Machine Translated by Google

applied microbiology

MDPI

Artículo

Producción de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por Bacillus megaterium LVN01 utilizando digestato de biogás

Amanda Lucía Mora Martínez*, María Yepes-Pérez, Karent Alexandra Carrero Contreras y Paola Eliana Zapata Moreno

Grupo de Producción, Estructura y Aplicación de Moléculas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Calle 59A #63–20, Medellín 050003, Colombia; msyepes@unal.edu.co (MY-P.); kacarreroc@unal.edu.co (KACC); pezapata@unal.edu.co (PEZM)
* Correspondencia: almora@unal.edu.co

Resumen: La especie Bacillus megaterium LVN01 nativa de Colombia ha demostrado la capacidad de metabolizar diferentes coproductos o residuos industriales (como jugo de fique, melaza de caña y glicerol residual) y acumular polihidroxibutirato (PHB), dándole potencial en la industria de los bioplásticos. En esta investigación se evaluó el potencial del digestato líquido como fuente de carbono para la producción de polímeros de PHA en procesos de fermentación con esta cepa bacteriana. Favorablemente, se encontró que B. megaterium utiliza los nutrientes de este sustrato residual para multiplicarse de manera apropiada y sintetizar eficientemente poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). Fermentación aeróbica discontinua a escala de banco , bajo las condiciones operativas de esta investigación [volumen: 3 L; temperatura: 30,8 ◦C; agitación: 400 rpm; pH: 7,0 ± 0,2; oxígeno disuelto: 100% de saturación; antiespumante: 10% (v/v)], generó valores máximos de peso seco de células (DCW) (0.56 g célula L-1) a las 60 h, mientras que el rendimiento máximo de PHBV (360 mg PHBV L-1) ocurrió a las 16 h. , lo que es muy favorable para la producción sostenible de bioplásticos degradables. Además, los análisis de GC-MS y RMN confirmaron que el copolímero de PHBV sintetizado por B. megaterium está formado por los monómeros 3-hidroxibutirato (3HB) y 3-hidroxivalerato (3HV). Además, las propiedades térmicas determinadas por TGA (Tonset = 283,1 ◦C; Tendset = 296,98 ◦C; Td = 290,114 ◦C) y DSC (Tm = ◦C 155,7 ◦C; ΔHf = 19,80 J g−1 ; Xcr = 18,17 %) indican que es un biopolímero térmicamente estable y con bajos porcentajes de cristalinidad, aportando flexibilidad que facilita el moldeo, adaptación y aplicación en diversos sectore

Palabras clave: biopolímeros; polihidroxialcanoatos (PHA); polihidroxibutirato (PHB); polihidroxivalerato (PHV); Bacilo megaterio; digestato líquido; biomasa pesquera residual

check for updates

Cita: Martínez, ALM; Yepes-Pérez, M.; Contreras, KAC; Moreno, PEZ Producción de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por Bacillus megaterium LVN01 utilizando digestato de biogás. Aplica. Microbiol. 2024, 4, 1057–1078. https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030072

Editor académico: Nikolaos Kopsahelis

Recibido: 23 de marzo de 2024
Revisado: 19 de mayo de 2024
Aceptado: 21 de mayo de 2024
Publicado: 9 de julio de 2024

Copyright: © 2024 por los autores. Licenciatario MDPI, Basilea, Suiza.

Este artículo es un artículo de acceso abierto. distribuido bajo los términos y condiciones de los Creative Commons Licencia de atribución (CC BY) (https:// creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introducción

El desarrollo industrial ha traído grandes beneficios a la humanidad, pero muchos de sus procesos y productos también han impactado negativamente los ecosistemas naturales, afectando la salud humana y todas las demás formas de vida. Entre los casos más críticos se encuentra la producción y utilización de plásticos convencionales. Estos no sólo agotan los recursos fósiles no renovables sino que también representan una de las principales fuentes de contaminación ambiental debido a su resistencia a la degradación, lo que conduce a la acumulación masiva de estos contaminantes en diversos ecosistemas [1].

Como se ha informado [2], la producción de plásticos aumentó de 1,5 toneladas métricas en 1950 a 250 toneladas métricas en 2010 y a 400,3 toneladas métricas en 2022. La aparición de los plásticos circulares, que supone un segundo uso de los existentes, ha logrado un ligero descenso de la producción mundial, cercano al 10% [2]. Los plásticos representan una gran fracción de los residuos desechados en los ecosistemas terrestres y acuáticos, donde se han encontrado microplásticos e islas de plástico [3,4]. Según informes de 2019, la contaminación plástica generó 1.800 millones de toneladas de emisiones de gases de efecto invernadero, lo que equivale al 3,4% del total de emisiones generadas a nivel mundial [5].

Machine Translated by Google

Ante esta crisis medioambiental, la producción de bioplásticos, o los polímeros verdes del futuro, se consolida como una alternativa para sustituir los petroplásticos [6]. Estos poliésteres se clasifican en tres tipos [1]: ácido poliláctico (PLA), succinato de polibutileno (PBS) y polihidroxialcanoatos (PHA). Estos últimos son los únicos que son sintetizados y catabolizados de forma natural por bacterias, y que son, por tanto, compuestos químicos naturales, lo que confiere mayor valor añadido a su producción industrial , estimándose que en 2023 su mercado global alcanzará el 57,8. Millón de dólares.
Si las regulaciones y políticas gubernamentales continúan reduciendo los plásticos de un solo uso, es posible que para el año 2028, el mercado de PHA tenga un incremento cercano al 50%, representado en 98,5 millones de dólares [7].

Los PHA son metabolitos secundarios de una amplia variedad de bacterias, hongos y algunas plantas, que los producen y acumulan como reserva de energía cuando las condiciones externas dificultan su supervivencia [8]. Estos biopolímeros tienen un potencial significativo para reemplazar los plásticos convencionales derivados de petroquímicos, ya que poseen características fisicoquímicas similares y al mismo tiempo demuestran propiedades superiores en términos de procesabilidad térmica y biocompatibilidad. Esto los hace muy adecuados para la fabricación de dispositivos biomédicos, dentales y electrónicos, así como para su utilización en todos los sectores, incluidos la construcción, la automoción, el embalaje y la agricultura [3,8]. Debido a las propiedades biodegradables y biocompatibles del PHA, sus aplicaciones se extienden a la producción de dispositivos médi
Además, se están desarrollando pruebas para estimular la regeneración de tejidos y la producción de microesferas para la administración de fármacos [9].

Aunque se han utilizado una variedad de microorganismos (más de 300 especies) para obtener una amplia gama de biopolímeros, sólo unas pocas bacterias han sido investigadas exhaustivamente para la fabricación de bioplásticos debido a su mayor eficiencia y tasas de producción.
Estos incluyen Bacillus megaterium, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Pseudomona aeruginosa, P. putida, Halomonas sp., Pseudomona fluorescens, P. oleovorans, R. eutropha y Cupriavidus necator [10].
Particularmente, la bacteria Bacillus megaterium es una excelente máquina biológica para producir PHAs debido a que posee un sistema de expresión robusto y una pared celular deficiente en lipopolisacáridos, lo que facilita la liberación del biopolímero sintetizado intracelularmente por la bacteria [11,12].

Estructuralmente, los PHA se clasifican según la composición de sus monómeros en (a) PHA de cadena corta (SCL), formados por monómeros de 3 a 5 carbonos, como el poli-3 hidroxivalerato [P3HV] y el poli-3- hidroxibutirato [P3HB]; (b) PHA de cadena media (MCL), con monómeros de 6 a 14 carbonos, como el copolímero 3-poli-(3-hidroxibutirato-co-3- hidroxivalerato) conocido como [3 3(HB-co-HV] o [p(3HB-co-3HV] o PHBV; y (c) de cadena mixta (MCM), que combinan los dos anteriores y por tanto están formados por monómeros de entre 3 y 14 carbonos, como es el caso del poli (3HB co- 3HV-co-3HHx). Desde el punto de vista industrial destacan el PHB y el copolímero PHBV [9] La longitud de la cadena de carbono define la naturaleza frágil de aquellos con cadena corta o flexible para ejemplos de cadena media [13] .].

En gran medida, la longitud de la cadena está influenciada por el tipo de sustrato utilizado para inducir la producción de PHA de origen microbiano. Los sustratos con un alto contenido en carbohidratos estimulan principalmente la producción de polímeros SCL PHA (polihidroxialcanoato de cadena corta) , mientras que un alto contenido en ácidos grasos estimula la de MCM PHA. Los SCL PHA más investigados son los formados por P3HB. Para mejorar las propiedades mecánicas del P3HB y ampliar sus aplicaciones, se ha investigado la producción de heteropolímeros como el PHBV, que debido a la presencia del monómero 3HV en su estructura presenta mejores características de flexibilidad, mejorando las propiedades del PHB [9] .

Para inducir la producción de copolímeros en bacterias, se utilizan sustratos de carbono que incluyen mezclas de ácidos grasos volátiles (AGV) puros, o materiales o aguas residuales con alto contenido de AGV . Las bacterias del género Bacillus sintetizan copolímeros de PHBV en cultivos suplementados con una mezcla de AGV a partir de la hidrólisis controlada de cáscaras de guisantes, orujo de manzana, cáscaras de cebolla y cáscaras de papa [14]. Los autores encontraron que Bacillus cereus EGU43, cultivado en hidrolizados de cáscara de guisante, acumulaba el copolímero de PHBV con un contenido de 3HV del 1% p/p.

Machine Translated by Google

El cocultivo de Pseudomona sp. ST2 y Bacillus sp. CS8 en medios de cultivo con ácidos acético y propiónico como fuente de carbono, suplementado con glucosa, produce hasta un 35% de copolímero de PHBV [15]; cuando se usa una mezcla de glucosa y ácido propiónico, las cepas individuales producen más PHA que cuando se usa glucosa como única fuente de carbono. Con Alcaligenes eutrophus NCIMB 11599, cultivado en ácido valérico o ácido propiónico, se obtiene PHBV con mejores rendimientos en el primer caso. Ralstonia eutropha KCTC 2658, cultivada en una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico en una proporción de 1:2:2 [16], puede alcanzar una producción de PHBV del 50% del DCW. Cupriavidus necator, cultivado en efluentes de aguas residuales ricos en ácido acético, propiónico y butírico, sin agregar ningún sustrato exógeno, produce una cantidad sustancial de copolímero PHBV (55% del DCW) [17]. Recientemente, Ferre-Guell y Winterburn [18] obtuvieron altas concentraciones de copolímero de PHBV cultivando Haloferax mediterranei en una mezcla de ácidos butirato y valerato con la adición de tensioactivos (Tween 80) para aumentar la biodisponibilidad del sustrato, con una productividad de 10,2. mg/L·h en fermentación discontinua [18]. Estos enfoques pueden reducir potencialmente los costos de producción de los PHA y ofrecer beneficios ambientales mediante la reutilización de desechos.

Ahora, aunque la capacidad de producción global de PHA de origen biológico se ha ampliado cada año, la producción industrial de PHA se ha visto limitada debido a sus costos de producción (alrededor de 4.000 a 15.000 dólares por tonelada métrica), que superan significativamente los costos de los polímeros. derivados de combustibles fósiles (alrededor de 1.000 a 1.500 dólares por tonelada métrica) [3]. La materia prima (sustrato) representa alrededor del 50% de los costos totales de producción [19]; por lo tanto, la rentabilidad de la producción de PHA está definida en gran medida por los costos de las materias primas, especialmente los sustratos fuente de carbono. Esto está asociado a que la acumulación de PHA se produce en condiciones aeróbicas, por lo que gran parte del sustrato se utiliza en la respiración intracelular microbiana con formación de CO2 y metabolitos secundarios solubles en agua. Sólo una parte de la fuente de carbono, mucho menos de la mitad, se dirige al crecimiento de biomasa celular y a la acumulación de PHA [19].

Sumado a lo anterior, los procesos industriales de producción de PHA se basan en tecnología de fermentación en la que utilizan costosos sustratos (azúcares purificados, aceites vegetales comestibles, entre otros) que, además, forman parte de la canasta familiar. Por tanto, su uso pone a la tecnología en competencia con la industria alimentaria y encarece la producción total de PHA. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de utilizar sustratos de fuentes de carbono que no afecten la seguridad alimentaria, sean económicos, asequibles y sostenibles para la síntesis sostenible de PHA [3,20].

Se han evaluado sustratos de bajo valor como fuentes de carbono para la producción de PHAs provenientes de diferentes sectores productivos: industria láctea (queso/suero, aguas residuales lácteas), fábricas de aceite y papel, cultivos agrícolas (efluentes de aceite de palma/soja/fruta), y desechos animales (estiércol de pollo/vaca) [3]. Sin embargo, son sustratos que requieren tratamientos previos para poder utilizarlos como medios de cultivo microbianos, lo que conlleva costes adicionales. Por este motivo, se ha dirigido la atención al uso de sustratos que provengan de un primer beneficio, como es la generación de biocombustibles, específicamente ácidos grasos volátiles (AGV), es decir, metabolitos intermedios en la digestión anaeróbica (DA) de la biomasa residual que se utilizan. para la producción de biogás [21]. En este sentido, los investigadores han dirigido su atención a fortalecer la producción de AGV como producto colateral de la producción de biogás [22]. Investigadores colombianos reportaron un interesante trabajo en el que aprovechan desechos de pesca para este fin, con los cuales también se obtiene digestato rico en AGV [23].

