Pulp Biowaste Derived Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate-co-3-Hydroxyhexanoate) for Organic Recycling Food Packaging. *Polymers* 2021, 13(7). <https://doi.org/10.3390/polym13071155>

Mohanrasu K, Rao RGR, Dinesh GH, Zhang K, Prakash GS, Song DP, Muniyasamy S, Pugazhendhi A, Jeyakanthan J, Arun A (2020) Optimization of media components y culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel* 271:117522. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117522>

Nya S, Patra BR, Patel R, Bakos J, Dalai AK (2022) Innovations in applications y prospects of bioplastics y biopolymers: a review. *Environ Chem Lett* 20:379–395. <https://doi.org/10.1007/s10311-021->

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

01334-4

Nigmatullin R, Thomas P, Lukasiwicz B, Puthussery H, Roy I (2015) Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, y their applications in drug delivery. *J Chem Technol Biotechnol* 90:1209–1221. <https://doi.org/10.1002/jctb.4685>

Park SK, Lee KT, YoungBaek K, Rhee YH (1997) Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate y Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Bacillus thuringiensis* R-510. *J Microbiol* 35:127–133.

Pradhan S (2018) Production, ultrasonic extraction, y characterization of poly(3- hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* y *Cupriavidus necator*. *Polymers for Advanced Technologies* 29(8):2392–2400. <https://doi.org/10.1002/pat.4351>

Pramanik A, Mitra A, Arumugam M, Bhattacharyya A, Sadhukhan S, Ray A, Haldar S, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J (2012) Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiol (Praha)* 57:71–79. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0092-3>

Ramos FD (2019) Producción de poli( hidroxialcanoato)s (PHA)S: Estudios experimentales y diseño óptimo de biorrefinerías. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur.

Ramos Wellen MR, Rabello MS, Araujo IC, Macedo Fachine GJ, Canedo EL (2015) Melting y crystallization of poly(3-hydroxybutyrate): effect of heating/cooling rates on phase transformation. *Polímeros* 25:296–304. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1961>

Riaz S, Rhee KY, Park SJ (2021) Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biopolymers for biofuel y biorefineries. *Polymers (Basel)* 13:1–21. <https://doi.org/10.3390/polym13020253>

Senthil Muthu Kumar T, Yorseng K, Rajini N, Yorseng K, Rajulu AV, Siengchin S, Ayrilmis N (2019) Mechanical y thermal properties of spent coffee bean filler/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biocomposites: Effect of recycling. *Process Saf Environ Prot* 124:187–195. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.02.008>

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

- Shahid S, Mosrati R, Ledauphin JÔ, Amiel C, Fontaine P, Gaillard JL, Corroler D (2013) Impact of carbon source y variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. J Biosci Bioeng 116:302–308. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.017>
- Sindhu R, Ammu B, Binod P, Sreelatha K, Deepthi SK, Ramachadran KB, Soccol CR, Pyey A (2011) Production y Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 y Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers. 54:783–794. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400019>
- Sindhu R, Binod P, Pyey A, Ankaram S, Duan Y, Awasthi M (2019) Biofuel Production From Biomass : Toward Sustainable Development. Current Developments in Biotechnology y Bioengineering
- Soni S, Chhokar V, Beniwal V, Kumar R, Badgujjar H, Chauhan R, Dudeja S, Kumar A (2020) Cost effective media optimization for PHB production by *Bacillus badius* MTCC 13004 using the statistical approach. Int J Biol Macromol 233: 123575. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123575
- Tay BY, Lokesh BE, Lee CY, Sudesh K (2010) Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria from the gut of higher termite *Macrotermes carbonarius* (Blattodea: Termitidae). World J Microbiol Biotechnol 26:1015–1024. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0264-3>
- Valappil SP, Rai R, Bucke C, Roy I (2008) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions y an insight into the biosynthetic genes involved. J Appl Microbiol 104:1624–1635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03678.x>
- Volova T, Kiselev E, Nemtsev I, Lukyanenko A, Sukovatyi A, Kuzmin A, Ryltseva G, Shishatskaya E (2021) Properties of degradable polyhydroxyalkanoates with different monomer compositions. Int J Biol Macromol 182:98–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.008>
- Zanfonato K, Schmidt M, Quines LK, Santos Gai C, Schmidell W, Falcão de Aragão GM (2018) Can vinasse be used as carbon source for Poly(3-hidroxybutyrate). Production by *Cupriavidus necator* DSM 545. Brazilian J Chem Eng 35:901–908. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170265>

Capítulo 5: Fermentaciones empleando vinaza líquida y seca. Caracterización de los PHAs obtenidos.