Bacillus megaterium LVN01, originario de Colombia, ha demostrado la capacidad de producir PHA a partir de glicerol residual de la industria del biodiesel [24], frutos de algarroba [25], residuos del procesamiento de fique (jugo de fique) [12] y aceite para freír. En esta investigación, B. megaterium LVN1 mostró la capacidad de sintetizar PHBV a partir de digestato líquido, un sustrato residual de la digestión anaeróbica de los peces viseras.

En este contexto, el grupo de investigación PROBIOM (producción, estructura y aplicación de biomoléculas) de la Universidad Nacional de Colombia aportó su experiencia investigativa a la producción de PHAs a partir de diferentes sustratos (glicerol, jugo de fique, pulpa de algarroba, aceite para freír) dar un segundo uso a los residuos de la industria pesquera a través de su participación.

Machine Translated by Google

Participación en el proyecto de regalías “Fortalecimiento de la actividad pesquera artesanal en el Pacífico nariñense colombiano hacia un uso sustentable del recurso. Tumaco”. Dentro del proyecto, la primera alternativa de uso de los residuos pesqueros ha sido la producción de biogás a través del grupo de Prospectiva Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. PRO- BIOM utiliza el digestato de esta primera fase como sustrato principal de B. megaterium LVN01 para la producción de PHA.

En Colombia, la pesca artesanal suministra alrededor de 12.000 toneladas de pescado/año al mercado nacional, es decir, el 8% del total de la pesca de captura del país. Se estima que el 45% de la captura total de la pesca artesanal se convierte en desperdicio [23,26], lo que produce graves pérdidas económicas para este sector y problemas ambientales asociados a la inadecuada disposición de residuos. En Colombia, los barcos pesqueros desechados son arrojados directamente al océano o llevados a tierra [23].

Participación en el proyecto “Fortalecimiento de la actividad pesquera artesanal en el Pacífico nariñense colombiano hacia el uso sustentable del recurso. Tumaco”, que tiene entre sus objetivos “Incrementar el aprovechamiento de los excedentes y desechos pesqueros en el Pacífico de Nariño”, sirvió de plataforma para dicha iniciativa. Dentro del objetivo antes mencionado, el foco inicial está en la producción de biogás a partir de desechos pesqueros a través del grupo de Prospectiva Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Los autores de esta investigación (el grupo PROBIOM) utilizan el digestato, coproducto de la etapa inicial, como sustrato principal para el crecimiento de B. megaterium LVN01 y la síntesis microbiana de PHA mientras exploran una nueva corriente de residuos, no reportada previamente, y conferir un valor potencial a los residuos pesqueros.

2. Materiales y métodos

2.1. Declaración de Ética

Los resultados de esta investigación se articulan según el Convenio de Acceso a Recursos Genéticos y Derivados No. 159, suscrito por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia, Resolución 0004, 2 de enero de 2018, en el marco del proyecto denominado “ Producción y caracterización de polihidroxialkaloatos sintetizados por cepas nativas a partir de residuos orgánicos.

2.2. Área de estudio y cepa bacteriana

B. megaterium LVN01 (Código GenBank: QJGY00000000.1) fue aislada por el grupo PROBIOM a partir de muestras de suelo recolectadas en el municipio de Guarne (06◦16′50″ N y 75◦26′37″ W , departamento de Antioquia, Colombia) y se caracterizó inicialmente mediante técnicas moleculares (similitud de secuencia de ADNr 16S), morfológicas y bioquímicas [12]. Los cultivos bacterianos se almacenaron a -4 ◦C en caldo Luria Bertani (caldo LB, MERCK, Darmstadt, Alemania) con 20% de glicerol (v/v).

2.3. Fuente de carbono

Como sustrato para las fermentaciones se utilizó un residuo líquido de la planta piloto de biogás, que opera con biomasa residual de desechos de pesca artesanal. La planta está ubicada en la ciudad de San Andrés de Tumaco en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia (en Tumaco, departamento de Nariño, Colombia). Las muestras fueron proporcionadas por el grupo de investigación de Prospectiva Ambiental de la misma universidad como parte del proyecto “Fortalecimiento de la actividad pesquera artesanal en el Pacífico colombiano de Nariño, hacia un uso sostenible del recurso”.

Este residuo líquido, conocido como digestato, es una valiosa fuente de AGV. Para su conservación se almacenó congelado a −4 ◦C, y antes de su uso en el proceso, se sometió a filtración a través de papel grueso (tamaño de poro 20 µm) para eliminar sedimentos mayores a 20 µm. Este paso facilitó la actividad de fermentación microbiana en el medio enriquecido con este sustrato y evitó la obstrucción de los sensores del equipo donde se llevó a cabo el proceso.

La caracterización bromatológica del digestato reveló la presencia de varios nutrientes, entre ellos AGV (59,04 ± 0,9 g/L), con concentraciones significativas de ácido acético.

Machine Translated by Google

(24,49 ± 1,82 g/L), ácido butírico (11,81 ± 0,02 g/L) y ácido isobutírico (9,36 ± 0,02 g/L). Esta composición representa una fuente potencial de carbono para B. megaterium, que es de interés para esta investigación (Tabla S1).

2.4. Medios culturales

El agar nutritivo (Merck, Microbiological Grade, Darmstadt, Alemania) estaba compuesto por 5,0 × 10-3 g/L de pluripeptona, 3,0 × 10-3 g/L de extracto de carne, 8,0 × 10-3 g/L de cloruro de sodio y 15,0 × Agar 10-3 g/L, con un pH final: 7,3 ± 0,2. El caldo Luria Bertani (caldo LB, MERCK, Darmstadt, Alemania) consistió en 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, con el pH ajustado a 7,0, usando aproximadamente 0,2 ml de NaOH (5 NORTE).

Las sales del medio mínimo (MMS) se suplementaron con KH2PO4 (1,5 g/L), Na2HPO4 (3,6 g/L), (NH4)2SO4 (1,0 g/L), MgSO4·7H2O (0,2 g/L), extracto de levadura (0,1 g/L), glicerol residual (20 g/L) como fuente de carbono y solución de oligoelementos (TE) de 1,0 ml/L que consiste en FeSO4·7H2O (10 g/L), ZnSO4·7H2O (2,25 g/L). , CuSO4·5H2O (1,0 g/L), MgSO4·5H2O (0,5 g/L), CaCl2·2H2O (2,0 g/L), NaB4O7·10H2O (0,23 g/L), (NH4)6Mo7O24 (0,1 g/L), y 10 mL de HCl (35%), con un pH final de 7,3 ± 0,2.

2.5. Activación de la cepa bacteriana y preparación del inóculo 2.5.1.

Activación de B. megaterium LVN01

Un total de 10 µL de las células previamente conservadas se cultivaron en caldo LB con 20% de glicerol en placas de agar nutritivo a 37 ◦C durante 24 h. La presencia y pureza del microorganismo se determinó mediante tinción de Gram y tinción de esporas con verde malaquita. La capacidad de acumulación de PHA se verificó mediante tinción con azul del Nilo, que se describe más adelante en el artículo.

2.5.2. Preparación del inóculo

Una colonia de B. megaterium LVN01 se resuspendió en 10 mL de caldo LB y se incubó durante 24 h en un agitador orbital (Heidolph Unimax 1010 con Inkubator 1000, Heidolph instrument, Schwabach, Alemania) a 37 ◦C y 200 rpm. Posteriormente, se diluyó 1 mL del microorganismo activado en 50 mL de medio de cultivo LB. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital (37 ◦C y 200 rpm) durante 6 h o hasta que la solución en cada matraz alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO600) mayor a 1,0 unidad. Finalmente, para el inóculo se realizó una nueva fermentación tomando 100 mL de preinóculo y 200 mL de medio MMS. El cultivo se incubó en un agitador orbital a 37 ◦C y 200 rpm durante aproximadamente 24 h, hasta que las lecturas estimadas de DO600 estuvieron entre 0,1 y 0,3 unidades.

2.5.3. Caracterización de B. megaterium y visualización del PHA acumulado.

Se utilizó el protocolo de tinción de Gram [27] para identificar la morfología de las células bacterianas de B. megaterium LVN01. El portaobjetos teñido se dejó secar al aire y se observó con un microscopio (Leica DM500, Leica microsystems, Wetzlar, Alemania) (Figura S1). Luego se desarrolló la tinción de esporas utilizando la metodología Shaeffer-Fulton [28,29]; el portaobjetos se cubrió con safranina durante 2 minutos, se lavó, se dejó secar y se observó bajo el microscopio (Figura S2). La acumulación de polihidroxialcanoato (PHA) se visualizó por primera vez con rojo Nilo [30], seleccionando colonias que mostraban fluorescencia rojo-naranja bajo luz ultravioleta (340 nm), potencialmente clasificadas como productoras de PHA (Figura S3a). Posteriormente, para confirmar la presencia de PHA, las colonias seleccionadas se tiñeron con azul de Nilo siguiendo la metodología de Ostle y Holt (1982) [31] y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia a 450 nm (Nikon Eclipse 80i, Tokio, Japón). Este proceso permitió la visualización de los gránulos de biopolímero (Figura S3b).

2.6. Procesos fermentativos aeróbicos

Los bioprocesos se llevaron a cabo en un biorreactor de 7 L con tanque agitado (Applikon, equipado con dos hélices tipo Rushton y un biocontrolador EZ2, serie 2310110012, Delf, Países Bajos), operado en modo discontinuo. El volumen de trabajo inicial fue de 3 L (diluido

Machine Translated by Google

digestato líquido, MMS e inóculo en una proporción de 80:10:10) (Figura S4). La temperatura se fijó en 30,8 ◦C, la velocidad de agitación en 400 rpm y el tiempo en 60 h. A 300 ml de MMS, se agregaron 300 ml del inóculo de B. megaterium, seguido de 2,4 L del digestato o fuente de carbono. En estas condiciones, la DO600 inicial del medio se registró entre 0,1 y 0,3 unidades. El medio de fermentación se mantuvo a pH 7,0 ± 0,2 (ajustado usando HCl (MERCK, Darmstadt, Alemania) o NaOH (MERCK, Darmstadt, Alemania, 1 M, según fuera necesario), y el oxígeno disuelto se ajustó al 100% de saturación inyectando varios pulsos de oxígeno industrial extra seco durante la fermentación (1 vvm), a través de un filtro de ventilación de 0,22 µm , con un flujo de oxígeno de 3 L/ min para mantener las condiciones aeróbicas. Gotas de una solución antiespumante de silicona (Antioqueña) al 10% (v/v). de químicos, grado alimenticio, Colombia) se agregaron al inicio de cada lote y cuando fue necesario.

En esta investigación se utilizaron los parámetros operativos óptimos establecidos por Gómez et al. [24] se aplicaron para la producción de PHA, utilizando B. megaterium LVN01 y glicerol residual como fuente de carbono, en un biorreactor de 5 L operado en modo discontinuo con un volumen efectivo de 3 L. Se derivó la proporción de digestato (fuente de carbono) utilizada. de un estudio previo a escala de laboratorio , que mostró los valores más altos de PSC (27,1 mg) y PHA (14,8 mg) a las 36 h durante fermentaciones discontinuas en matraces de 500 mL bajo agitación orbital (T: 30 ◦C, 200 rpm), pH : 7,0 y una relación MMS-digestado de 20:80.

La cinética de fermentación se monitoreó durante 60 h, tomándose muestras (20 ml) por triplicado cada dos horas. El crecimiento bacteriano se midió espectrofotométricamente (DO600), seguido de la determinación del peso seco de las células (DCW) y la extracción del biopolímero tipo PHA.

Cada muestra se centrifugó a 10.000 × g durante 10 min a 4 ◦C (Centrifuge Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Kalkberg, Alemania). Los sedimentos bacterianos se lavaron dos veces consecutivas con 20 ml de agua desionizada. Finalmente, los gránulos se resuspendieron en 700 µL de agua desionizada y se congelaron a −4 ◦C hasta su posterior liofilización (a −50 ◦C, 0,01 mBar durante 24 h). La biomasa bacteriana recolectada se secó a 60 ◦C (estufa Binder clase 2.0, Alemania) hasta alcanzar un peso constante y se informó como DCW (gramos de células por litro de medio de cultivo).