Zribi-Maaloul E, Trabelsi I, Elleuch L, Chouayekh H, Ben Salah R (2013) Purification y characterization of two polyhydroxyalcanoates from *Bacillus cereus*. Int J Biol Macromol 61:82–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.043>

## Capítulo 6: Conclusiones y trabajos futuros

---

Actualmente, los polímeros sintéticos se utilizan de manera masiva debido a sus buenas propiedades finales, su gran versatilidad y su capacidad de procesamiento mediante diferentes técnicas. Sin embargo, presentan ciertas desventajas debido a su origen no renovable, su escasa o nula biodegradabilidad y su acumulación en el medio ambiente. En tal sentido, los biopolímeros se presentan como una alternativa prometedora, ya que son biodegradables y se obtienen de fuentes renovables, ayudando a mitigar el impacto negativo asociado al uso de los polímeros convencionales. Entre los biopolímeros, los poli(hidroxicanoato)s (PHAs) resultan especialmente atractivos, ya que son sintetizados por bacterias y poseen propiedades similares a las de los polímeros sintéticos, con la ventaja adicional de ser biodegradables. No obstante, la producción de PHAs suele ser más costosa que la de los polímeros sintéticos más comunes, principalmente debido al elevado costo de la fuente de carbono que representa más del 50 % del costo total de producción. Por lo tanto, resulta crucial buscar materias primas más económicas para reducir los costos asociados con la producción de PHAs. En este contexto, el objetivo principal de esta tesis fue optimizar la producción de PHAs mediante un proceso de fermentación utilizando vinaza como sustrato, un residuo generado por la industria del bioetanol, y *Bacillus megaterium* como microorganismo productor.

### 6.1 Conclusiones

A continuación, se mencionan las principales contribuciones del trabajo realizado:

En el **Capítulo 2**, se demostró la capacidad de crecimiento de la cepa *B. megaterium* y su producción de PHAs a partir de vinaza como sustrato. Se realizaron experimentos en Erlenmeyers, empleando condiciones de fermentación reportadas en la literatura, alcanzándose una concentración de biomasa de  $0,426 \text{ g.L}^{-1}$  en 24 horas, una acumulación de poli(hidroxibutirato) (PHB) del 16,1 % y una productividad de  $0,0028 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Posteriormente, el capítulo se enfocó en optimizar la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para maximizar la producción de PHB utilizando la cepa *B. megaterium* y vinaza como sustrato. Se implementó un diseño experimental Box-Behnken junto con la metodología de superficie de respuesta para evaluar el impacto de diferentes variables independientes (concentración de carbono, concentración de nitrógeno y concentración de fósforo, relación C/N, temperatura y tiempo) sobre la productividad de PHB. Los resultados de estos estudios mostraron que el uso de esta herramienta estadística permitió optimizar el medio de cultivo y las condiciones de fermentación de manera tal de aumentar la productividad en 3,7 veces ( $0,0105 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), en comparación con los ensayos preliminares. Sin embargo, este valor fue bajo en comparación con los informados para *Bacillus* utilizando fuentes de carbono convencionales debido, principalmente, a la posible presencia de compuestos fitotóxicos en la vinaza que podrían afectar el crecimiento de los microorganismos y la producción del biopolímero.

El objetivo del **Capítulo 3** fue evaluar la viabilidad económica de producir PHAs a partir de vinaza utilizando diferentes microorganismos, empleando una superestructura desarrollada previamente que incluye balances de masa y energía, ecuaciones de diseño y dimensionamiento, así como correlaciones detalladas para el costo de capital de los equipos. La función objetivo para el problema de optimización fue la maximización del

Valor Presente Neto (VPN). El modelo tuvo en cuenta varias productividades y microorganismos reportados en la literatura que utilizan vinaza como sustrato para la producción de PHAs y se realizó una comparación de diferentes escenarios desde el punto de vista técnico-económico y ambiental. El valor positivo de la función objetivo conjuntamente con el cálculo adicional de otros índices de rentabilidad en la evaluación económica, como la Tasa Interna de Retorno, el Retorno sobre la Inversión y el Periodo de Recuperación indicaron que esta propuesta productiva tiene atractivo desde el punto de vista económico. Los resultados de este estudio demostraron la viabilidad tecno-económica de obtener PHAs a partir de vinaza en algunos de los escenarios estudiados. Los valores del VPN se vieron afectados principalmente por dos de las variables estudiadas: la cantidad de biopolímero acumulado por la biomasa y el rendimiento de PHA. Estas variables pueden incrementarse seleccionando una cepa productora de PHAs que acumule grandes cantidades de biopolímero, utilizando un medio de cultivo adecuado. Los resultados también mostraron que es recomendable realizar un pretratamiento de la vinaza para obtener nutrientes más accesibles para los microorganismos, y en caso de utilizar vinaza cruda, mezclarla con otras fuentes de carbono como la melaza de caña de azúcar. Además, se destacó que la presencia de sales inorgánicas en el medio favorece la acumulación de PHAs. Se estimó que el costo de producción del biopolímero se encontraría en el rango 2,26-2,56 USD.kg<sup>-1</sup>, similar a los valores que actualmente se encuentran en el mercado. Por último, el análisis de sensibilidad realizado permitió identificar los potenciales parámetros que deberían tenerse en cuenta para lograr reducir el costo de los PHAs, siendo los más significativos el porcentaje de acumulación del biopolímero por el microorganismo y el precio de venta del PHA.