2.7. Extracción y Purificación de PHA

El biopolímero se aisló a partir de la biomasa liofilizada siguiendo la metodología de Gómez et al. [24]. La biomasa seca se trató con una mezcla de hipoclorito de sodio al 10% (v/v), (NaClO, Químicos JM, Medellín, Colombia) y cloroformo (CHCl3) (MERCK, 99 %, Darmstadt, Alemania) en una proporción 1:1,5. La muestra se homogeneizó mediante agitación suave y rápida (vortex) y se incubó a 40 ◦C y 200 rpm durante 3 h. Posteriormente se centrifugó (10.000× g, 10 min, 4 ◦C) para separar las fases. La fase orgánica que contenía el PHA se filtró a través de papel de filtro grueso. El filtrado se secó a temperatura ambiente (27 ◦C) en una cabina de bioseguridad (BIOBASE, modelo BBS-DDC, serie BBS11V1805175D, Shandong, China, velocidad del aire 0,3–0,5 m/s), y se midió su masa seca utilizando una báscula (Shimakzu, serie AUW22OD, Kyoto, Japón con un rango de trabajo de 220 ga 1 mg).

Para la purificación de PHA se utilizó el procedimiento de Gómez et al. [24] , con algunas modificaciones: se agregaron 500 µL de metanol frío (0–4 ◦C) al 70% v/v (JT Baker, GR, Phillipsburg, NJ, EE. UU.) a cada tubo que contenía el filtrado seco para precipitar. las partículas. La solución se refrigeró a 4 ◦C durante 12 h y luego se centrifugó a 8000 x g y 4 ◦C durante 10 min. El disolvente se evaporó a temperatura ambiente (27 ◦C) en una campana de extracción de gases para recuperar el PHA.

A continuación, el biopolímero (PHA) se lavó consecutivamente con n-hexano (MERCK, GR, Darmstadt, Alemania), acetona (MERCK, GR, Darmstadt, Alemania) y éter dietílico (Mallinckrodt, 99,9%, Saint Louis, MO, EE. UU.). Cada disolvente (250 µl) se añadió gota a gota a la muestra de PHA seca, seguido de centrifugación (8000 x g, 4 ◦C, 10 min). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó al aire a temperatura ambiente (27 ◦C) durante 12 h para eliminar cualquier disolvente restante. Este proceso de lavado se repitió de 2 a 3 veces hasta obtener un PHA casi blanco para asegurar su pureza.

Machine Translated by Google

Para calcular la relación de PHA en función de la cantidad de peso seco acumulado, expresada como porcentaje, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{PHA (\%)} = \frac{\text{PHAPeso}}{\text{CelularSecoPeso}} \times 100.$$

2.8. Caracterización de PHA

2.8.1. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS/SIM)

El análisis de las muestras se realizó según las directrices ISO 12966-2:2017 [32] con algunas modificaciones. Se utilizó poli(ácido 3-hidroxibutírico) (Sigma-Aldrich, lote: 09217BD-337, St. Louis, MO, EE. UU.) como estándar de referencia. El análisis cromatográfico se realizó en un GC AT 6890 Series Plus (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado con un detector selectivo de masas (AT, MSD 5973) operado en modo SIM. La inyección se realizó en modo splitless (Viny = 2 µL). La columna utilizada en el análisis fue 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm DB-5MS 5%-Ph-PDMS.

2.8.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (1H-NMR y 13C-NMR)

Se utilizó un espectrómetro de RMN de 600 MHz (Bruker, Avance III HD, criosonda de nitrógeno TCI , Topspin Software v3.6.5, tubo de 5 mm, Billerica, MA, EE. UU.). La muestra se preparó previamente disolviendo 30 mg de biopolímero en cloroformo deuterado (CDCl3) y se utilizaron 700 µL de tetrametilsilano (TMS) como control interno.

2.9. Propiedades térmicas del PHA

2.9.1. Calorimetría diferencial de barrido

En este análisis se utilizó un calorímetro Q2000 (TA INSTRUMENTS, New Castle, DE, EE. UU.) para calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para el análisis se utilizó exactamente 5,72 mg de muestra (PHA). La prueba se realizó con un flujo de nitrógeno como gas de purga de 50 ml/min; luego, se parametrizó el equipo para el material. Hubo un período de estabilización a una temperatura de 25 ◦C, con calentamiento hasta 200 ◦C a una velocidad de 10 ◦C/min.

2.9.2. Análisis termogravimétrico Para el

análisis termogravimétrico (TGA), se utilizó un analizador termogravimétrico TGA/SDTA851e (Mettler Toledo, OH, EE. UU.), que opera bajo una atmósfera de nitrógeno con un caudal de 40 ml/min. Una muestra de 10 mg de ácido polihidroxibutírico (PHB) se sometió a un rango de temperatura entre 30 ◦C y 800 ◦C a una velocidad de 10 ◦C/min.

2.10. Análisis y Presentación de Resultados

Todas las pruebas realizadas en esta investigación se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como mediana ± desviación estándar tanto en tablas como en gráficos. Para diseñar los gráficos se utilizó el software Sigma Plot versión 10.0 (Systat Software, Inc; Chicago, IL; EE. UU.) y el análisis estadístico se desarrolló en STATGRAPHICS Centurion versión XVI.II (Statgraphics Technologies, Inc.; The Plains, VA, EE. UU.).

3. Resultados

3.1. Cinética de fermentación

La fase de retraso del cultivo de B. megaterium (LVN01) en digestato se extendió a casi 40 h, y su fase exponencial ocurrió entre 40 y 66 h (Figura 1). Se tomaron muestras del sistema hasta 60 h según experimentos previos a escala de laboratorio bajo los mismos parámetros operativos (Figura S5). Las muestras se evaluaron por triplicado para garantizar la exactitud de los resultados. Sin embargo, debido a la dispersión de los datos, se determinó que

Machine Translated by Google

3.1. Cinética de fermentación

La fase de retraso del cultivo de B. megaterium (LVN01) en digestato se extendió a casi 40 h, y su fase exponencial ocurrió entre 40 y 66 h (Figura 1). Se tomaron muestras del sistema hasta 60 h según experimentos previos a escala de laboratorio bajo los mismos parámetros operativos (Figura S5). Las muestras se evaluaron por triplicado para garantizar la exactitud de los resultados. Sin embargo, debido a la dispersión de los datos, se determinó que calcular la mediana de cada unidad experimental proporcionaría una medida más representativa de los valores promedio: medida de los valores promedio:

$$X\breve{} = \frac{\sum_{y0=1}^{\infty} Xi \times fi}{norte}.$$

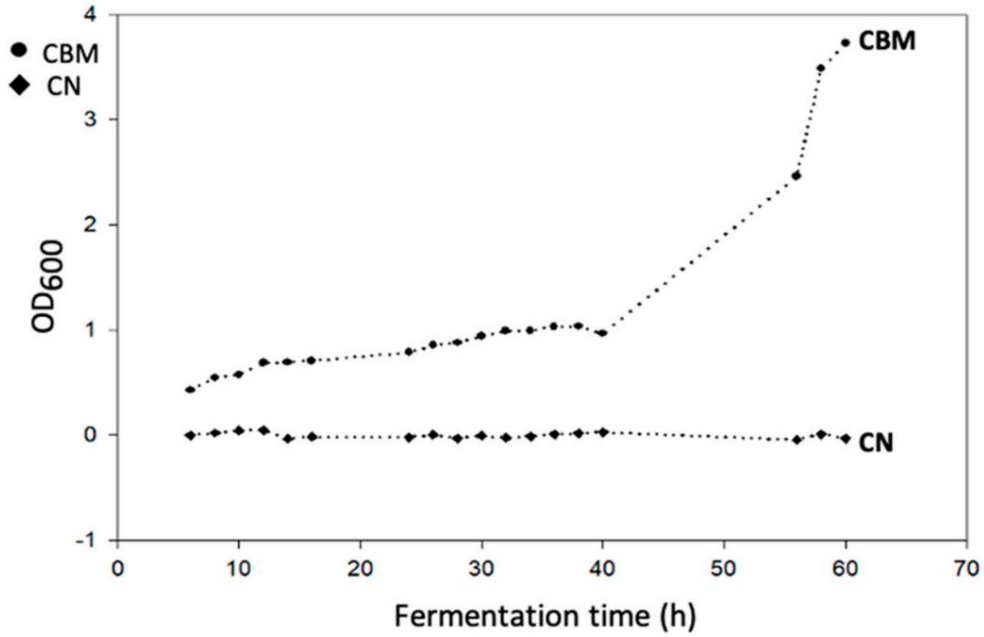


Figura 1. Curva de crecimiento de B. megaterium LVN01 en digestato de Biogás (CBM, círculos); control negativo: medio con digestato (CN, diamantes); condiciones operativas: 3L, 400 rpm, 30,8 °C, pH 7.

Figura 1. Curva de crecimiento de B. megaterium LVN01 en digestato de Biogás (CBM, círculos); control negativo: medio con digestato (CN, diamantes); condiciones operativas: 3L, 400 rpm, 30,8 °C, pH 7.

3.2. Recuperación de poli(3-hidroxibutirato)-Co-(3-hidroxivalerato) (PHBV)

3.2. Recuperación de Poli(3-Hidroxibutirato)-Co-(3-Hidroxivalerato) (PHBV)

La recuperación del biopolímero es esencial para evaluar el éxito del bioproceso. Bajo los parámetros de este estudio, las cantidades más altas de PHA se detectaron a las 16 h y 24 h, con valores de 10,8 mg y 10,3 mg, respectivamente (Figura 2).

La recuperación del biopolímero es fundamental para evaluar el éxito del bioproceso. Bajo los parámetros de este estudio, las cantidades más altas de PHA se detectaron a las 16 h y 24 h, con valores de 10,8 mg y 10,3 mg, respectivamente (Figura 2).

El rendimiento óptimo de B. megaterium LVN01 en el digestato se produjo a las 16 h, con un rendimiento de PHB de 2,7 g de PHB g de célula-1 (270%) y un DCW de 0,133 g L-1 (Figura 3). Los valores máximos de DCW = 0.563 g L-, alcanzados a las 60 h en el proceso de fermentación de B. megaterium con digestato (Figura 3), contrastan con el rendimiento máximo de producción de PHA (360 mg PHBV L-1) observado a las 16 h. del proceso. Se puede observar una tendencia inversa entre la biomasa y la producción de PHBV (Figura 4).

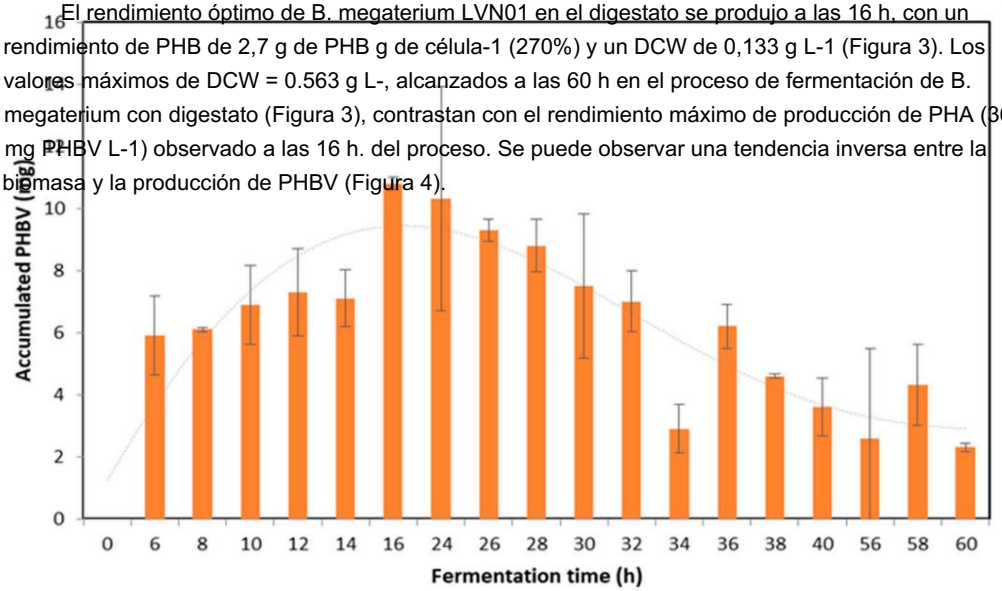


Figura 2. PHBV acumulado por B. megaterium LVN01 usando digestato de biogás en función del tiempo de fermentación expresado en horas (h). (V: 3 L; t: 60 h, 400 rpm; T: 30,8 ◦C, pH 7,0). El tiempo de fermentación en línea de puntos expresado en horas (h). (V: 3 L; t: 60 h, 400 rpm; T: 30,8 °C, pH 7,0). Los puntos muestran la tendencia de acumulación de PHBV durante la fermentación. La línea muestra la tendencia de acumulación de PHBV durante la fermentación.