En el **Capítulo 4** se demostró la factibilidad de obtener muestras de vinaza seca mediante un proceso de secado por aspersion, empleando maltodextrina (MD) como aditivo coadyuvante. Las muestras de vinaza seca se utilizaron como sustrato para realizar fermentaciones con *B. megaterium* y obtener PHAs. A través de un diseño experimental se optimizó el proceso de secado para maximizar tanto el rendimiento del proceso como la productividad de PHA a partir de vinaza seca. Se encontraron las condiciones óptimas de secado (temperatura del aire de secado, caudal de alimentación líquida, caudal de aire de atomización y concentración de maltodextrina) mediante la maximización de la función deseabilidad global, obteniendo un rendimiento del proceso del 87 % y una productividad de PHB de  $0,0227 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Estos valores experimentales resultaron similares a los estimados por las superficies de respuesta, validando el diseño experimental utilizado. Se observó que la productividad de PHB obtenida utilizando vinaza seca como sustrato fue el doble en comparación con el uso de vinaza líquida, lo cual podría atribuirse a la presencia de MD en la vinaza seca, que proporciona una fuente de carbono más accesible para los microorganismos y favorece la producción del biopolímero.

En el **Capítulo 5** se utilizaron técnicas de caracterización molecular y térmica de polímeros con el objetivo de estudiar las propiedades de los PHAs biosintetizados a partir de *B. megaterium* y vinaza líquida y seca como sustratos. Los resultados obtenidos sugieren que el biopolímero obtenido podría ser un copolímero de 3HB con otros comonómeros de cadena más larga como el 3HV, entre otros. En particular, la temperatura de fusión del PHA obtenido es similar a la reportada para el copolímero P(3HB-co-3HV) con una concentración aproximada del 9 mol% 3HV. Estos hallazgos son prometedores, ya que además de utilizar un subproducto industrial generado en

grandes cantidades cada año como la vinaza, este proceso biológico produce polímeros con mejores propiedades finales que el PHB.

## 6.2 Trabajo futuro

Si bien la optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación permitieron aumentar la productividad de PHB utilizando vinaza líquida y seca como sustrato, los valores obtenidos fueron inferiores en comparación con los reportados a partir de fuentes de carbono convencionales como glucosa. Por lo tanto, sería interesante continuar con el desarrollo de nuevas estrategias para optimizar aún más la producción de PHA utilizando vinaza. Algunas alternativas a considerar se enumeran a continuación:

1. *Explorar la combinación de diferentes subproductos y residuos agroindustriales como fuente de carbono.* Sería interesante investigar la incorporación de otros residuos o subproductos de la industria alimentaria o agrícola como posibles fuentes de carbono para mejorar la disponibilidad de nutrientes y facilitar la producción de PHAs a partir de la mezcla. La búsqueda de sustratos alternativos contribuiría a la reducción de residuos y a la producción sostenible de PHAs. El control de las variables de fermentación, como el pH y el oxígeno disuelto, también podría desempeñar un papel importante en el aumento de la productividad.
2. *Estudiar diferentes microorganismos.* Si bien en esta tesis se utilizó la cepa *B. megaterium*, existen otros microorganismos reportados en la literatura que son capaces de sintetizar PHAs. Por consiguiente, sería interesante investigar y comparar diferentes cepas microbianas para determinar cuáles podrían ofrecer una mayor productividad o PHAs con buenas propiedades finales empleando vinaza. De esta

manera, la diversidad microbiana puede abrir nuevas oportunidades para optimizar la producción de PHAs.

3. *Desarrollo de procesos de producción a gran escala.* Resulta fundamental investigar y desarrollar procesos de producción a mayor escala que consideren factores como la escalabilidad del proceso, la selección de equipos y sistemas adecuados, la gestión de la fermentación en grandes volúmenes y la optimización de la eficiencia del proceso. Estos estudios proporcionarían información crucial para llevar la producción de PHAs a nivel industrial, permitiendo su adopción y su uso en diferentes aplicaciones comerciales.
4. *Caracterización y aplicaciones de los PHAs obtenidos.* Sería importante llevar a cabo estudios de caracterización más detallados de los biopolímeros obtenidos. Además de las propiedades moleculares y térmicas, se deberían estudiar sus propiedades mecánicas, su degradación en condiciones específicas y realizar pruebas de biocompatibilidad, entre otras. Una caracterización más completa de los PHAs permitiría comprender mejor sus propiedades y su potencial aplicación en diversas áreas como en la industria de envasado, agricultura, medicina u otras áreas donde los polímeros sintéticos convencionales representan un significativo impacto ambiental.