Machine Translated by Google

El rendimiento óptimo de B. megaterium LVN01 en el digestato se produjo a las 16 h, con un rendimiento de PHB de 2,7 g de PHB g de célula-1 (270%) y un DCW de 0,133 g L-1 (Figura 3). Los valores máximos de DCW = 0.563 g L−, alcanzados a las 60 h en el proceso de fermentación de B. megaterium con digestato (Figura 3), contrastan con el rendimiento máximo de producción de la PHA (360 mg PHBV L-1) observado a las 16 h del proceso. Se puede observar una tendencia inversa al tiempo de fermentación expresado en horas (h). (V: 3 L; t: 60 h, 400 rpm; T: 30,8 °C; pH 7,0). El punto entre biomasa y producción de PHBV (Figura 4). La línea muestra la tendencia de acumulación de PHBV durante la fermentación.

Figura 2. PHBV acumulado por B. megaterium LVN01 utilizando digestato de biogás en función del tiempo de fermentación expresado en horas (h). (V: 3 L; t: 60 h, 400 rpm; T: 30,8 °C; pH 7,0).

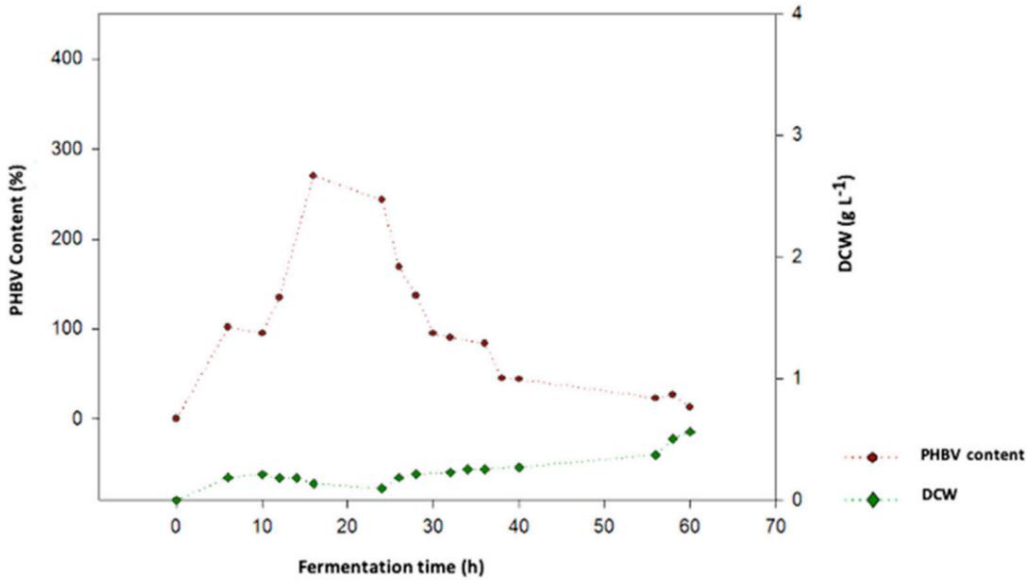


Figura 3. Crecimiento celular en términos de DCW de B. megaterium LVN01 cultivado en digestato de biogás vs. Producción de PHBV (V: 3 L; t: 60 h, 400 rpm; T: 30,8 °C; pH 7,0).

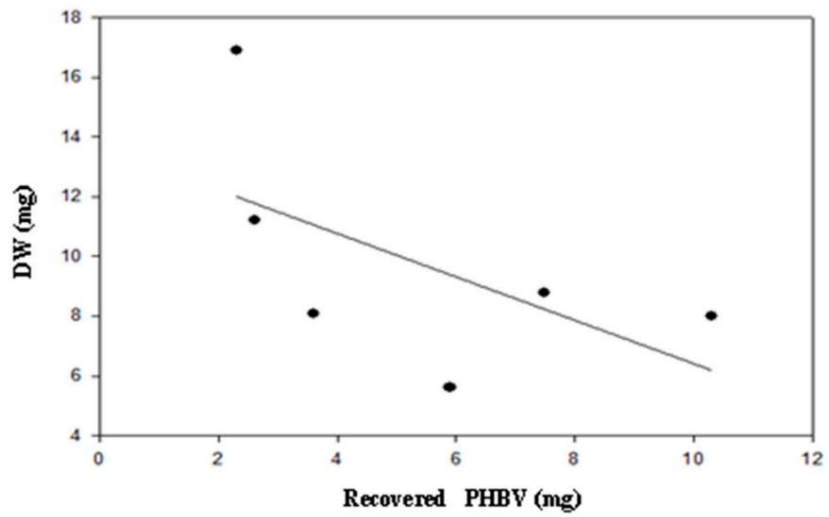


Figura 4. Peso seco (PS) de B. megaterium LVN01 en digestato de la planta de Biogás, San Andrés de Tumaco (V: 3 L; t: 60 h, 400 rpm; T: 30,8 °C; pH 7,0).

3.3. Caracterización del PHBV

3.3.1. Cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS)

La estructura del PHBV se determinó inicialmente mediante derivatización (metanólisis), seguida de análisis GC-MS. El cromatograma (Figura 5) de los ésteres metílicos derivados del extracto de biopolímero mostró dos señales principales con tiempos de retención de 10,9 min y 14,6 min. Además, reveló señal a los 14,1 min, aunque con muy baja intensidad (Figura S6). Otra señal de baja intensidad a los 13,8 min requiere un análisis de masa adicional.

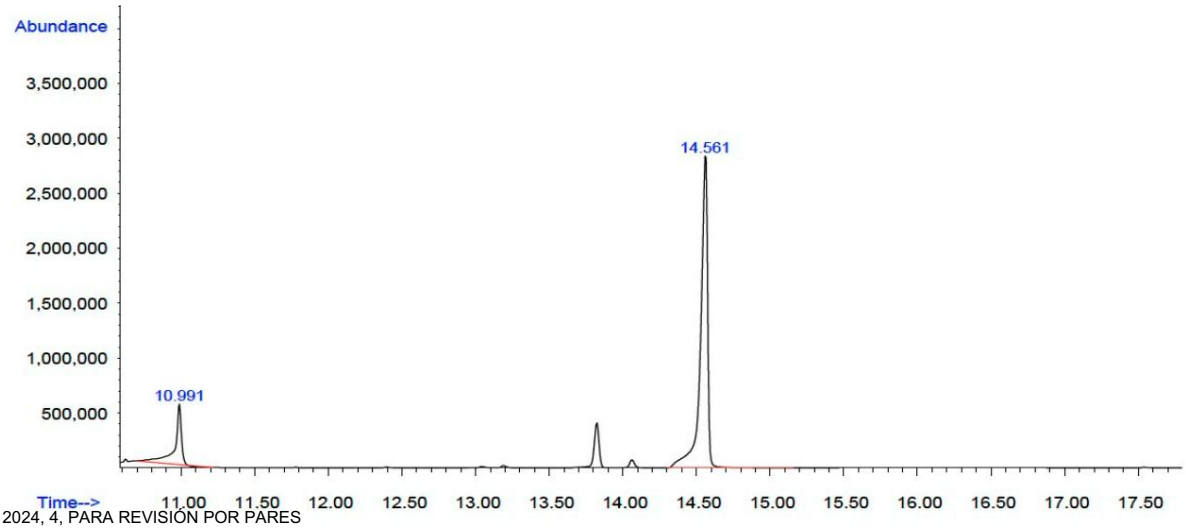
(Figura S6). Otra señal de baja intensidad a los 13,8 min requiere un análisis de masa adicional. Además, se observa otro pico a los 10,991 min, que representa el estándar interno utilizado en el análisis, es decir, éster de ácido benzoico. La presencia de este estándar interno es fundamental para garantizar la precisión de la cuantificación y la consistencia de los resultados.

3.3.2. RMN por resonancia manética nuclear

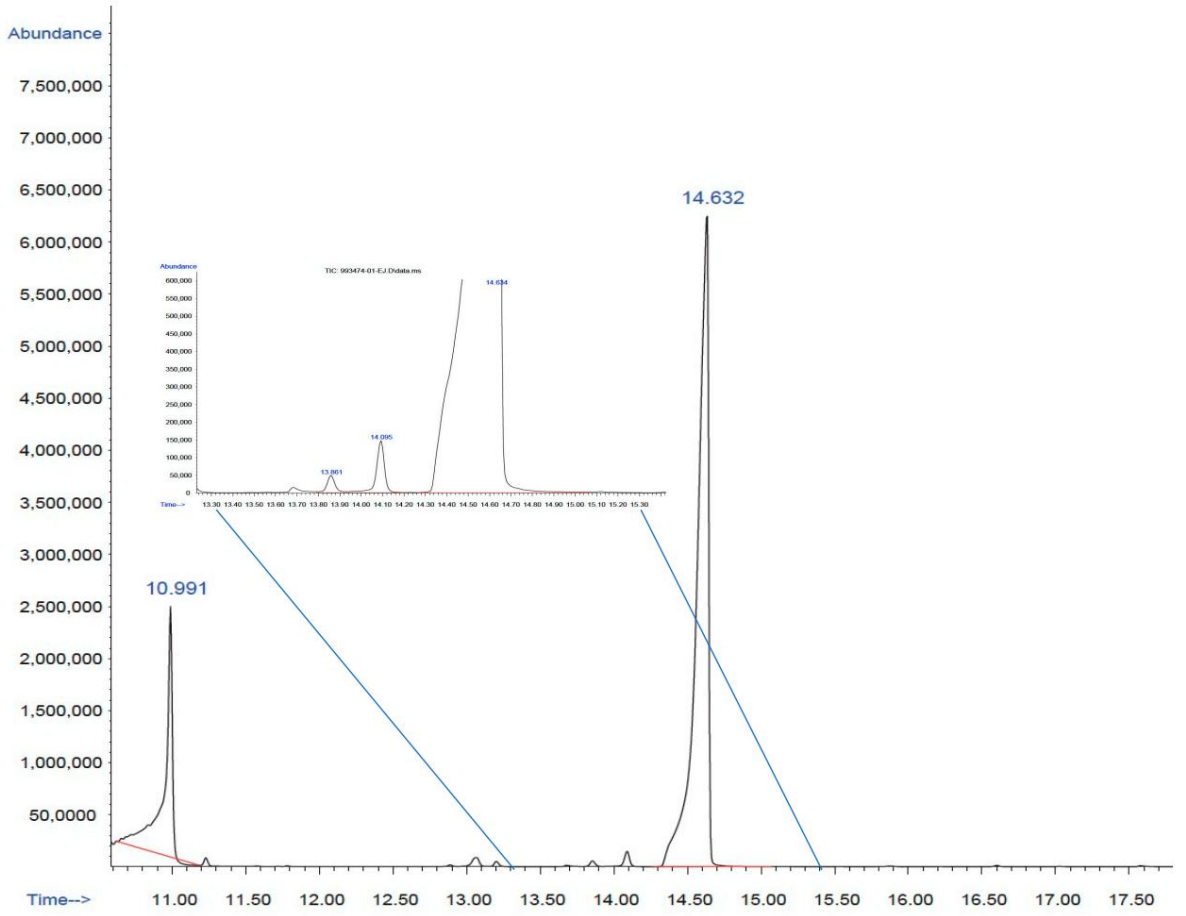
Machine Translated by Google

3.3.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para reconfirmar la estructura química del PHA inferida del análisis GC-MS, se utilizó espectroscopía de RMN (1H-NMR y 13C-NMR). Los resultados del análisis mostraron que el copolímero, poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), que estará constituido por los monómeros 3HB y 3HV (Figura 6), lo que concuerda totalmente con los resultados del análisis GC-MS.



(A)



(B)

Figura 5. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS): (A) cromatograma del polímero comercial Figura 5. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS): (A) cromatograma del polímero comercial poli(ácido 3-hidroxibutírico- ácido co-3-hidroxivalérico) (Parte N° 403121, Sigma–Aldrich, polímero poli(ácido 3-hidroxibutírico-ácido co-3-hidroxivalérico) (Parte N◦ 403121, Sigma–Aldrich, Lote: Lote: MKBL7384V); (B) cromatograma del copolímero biosintetizado por B. megaterium LVN01 MKBL7384V); (B) cromatograma del copolímero biosintetizado por B. megaterium LVN01 a partir de digestato de biogás. La ampliación muestra los valores de los tres picos, de izquierda a derecha: digestato de biogás. La ampliación muestra los valores de los tres picos, de izquierda a derecha: 13,861; 13.861; 14.095 y 14.634. 14.095 y 14.634.

Machine Translated by Google

Además, se observa otro pico a los 10,991 min, que representa el estándar interno utilizado en el análisis, es decir, éster de ácido benzoico. La presencia de este estándar interno es fundamental para garantizar la precisión de la cuantificación y la consistencia de los resultad

3.3.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para reconfirmar la estructura química del PHA inferida del análisis GC-MS, Figura 5. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS): (A) se utilizó el cromatograma de la espectroscopia de RMN comercial (RMN 1H y RMN 13C). Los resultados del análisis mostraron que el polímero poli(ácido 3-hidroxibutírico-co-3-hidroxivalérico) (Parte N° 403121, Sigma–Aldrich, copolímero, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), era constituido por Lote: MKBL7384V); (B) cromatograma del copolímero biosintetizado por B. megaterium LVN01 los monómeros 3HB y 3HV (Figura 6), que concuerda totalmente con los resultados del digestato de biogás. La ampliación muestra los valores de los tres picos, de izquierda a derecha: análisis GC-MS: 13.861, 14.095 y 14.634.

(B)

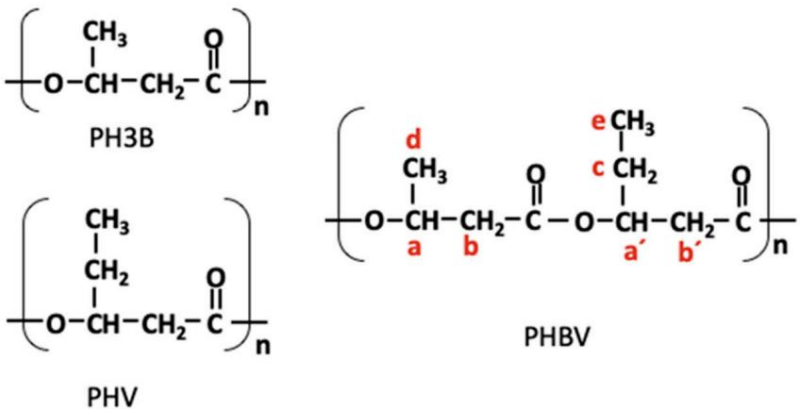


Figura 6. Estructura química del copolímero PHBV. PH3B: poli(ácido 3-hidroxibutírico); PHV: poli (ácido 3-hidroxivalérico); PHBV: poli(ácido 3-hidroxibutírico-ácido co-3-hidroxivalérico); n: repetición de unidades monoméricas; a: CH; b: CH2 ; c: CH2 ; d: CH3 ; e: CH3 ; a': CH; b': CH2.

Figura 6. Estructura química del copolímero PHBV. PH3B: poli(ácido 3-hidroxibutírico); PHV: poli(ácido 3-hidroxivalérico); PHBV: poli(ácido 3-hidroxibutírico-ácido co-3-hidroxivalérico); n: repetición de unidades monoméricas; a: CH; b: CH2; c: CH2; d: CH3; mi: CH3; a': CH; b': CH2.

El espectro de 1H-NMR (Figura 7) mostró señales características del compuesto PHBV (Tabla 1). Algunos cambios son típicos de los dos monómeros (3HB y 3HV). Sin embargo , las que marcan la diferencia entre las dos subunidades aparecen en δ 1,73–1,78 ppm, δ 1,38 ppm y δ 1,00 ppm.

Tabla 1. Caracterización de protones 1H-NMR.

	Tipo de protón	Desplazamiento químico δ (ppm)
' a y un	Metina (-CH-) en PHV y PHB	5.356 y 5.363
b ′ y B	Metileno (-CH2) en PHV y PHB	2,59–2,57 y 2,69–2,73
C	Metileno (-CH2) en PHV	1,73–1,78
d	Metilo (-CH3) en PHB	1.38
mi	Metilo (-CH3) en PHV	1.00

El espectro de 13C-NMR (Figura 8) muestra los desplazamientos químicos de las señales correspondientes a los diferentes tipos de átomos de carbono presentes en la estructura del biopolímero obtenido a través de la fermentación de B. megaterium LVN01. Al comparar estas señales (C=O δ 169,18 ppm; CH δ 67,63 ppm; CH2 δ 40,80 ppm; y CH3 δ 19,77 ppm) con las del espectro comercial de PHBV y las reportadas por otros autores para PHB [24,33], Se puede inferir que B. megaterium LVN01 acumula principalmente PHB, lo que tiene implicaciones importantes en diversas aplicaciones biotecnológicas y ambientales.

Machine Translated by Google

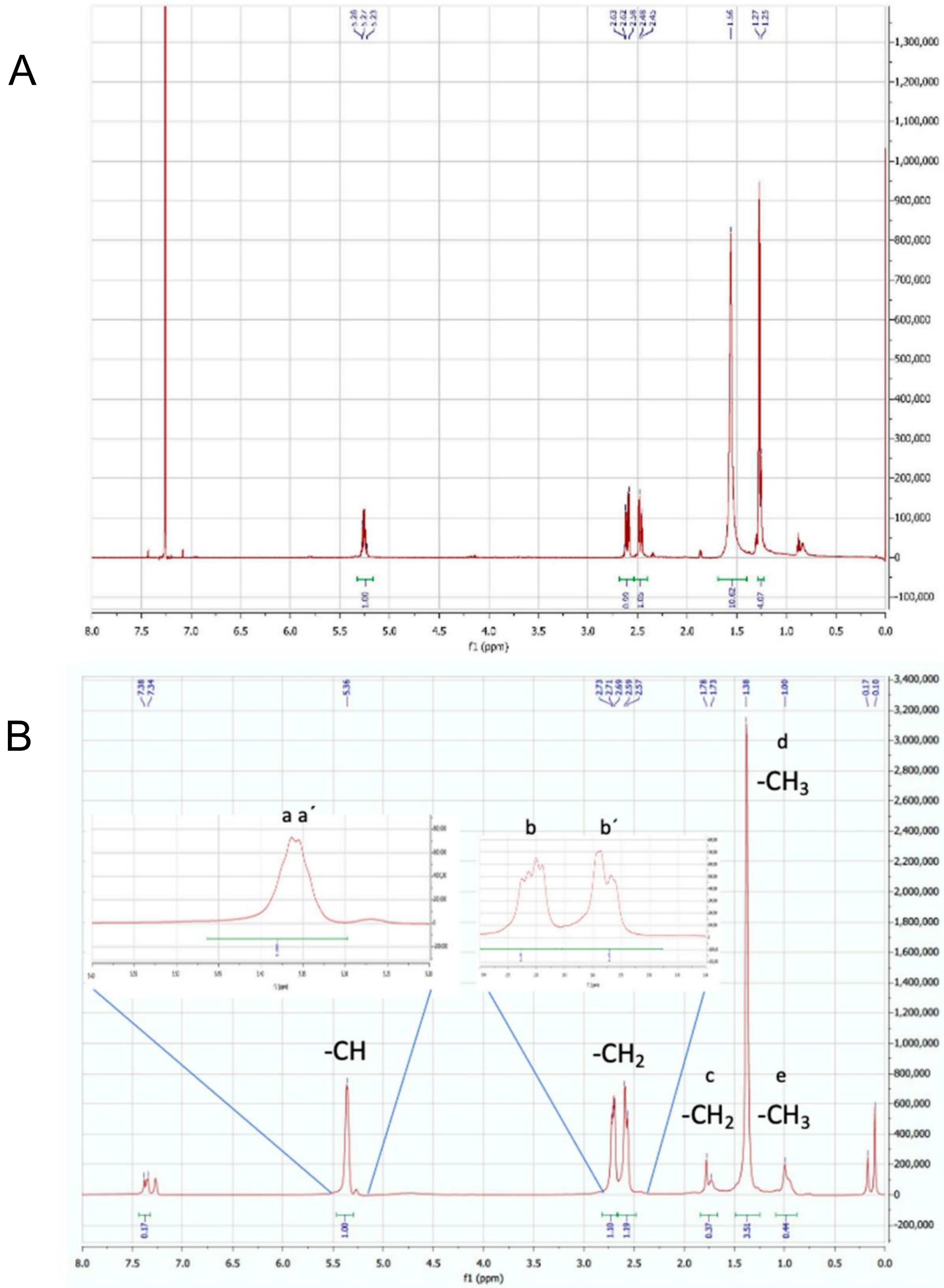


Figura 7. Espectro 1H-NMR de PHBV sintetizado por B. megaterium a partir de digestato de biogás (lote de fermentación), que muestra el cambio químico de los grupos funcionales característicos: (A) comercial estándar (Figura S7(A1–A3)); (B) sintetizado por Bacillus megaterium (Figura S7(B1, B2)).

Machine Translated by Google

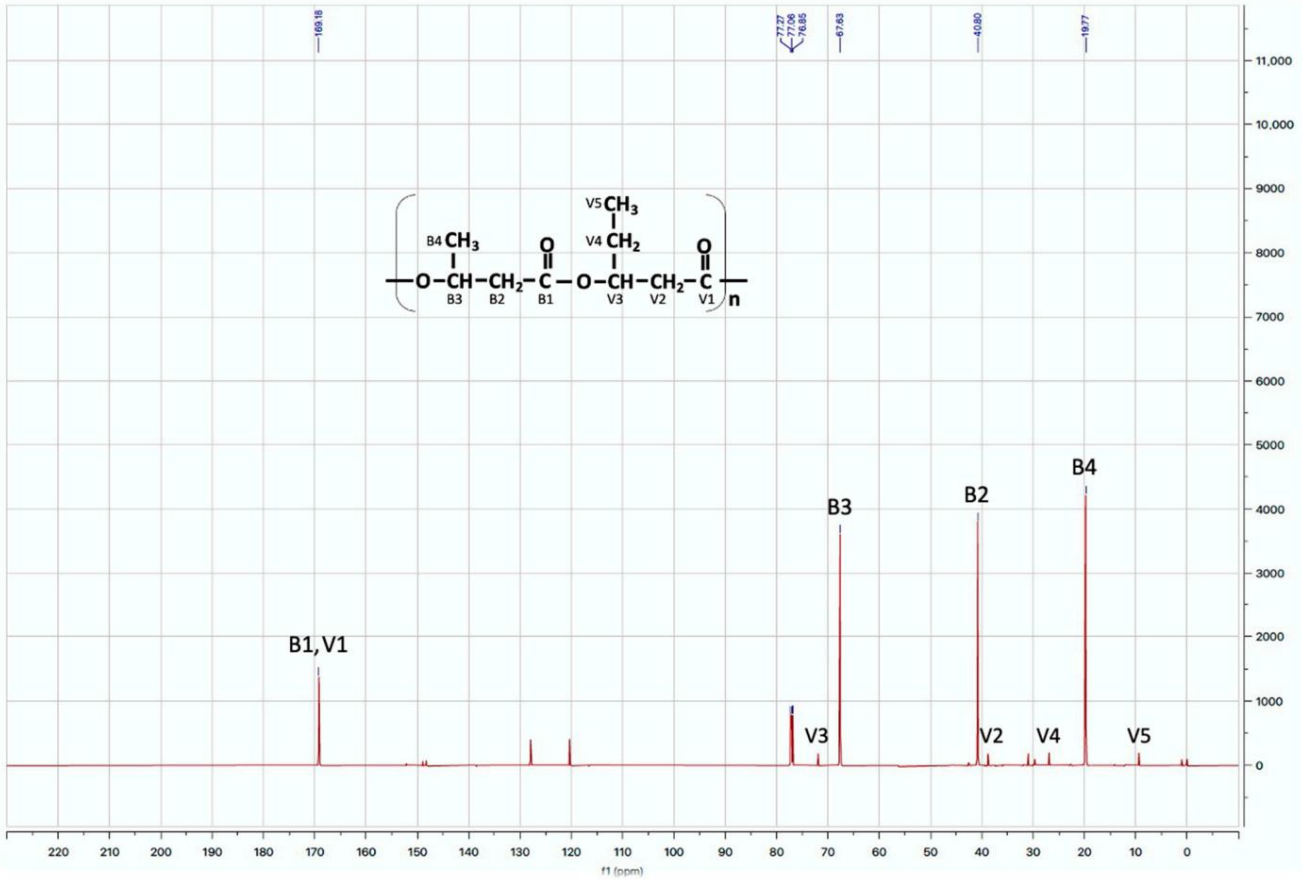


Figura 8. Espectro de 13C-NMR, correspondiente a la muestra de PHBV sintetizada por B. megaterium LVN01 en digestato líquido.

Figura 8. Espectro de 13C-NMR, correspondiente a la muestra de PHBV sintetizada por B. megaterium LVN01 en digestato líquido.

3.4. Determinación de propiedades térmicas

Las propiedades térmicas del PHBV producido por B. megaterium se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) en una atmósfera de nitrógeno.

La estabilidad térmica del biopolímero obtenido se determinó mediante análisis termogravimétrico. Con base en las curvas termogravimétrica (TG) y derivada (DTG) (Figura 9), se infiere que el PHBV obtenido presenta una sola etapa de descomposición bajo un proceso continuo y uniforme. El perfil de la curva TG (Figura 9A) indica que es un copolímero térmicamente estable en el rango de temperatura de 35,0 a 254,540 ◦C, alcanzando una Td 1% de 266,2 ◦C (la temperatura a la que se produce una pérdida de peso del 1%) en 23,58 minutos. Continúa con menores pérdidas de masa en el tiempo, hasta alcanzar una Td 10% de 280,9 ◦C Posteriormente el material comienza a degradarse, teniendo una temperatura de descomposición inicial Td (Tonset) de 283,1 ◦C y una temperatura de descomposición final (Tendset) de 296,98 ◦C. En este rango de temperatura, y en tan solo 2 min, el compuesto pierde alrededor del 72% de su peso, con una Td máxima de 290,114 ◦C, en la que se alcanza la velocidad máxima de descomposición (Figura 9B). En el Tendset se observa una pérdida de peso del 86%, y aproximadamente el 90% de la masa se pierde en el rango de temperatura de 253.376 ◦C a 308.084 ◦C.

B

Machine Translated by Google

Figura 8. Espectro de 13C-NMR, correspondiente a la muestra de PHBV sintetizada por B. megaterium LVN01 en digestato líquido.

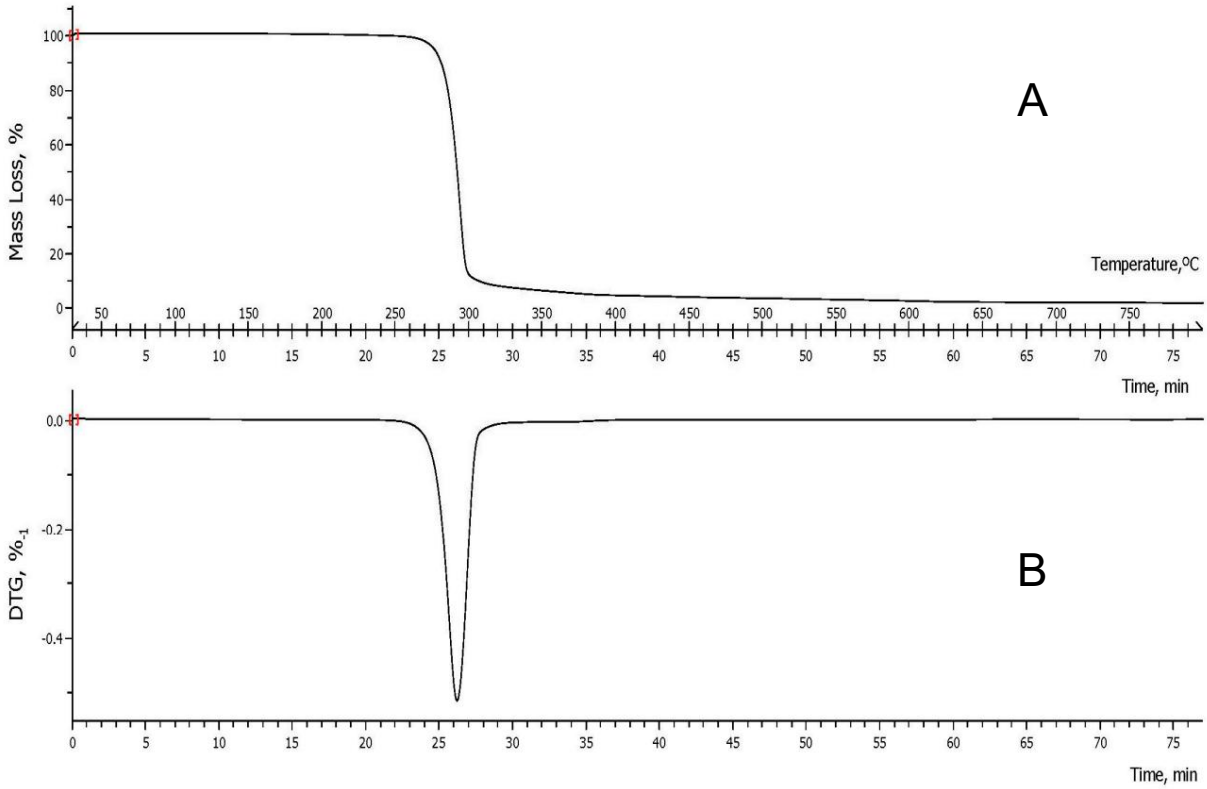


Figura 9. Curvas del termograma (TG) (A) y su derivado (DTG) (B) de la muestra de PHBV sintetizada por B. megaterium LVN01 a partir de digestato de biogás.

Comparando estos resultados con los de Gómez et al. (2020), quienes reportaron una Td de 266,2 ◦C y una pérdida de peso del 97,7% en el rango de temperatura de 230 ◦C a 300 ◦C para PHB sintetizado por B. megaterium utilizando glicerol residual como sustrato [24], puede Se puede concluir que B. megaterium ajusta su batería bioquímica para metabolizar el digestato de biogás, produciendo un PHA con mejores propiedades físicas que el sintetizado por la bacteria al utilizar glicerol residual. En este contexto, la estabilidad térmica del material es particularmente importante, lo que está asociado con el Td, los PHA con bajas temperaturas de fusión y/o valores de estabilidad térmica más altos que son más deseables [34]. La marcada diferencia entre los valores de Td registrados para el PHA sintetizado por B megaterium respecto al digestato de biogás (Td = 290,114 ◦C) y el glicerol residual (Td = 266,2 ◦C) permite deducir la presencia de dos estructuras químicas diferentes, que Complementa los resultados de GC-MS y NMR.

En cualquier caso, la Td (290,114 ◦C) del PHBV en estudio está por encima de los valores máximos de Td reportados en la literatura para PHB: 220 ◦C [34], 252 ◦C [35] y 280 ◦C [36]. , entre otros. Por otro lado, a pesar de superarlos, se acerca más a los valores de Td reportados para PHBV: 279.236 ◦C [34], 285.9 ◦C [37] y 286 ◦C [37], entre otros.

El análisis DSC del biopolímero sintetizado por B. megaterium LVN01 a partir del digestato de biogás reveló tres eventos térmicos exotérmicos (Figura 10). Los dos más significativos tienen temperaturas de fusión de Tm1 = 143,01 ◦C y Tm2 = ◦C 155,7 ◦C y entalpías de fusión de (ΔHf) = 1,541 J g−1 y (ΔHf) = 19,80 J g−1 . Estos resultados concuerdan con los de otros estudios; por ejemplo, Abbasi et al. [38] obtuvieron PHBV mediante fermentación de estiércol lechero con consorcios microbianos mixtos (MMC), con contenidos de 3HV entre 16% y 24%, e informaron que parte del PHBV extraído mostró dos temperaturas de fusión (Tm); la Tm1 más baja osciló entre 126,1 ◦C y 159,7 ◦C, y la Tm2 más alta varió entre 152,1 ◦C y 170,1 ◦C.

Machine Translated by Google

enapes o g−. Estos resultados concuerdan con otros estudios; por ejemplo, Abbasi et al. [38] obtuvieron PHBV mediante fermentación de estiércol lechero con consorcios microbianos mixtos (MMC), con contenidos de 3HV entre 16% y 24%, e informaron que parte del PHBV extraído mostró dos temperaturas de fusión (Tm); la Tm1 más baja osciló entre 126,1 °C y 159,7 °C, y la Tm2 más alta varió entre 152,1 °C y 170,1 °C.

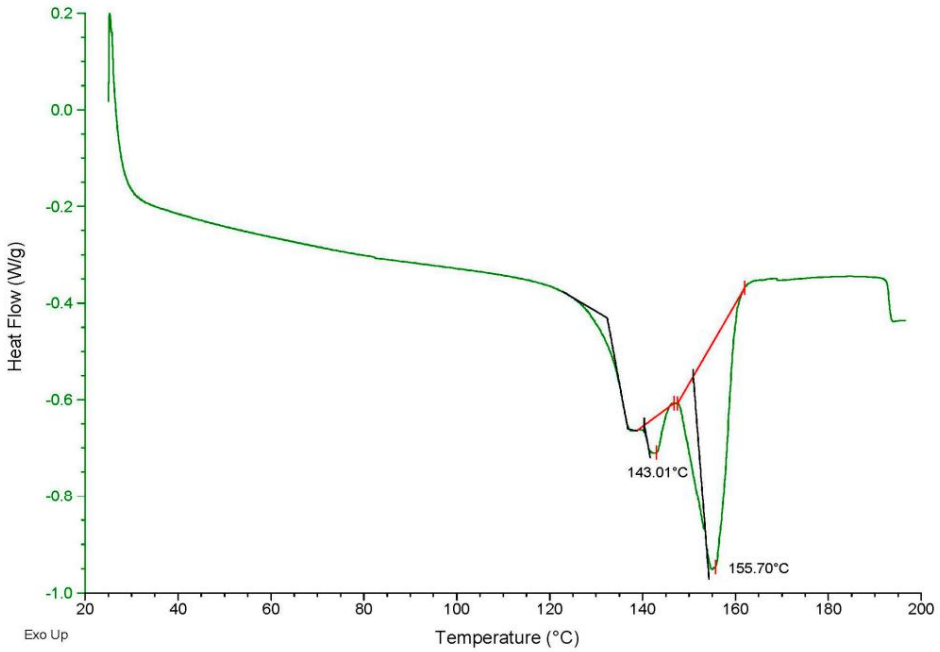


Figura 10. Termograma DSC de la muestra de PHBV sintetizada por B. megaterium LVN01 a partir de digestato de biogás (curva verde). La línea roja muestra los cambios de temperatura entre cada evento térmico. La línea negra corresponde a la transición vítrea.

Los autores Abbasi et al. [39] indican que la presencia de fenómenos de isomorfismo puede conducir a la presencia de dos picos de fusión [38-40]. Como el PHBV tiene una estructura semicristalina , los cristales con mayor contenido de HV tendrán una relación de fase amorfa más alta y, por lo tanto, se fundirán primero durante el calentamiento (Tm1). En cristales con menor contenido de HV, la relación de cristalinidad es mayor, por lo que los cristales se fundirán a una temperatura más alta (Tm2

El grado de cristalinidad Xcr (%) se calculó a partir de los valores registrados en el curva calorimétrica (DSC) usando la ecuación:

$$Xcr(\%) = 100 \times \frac{\Delta H\,f}{\Delta H\,f^{\circ}}$$

dónde:

ΔHf: Entalpía de fusión del PHB producido por B. megaterium LVN01; ΔHf: Entalpía de fusión del PHB puro, equivalente a 109 J g−1 [42].

Los cálculos asociados al evento más significativo arrojaron un Xcr = 18,17% para el PHBV obtenido bajo los parámetros operativos de esta investigación, el cual es inferior al obtenido para el biopolímero (PHB) sintetizado por la misma especie (B. megaterium LVN01) de glicerol residual, alcanzando Xcr = 35,7% [24]. Otros autores han informado valores de Xcr para PHB en el rango del 30% al 60% [43-45].

4. Discusión

Maximizar la producción de biopolímeros tipo PHA mediante la biofermentación microbiana de diferentes sustratos se ha convertido en un campo de investigación crucial ante la Creciente demanda de alternativas sustentables para la producción de plásticos. Esta bioindustria busca procesos amigables con el medio ambiente y económicamente viables que puedan competir con la industria de los plásticos derivados del petróleo [46]. El principal problema asociado con la eliminación comercial de bioplásticos son los altos costos de producción, a los que contribuyen significativamente las materias primas [20,46–48]. Ante esto, los investigadores han volcado su atención en la búsqueda de sustratos económicos y sostenibles, especialmente biomasa residual, que hagan viable un proceso industrial.

Machine Translated by Google

En esta investigación, aprovechar la capacidad de B. megaterium LVN01 para metabolizar diferentes sustratos a través de diferentes vías [12,24,49–52] se consideró importante en la evaluación del digestato de biogás, un subproducto de la digestión anaeróbica de los productos de desecho. de pesca artesanal. No ha sido explorado antes; o, al menos, todavía no se ha reportado en el mismo sentido que en esta investigación.

Nuestros resultados demuestran que el digestato de biogás, un sustrato de origen residual rico en ácidos grasos volátiles, es un excelente sustrato para el crecimiento de B. megaterium y la producción de bioplásticos tipo PHA. La dinámica del crecimiento celular (Figura 1), bajo las condiciones operativas de este trabajo, muestra la ventaja del digestato de biogás sobre el glicerol residual, otro sustrato evaluado en condiciones similares. Como se ha observado, la fase adaptativa de B. megaterium (LVN01) en el digestato dura 40 h, casi el doble del tiempo reportado (24 h) para la misma cepa microbiana en glicerol residual [50]. Normalmente, una vez que se alcanza la fase estacionaria tardía o la fase exponencial, el metabolismo microbiano de B. megaterium comienza a acumular PHA [53]. Sin embargo, la respuesta de acumulación puede variar según el tipo de sustrato [54]; cuando el sustrato es digerido, la eficiencia de acumulación de PHBV aumenta (360 mg PHBV L-1 en 16 h) en fases más tempranas. Esto se puede atribuir a las condiciones de estrés a las que está sometido [54], considerando que el digestato es un sustrato bastante complejo. El desempeño óptimo de B. megaterium (LVN01) en digestato ocurrió a las 16 h. Por el contrario, Gómez et al. demostró que B. megaterium (LVN01) en glicerol residual necesita 48 h para alcanzar un rendimiento de 137,5 g de PHB L-1 con un DCW de 58,1 mg de PHB gcell-1 ; pasado este tiempo, estos parámetros disminuyen drásticamente [49].

Se ha destacado que en el digestato los valores de DCW son mayores y las células bacterianas acumulan mayor cantidad de PHBV por gramo de biomasa en cortos periodos de tiempo. La excelente capacidad de almacenamiento del biopolímero es particularmente evidente después de las primeras 24 h de incubación y se mantiene en niveles relativamente altos hasta las 32 h (Figura 2). De acuerdo con lo reportado por otros autores, se infiere que la primera etapa de la fermentación es un período de adaptación inicial en el que las bacterias se multiplican y aumentan su biomasa antes de comenzar a sintetizar y acumular PHA de manera eficiente [53,55–57]. .

Los resultados apoyan la idea de que la cinética microbiana está fuertemente influenciada por la naturaleza química de la fuente de carbono. A diferencia del glicerol residual, el digestato es una mezcla compleja de compuestos orgánicos que incluye ácidos grasos y otros subproductos de la digestión anaeróbica de material orgánico. Esta complejidad podría significar que B. megaterium (LVN01) requiere más tiempo para adaptarse al medio y asimilar los nutrientes disponibles para crecer eficientemente, explicando así su cinética de crecimiento extendida. Además, en las primeras etapas de la fermentación, se observa un rápido crecimiento bacteriano (mayor DCW) antes de que las bacterias prioricen la síntesis de PHBV. Esta relación inversa (Figura 4) entre biomasa y producción de PHB sigue la tendencia reportada por otros autores para B. megaterium de otros sustratos [11,24,50,58].

En conclusión, la fase de latencia (fase adaptativa) juega un papel crucial en la fermentación, siendo importante para que el microorganismo active su metabolismo y aproveche al máximo los nutrientes del medio de cultivo. En sustratos complejos como el digestato, B. megaterium requiere largos tiempos de aclimatación antes de lograr un crecimiento óptimo, mientras que puede multiplicarse rápidamente en sustratos simples. Esta información es esencial para diseñar y optimizar procesos de fermentación ya que el tiempo de adaptación microbiana con respecto al sustrato puede afectar significativamente la productividad y eficiencia del proceso [21]. En esta investigación, B. megaterium pudo sintetizar y acumular PHBV durante las primeras horas del bioproceso (16 h-32 h), utilizando digestato de biogás como fuente de carbono, lo que resulta prometedor para una producción industrial eficiente. Mientras tanto, podría reducir la dependencia del petróleo, un recurso no renovable, y de fuentes de carbono costosas y menos sostenibles, como los cultivos agrícolas [59-63].

La caracterización química del biopolímero sintetizado por B. megaterium a partir de digestato de biogás se realizó mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (1H-NMR y 13C NMR).

Machine Translated by Google

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la capacidad de B. megaterium para producir PHBV a partir de diferentes sustratos mediante procesos de fermentación. El cromatograma (GC- MS) del extracto polimérico (Figura 5) se comparó con el del estándar comercial PHBV. En ambos casos, se observaron dos picos principales con tiempos de retención (RT) de 10,9 min y 14,6 min, identificados mediante la base de datos GC-MS como éster metílico del ácido 2-butenoico y éster metílico del ácido 3-hidroxibutírico, respectivamente, que son característica de monómero.

El pico de menor intensidad que apareció a los 14,1 min se atribuye al éster metílico del ácido 2-pentanoico, típico del monómero 3HV, identificado por el sistema de datos del equipo con una calidad del 97% (Figura S6). Estos se forman por metanólisis de 3HB, que da como resultado ésteres C4, y 3HV, que dan como resultado ésteres C4 y C5 [33]. Los ácidos 2-butenoico, 3-hidroxibutírico y 2-pentanoico también son subproductos de la degradación térmica del PHBV [64]. La información obtenida mediante GC-MS apoya la presencia predominante de ácido polihidroxibutírico y, en menores proporciones, de ácido polihidroxivalérico en los extractos de B. megateriu

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear nos permitió dilucidar la estructura química del biopolímero sintetizado por B. megaterium LVN01 bajo fermentación aeróbica tipo discontinuo con digestato de biogás de fuente de carbono. Los espectros de 1H-NMR (Figura 7) y 13C-NMR (Figura 8) de la muestra de PHBV purificada y el estándar puro fueron similares, mostrando siete señales típicas del copolímero de poli(3-hidroxibutirato-co-3 hidroxivalerato) entre 0,75 ppm y 5,50 ppm, que están asociados con los desplazamientos químicos (δ) de las subunidades 3HB (3-hidroxibutirato) y 3HV (3-hidroxivalrato) del copolímero PHBV

Las señales de H-NMR detectan la presencia de grupos funcionales característicos de ambas fracciones monoméricas (3HB y 3HV), es decir, δ = 5,356–5,363 ppm (a y a'), respecto de los protones del grupo metino (-CH), y δ = 2,57–2,59 ppm y δ = 2,69–2,73 ppm (b y b'), correspondientes a los protones del grupo metileno (CH2). En particular, la subunidad 3HB presenta un δ = 1,25-1,26 ppm, perteneciente al grupo metilo (CH3) (c). Por otro lado, 3HV da lugar a desplazamientos en δ = 1,73–1,78 ppm (d) y δ = 1,0 ppm (e), que permiten inferir la resonancia de los protones metileno (d) y metilo (e) en la cadena lateral (etilo).
Estos últimos desplazamientos marcan la diferencia entre los monómeros (HV y HB) y confirman la presencia de PHBV. Los hallazgos de esta investigación coinciden con los informados por otros autores para el copolímero PHBV [39,65–70].

Los resultados del análisis de 13C-NMR son consistentes con los de 1H-NMR (Figura 7). El espectro de 13C-NMR presenta señales que identifican los átomos de carbono no equivalentes en cada monómero. Para HB, se observaron cambios de carbono a 19,65 ppm, 40,68 ppm y 67,52 ppm, correspondientes a los grupos metilo (–CH3), metileno (–CH2–) y éster (–O–CH–), respectivamente. Particularmente para HV, las señales de los dos grupos metileno (–CH2–) se observaron a 26,74 ppm y 30,82 ppm. En este monómero, el pico correspondiente al grupo éster (–O–CH–) desplazó a 71,90 ppm. Finalmente, se presenta una resonancia de 169,14 ppm de los átomos de carbono del grupo carbonilo (–C–) para ambos monómero Estos datos coinciden con los reportados por otros investigadores [38,39,56,69] y permiten determinar la presencia del copolímero PHBV en el extracto polimérico de B. megaterium.

La caracterización química del biopolímero de B. megaterium es consistente con las características derivadas del análisis de las propiedades térmicas del biopolímero mediante TGA (Figura 9) y DSC (Figura 10). Los valores de las propiedades térmicas (Tm = 153 ◦C y Td = 290,14 ◦C) del PHBV producido por B. megaterium a partir del digestato de biogás se encuentran dentro del rango de los valores medidos por Wang et al. [71], quienes analizaron tres PHA sintetizados por Ralstonia eutropha a partir de ácido levulínico. Los investigadores encontraron temperaturas de fusión (Tm) de 101,93 ◦C, 150,18 ◦C y 172,05 ◦C, así como temperaturas de descomposición térmica (Td) de 284,4 ◦C, 298,3 ◦C y 263,4 ◦C, para el PHB con 0%. , 0,16% y 53% HV, respectivamente [6 Sin embargo, el porcentaje de cristalinidad (%Xcr) = 18 del PHBV en estudio difirió marcadamente de los reportados para PHB con 0% (%Xcr = 61.44%), 0.16% (%Xcr = 50.34%), y HV 53% (%Xcr = 51,92%). Sin embargo, con respecto a este parámetro, los resultados de esta investigación también son comparables con los de Abbasi et al., quienes, para una serie de PHBV producidos por fermentación, informaron valores de Xcr vía DSC entre 16,6% y 29% [39]. En

Machine Translated by Google

Según su investigación, el PHBV con el contenido más bajo de 3HV (0,16) registró el Xcr más alto (29%). A partir de su estudio, Abbasi et al. [39] y otros investigadores [71] concluyeron que el grado de cristalinidad y el punto de fusión del biopolímero disminuyen con el contenido de HV en el polímero, lo que potencialmente resulta en una mejora en la ductilidad y flexibilidad del polímero.

El biopolímero producido en esta investigación presenta propiedades termodinámicas que lo diferencian de la estructura PHB y lo acercan a la línea PHBV. En este contexto, es relevante señalar que según la literatura, cuando se produce un copolímero como el PHBV, tiene un punto de fusión más bajo y una mayor flexibilidad en comparación con el homopolímero de PHB [72]. La menor cristalinidad y el menor punto de fusión del PHBV de B. megaterium sugieren un porcentaje apreciable de HV con un orden estructural más flexible.

Esto se alinea con la caracterización de los biopolímeros de cadena corta, que se sabe que tienen menor cristalinidad y puntos de fusión más bajos, clasificándolos como elastómeros y proporcionándoles una capacidad de alargamiento de rotura superior al 100% [73,74].

En este estudio, B. megaterium LVN01 demostró su capacidad eficiente para producir PHBV a partir de digestato de biogás, un sustrato rico en ácidos grasos volátiles, en tan solo un período de fermentación de 16 a 24 h. Esto es prometedor para la producción industrial de biopolímeros ya que el PHBV no sólo tiene características físicas apropiadas para su uso en diferentes campos industriales sino que también tiene un alto grado de biodegradabilidad, lo que lo hace muy atractivo en la industria farmacéutica de biopolímeros.

Las características físicas del PHBV de B. megaterium están intrínsecamente relacionadas con las propiedades de biodegradación y la facilidad de descomposición de los PHA. Estos procesos de degradación están influenciados por la composición química específica del polímero y las condiciones ambientales circundantes. Se ha informado que la degradación de los objetos fabricados con PHA varía ampliamente, desde unos pocos meses en suelos con temperaturas estables hasta un par de años en ambientes marinos. Cabe señalar que ciertos tipos de PHA, como el poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), se ven notablemente afectados en su cristalinidad, lo que modula sus tasas de degradación [75].

El potencial del proceso de fermentación aeróbica con el sistema de B. megaterium utilizando digestato de biogás se ve reforzado por el uso de un sustrato económico para la producción de biopolímeros tipo PHA, específicamente PHBV. Las principales ventajas del uso del digestato radican en su disponibilidad y bajo costo, considerando que es un coproducto del proceso de producción de biogás a partir de biomasa residual de la industria pesquera artesanal en Tumaco, Colombia. Además de la ventaja económica, existen impactos ambientales y sociales positivos: primero, los digestados representan alternativas a los plásticos derivados del petróleo, que generan una contaminación significativa durante su fabricación y consumen un recurso no renovable; en segundo lugar, se aprovechan los desechos de pesca (vísceras de pescado) para producir biogás, y luego, a partir del efluente residual (digestato rico en ácidos grasos volátiles), se producen biopolímeros tipo PHA. Con este enfoque se evita la contaminación procedente de los desechos de la pesca, que muchas veces se vierten al mar. Todo esto se realiza en un ambiente de biorrefinería, contribuyendo a incrementar el valor agregado de la cadena productiva de la pesca artesanal en comunidades que viven en condiciones de vulnerabilidad, así como la bioeconomía circular de la producción de biogás.

En cuanto a la sustentabilidad del sustrato, es importante mencionar que la pesca artesanal en el Pacífico colombiano genera una abundante cantidad de desechos, representando una valiosa fuente de materia orgánica renovable para la producción eficiente de PHBV a través de la fermentación con B. megaterium. Por lo tanto, el costo de las materias primas para la producción de PHBV a gran escala podría reducirse significativamente, con importantes efectos en términos de economía y sostenibilidad ambiental.

5. Conclusiones

El digestato líquido, subproducto de la producción de biogás mediante la digestión anaeróbica de la biomasa residual de la industria pesquera artesanal, es un sustrato secundario renovable apto para el cultivo de la bacteria nativa colombiana B. megaterium LVN01 y

Machine Translated by Google

sintetizando biopolímeros tipo PHA, específicamente el copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV).

Bajo las condiciones operativas de esta investigación, el sistema de digestato de B. megaterium produce cantidades apreciables de PHBV en tan sólo 16 h, con productividades de PHBV de 360 mg/L·h, lo que agrega valor adicional a los residuos de pesca (vísceras de pescado). En el marco de la economía circular, esto podría fortalecer la bioindustria del biogás y brindar valor agregado a la cadena productiva de la pesca artesanal en Colombia. Los análisis realizados en el copolímero PHBV demuestran que es un polímero flexible y termoestable Combinado con su naturaleza biodegradable, esto sugiere su utilidad potencial en una amplia variedad de aplicaciones industriales. Sin embargo, se requieren más investigaciones para definir los porcentajes de participación del monómero HV en la estructura polimérica del PHBV, así como investigaciones complementarias para establecer operaciones óptimas del bioproceso.

Materiales complementarios: la siguiente información de respaldo se puede descargar en https://www. mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol4030072/s1: Figura S1: Tinción de Gram de Bacillus megaterium incubado en caldo Luria Bertani durante 24 h; Figura S2: Observación de esporas teñidas de muestras de Bacillus megaterium de tipo salvaje cultivadas en agar nutritivo en condiciones de estrés (44 ◦C) con un aumento de 100 × ; Figura S3: Observación bajo microscopio de fluorescencia (λ = 510–560 nm) del crecimiento de Bacillus megaterium de tipo salvaje adaptado al digestato del tanque homogéneo de la planta de biogás en Tumaco. A.
Crecimiento en agar Rojo Nilo B. Tinción con Azul Nilo; Figura S4: Experimentos a escala de laboratorio para el crecimiento de B. megaterium en digestato en las siguientes condiciones: pH 7,0, temperatura: 30,8 ◦C, agitación a 200 rpm y tres condiciones de relación digestato: MMS 100:0, 80:20, 50 :50; Figura S5: Curva de crecimiento a escala de laboratorio de B. megaterium LVN01 en digestato de biogás, condiciones operativas: 10 ml, 200 rpm, 30,8 ◦C, pH 7,0; Figura S6: Espectro de masas de corriente iónica reconstruido para PHBV obtenido de la fermentación de Bacillus megaterium LVN01 en digestato; Tabla S1: Composición del digestato líquido residual reportada por el grupo de investigación “Prospectiva Ambiental” de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, ALMM, MY-P., KACC y PEZM; curación de datos, ALMM, MY-P., KACC y PEZM; laboratorio, ALMM, MY-P., KACC y PEZM; metodología, ALMM, MY-P., KACC y PEZM; administración de proyectos, ALMM, MY-P. y KACC; recursos, ALMM y MY-P.; supervisión, ALMM y MY-P.; validación, ALMM, MY-P., KACC y PEZM; visualización, ALMM, MY-P. y KACC; redacción: borrador original, ALMM, MY-P. y KACC; redacción: revisión y edición, ALMM, MY-P., KACC y PEZM Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Universidad Nacional de Colombia: Fortalecimiento de la actividad pesquera artesanal en el Pacífico Nariñense colombiano hacia un uso sustentable del recurso. Tumaco, Código Hermes: 49521, BPIN: 2020000100068, Sistema General de Regalías (SGR).

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: No aplicable.

Declaración de Consentimiento Informado: No aplicable.

Declaración de disponibilidad de datos: los datos están contenidos en el artículo y en los materiales complementarios.

Agradecimientos: Los autores expresan su agradecimiento al Sistema General de Regalías por su apoyo financiero a través del proyecto BPIN 2020000100068. Además, agradecen a los directores del Laboratorio de Análisis Químicos y Procesos Ambientales, del Laboratorio de Venenos Naturales y del Laboratorio de Procesos Biológicos de a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, por su colaboración y apoyo con infraestructura física, equipos y, en algunos casos, reactivos esenciales para la realización de los ensayos experimentales. También se agradece al Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Nacional de Colombia campus Palmira, específicamente a Luz Stella Cadavid Rodríguez por proporcionar las muestras de digestato para esta investigación, y a Elena Stashenko, directora del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Nacional de Colombia. Universidad Industrial de Santander, por su apoyo en el análisis de las muestras de PHA.

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Machine Translated by Google

Referencias

1. Jaso Sánchez, MA El surgimiento de los bioplásticos: Un estudio de nichos tecnológicos. Acta Univ. 2020, 30, 1–24. 2.
Plastics Europe, Haciendo posible un futuro sostenible. Plásticos: datos importantes. Infografía. 2023. Disponible en línea: https://plasticseurope. org/es/plastics-europe-publica-plastics-the-fast-facts-2023/ (consultado el 20 de marzo de 2024).
3. Saratale, RG; Cho, SK; Saratale, GD; Kadam, AA; Ghodake, GS; Kumar, M.; Bh Bharagava, RN; Kumar, G.; Kim, DS; Mulla, SI; et al. Una descripción general completa y avances recientes en la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando diversos flujos de desechos orgánicos. Biorrecurso. Tecnología. 2021, 325, 124685.
4. Sohn, YJ; Kim, HT; Baritugo, KA; Jo, SY; Canción, HM; Park, Sídney; Parque, SK; Pyo, J.; Cha, HG; Kim, H.; et al. Avances recientes en el reciclaje sostenible de plásticos y biopolímeros. Biotecnología. J. 2020, 15, 1900489. [CrossRef] [PubMed]
5. Organización de las Naciones Unidas. Todo lo que necesitas saber sobre la contaminación por plásticos. ONU programa para el medio ambiente. Disponible en línea : https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-contaminacion-por-plasticos (consultado el 25 de abril de 2023).
6. Grigore, YO; Grigorescu, RM; Iancu, L.; Ión, RM; Zaharia, C.; Andrei, ER Métodos de síntesis, propiedades y aplicaciones biomédicas de polihidroxialcanoatos: una revisión. J. Biomater. Ciencia. Polimero. Ed. 2019, 30, 695–712. [Referencia cruzada] [PubMed]
7. Madhumitha Jaganmohan. Disponible en línea: https://www.statista.com/aboutus/our-research-commitment/2234/madhumitha-jaganmohan (consultado el 20 de marzo de 2024).
8. Anjum, A.; Zuber, M.; Zia, KM; Noreen, A.; Anjum, Minnesota; Tabasum, S. Producción microbiana de polihidroxialcanoatos (PHA) y sus copolímeros: una revisión de los avances recientes. En t. J. Biol. Macromol. 2016, 89, 161-174. [Referencia cruzada] [PubMed]
9. Kaniuk, Ł.; Stachewicz, U. Desarrollo y ventajas de polímeros de PHA biodegradables basados en fibras de PHBV electrohiladas para ingeniería de tejidos y otras aplicaciones biomédicas. ACS Biomater. Ciencia. Ing. 2021, 7, 5339–5362. [Referencia cruzada]
10. Koller, M. Producción de biopoliésteres de polihidroxialcanoato (PHA) por extremófilos. Polimero del Ministerio de Justicia. Ciencia. 2017, 1, 1–19. [Referencia cruzada]
11. Cal, AJ; Kibblewhite, RE; Sikkema, WD; Torres, LF; Hart-Cooper, WM; Orts, WJ; Lee, CC Producción de copolímeros de polihidroxialcanoato que contienen 4-hidroxibutirato en Bacillus megaterium diseñado. En t. J. Biol. Macromol. 2021, 168, 86–92. [Referencia cruzada] [PubMed]
12. Sánchez Moreno, SA; Marín Montoya, MA; Mora Martínez, AL; Yepes Pérez, MDS Identificación de polihidroxialcanoato-produciendo bacterias en suelos contaminados con desechos de fique. Rev. Colomb. De Biotecnol. 2012, 14, 89-100.
13. Dhangdhariya, JH; Dubey, S.; Trivedi, HB; Pancha, I.; Bhatt, JK; Dave, BP; Mishra, S. Polihidroxialcanoato de Bacillus megaterium marino utilizando Dry Sea Mix de CSMCRI como nuevo medio de crecimiento. En t. J. Biol. Macromol. 2015, 76, 254–261. [Referencia cruzada] [PubMed]
14. Kumar, P.; Rayo, S.; Kalia, VC Producción de copolímeros de polihidroxialcanoatos mediante la regulación de la hidrólisis de residuos biológicos. Biorrecurso. Tecnología. 2016, 200, 413–419. [Referencia cruzada] [PubMed]
15. Munir, S.; Jamil, N. Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) en cocultivo bacteriano utilizando glucosa y ácidos grasos volátiles como fuente de carbono. J. Microbiol básico. 2018, 58, 247–254. [Referencia cruzada] [PubMed]
16. Yun, JH; Sawant, SS; Kim, BS Producción de polihidroxialcanoatos por Ralstonia eutropha a partir de ácidos grasos volátiles. Corea J. Química. Ing. 2013, 30, 2223–2227. [Referencia cruzada]
17. Martínez, GA; Bertín, L.; Scoma, A.; Rebecchi, S.; Braunegg, G.; Fava, F. Producción de polihidroxialcanoatos a partir de aguas residuales de almazara desfenolizadas y fermentadas mediante el empleo de un cultivo puro de Cupriavidus necator. Bioquímica. Ing. J. 2015, 97, 92-100. [Referencia cruzada]
18. Ferré-Güell, A.; Winterburn, J. Mayor producción de polihidroxialcanoatos con composición controlable y consistente. propiedades del material mediante fermentación por lotes alimentados. Bioquímica. Ing. J. 2019, 141, 35–42. [Referencia cruzada]
19. Hermann-Krauss, C.; Koller, M.; Muhr, A.; Fasl, H.; Stelzer, F.; Braunegg, G. Producción arqueológica de copoliésteres y terpoliésteres de polihidroxialcanoato (PHA) a partir de subproductos derivados de la industria del biodiesel. Archaea 2013, 2013, 129268. [CrossRef] [PubMed]
20. Sirohi, R.; Pandey, JP; Gaur, VK; Gnansounou, E.; Sindhu, R. Descripción crítica de las materias primas de biomasa como sustratos sostenibles para la producción de polihidroxibutirato (PHB). Biorrecurso. Tecnología. 2020, 311, 123536. [Referencia cruzada] [PubMed]
21. Vu, DH; Wainaina, S.; Taherzadeh, MJ; Åkesson, D.; Ferreira, JA Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por Bacillus megaterium utilizando ácidos grasos volátiles derivados de fermentación acidogénica de residuos de alimentos. Bioingeniería 2021, 12, 2480–2498. [Referencia cruzada]
22. Kleerebezem, R.; Joosse, B.; Rozendal, R.; Van Loosdrecht, MC ¿Digestión anaeróbica sin biogás? Rev. Medio Ambiente. Ciencia. Bio/Tecnología. 2015, 14, 787–801. [Referencia cruzada]
23. Cadavid-Rodríguez, LS; Castro-López, VE; Placido, J. Evaluación de condiciones óptimas de fermentación para la producción de ácidos grasos volátiles a partir de desechos de pescado artesanal. Res. Cuadrados. 2020. [Referencia cruzada]
24. Gómez-Cardozo, JR; Velasco-Bucheli, R.; Marín-Pareja, N.; Ruíz-Villadiego, OS; Correa-Londoño, GA; Mora Martínez, AL Producción por lotes alimentados y caracterización de polihidroxibutirato por Bacillus megaterium LVN01 a partir de glicerol residual. Dyna 2020, 87, 111–120. [Referencia cruzada]
25. Salazar, A. Parámetros Operacionales Óptimos Para La Producción de Bioplásticos a Partir de Fuentes Renovables Azucaradas; universidad Nacional de Colombia: Medellín, Colombia, 2011.
26. Rai, Alaska; Swapna, HC; Bhaskar, N.; Halami, PM; Sachindra, NM Efecto del ensilado por fermentación en la recuperación de aceite de Vísceras de peces de agua dulce. Enzima. Microbio. Tecnología. 2010, 46, 9-13. [Referencia cruzada]
27. López-Jácome, LE; Hernández-Durán, M.; Colín-Castro, CA; Ortega-Peña, S.; Cerón-González, G.; Franco-Cendejas, R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigando. En Discápac. 2014, 3, 10-18.

Machine Translated by Google

28. Tinción de Esporas: Fundamento, Técnicas y Usos. Salvavidas. Disponible en línea: https://www.lifeder.com/tincion-de-esporas/ (consultado el 18 de enero de 2024).
29. Pérez, R.; Juárez, M.; Rodríguez, LP Manual de Laboratorio de Técnicas Microbiológicas; Departamento de Ciencias Básicas Academia de Microbiología. Instituto Politécnico Nacional: Pereira, Colombia, 2011.
30. Spiekermann, P.; Rehm, BH; Kalscheuer, R.; Baumeister, D.; Steinbüchel, A. Un método de tinción de colonias viables y sensible que utiliza rojo del Nilo para la detección directa de bacterias que acumulan ácidos polihidroxialcanoicos y otros compuestos de almacenamiento de lípidos. Arco. Microbiol. 1999, 171, 73–80. [Referencia cruzada] [PubMed]
31. Ostle, AG; Holt, JG Nilo azul A como tinte fluorescente para poli-beta-hidroxibutirato. Aplica. Reinar. Microbiol. 1982, 44, 238–241. [Referencia cruzada]
32. ISO 12966-2:2017; Grasas y aceites animales y vegetales. Cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos. Parte 2: Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos. Organización Internacional de Normalización: Ginebra, Suiza, 2017.
33. Pradhan, S.; Dikshit, PK; Moholkar, VS Producción, caracterización y aplicaciones de polímero biodegradable: Polihidroxialcanoatos. En Avances en Polímeros Sostenibles: Síntesis, Fabricación y Caracterización; Springer: Singapur, 2020; págs. 51–94.
34. Liu, J.; Zhao, Y.; Diao, M.; Wang, W.; Hua, W.; Wu, S.; Chen, P.; Ruán, R.; Cheng, Y. Producción de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por Rhodospirillum rubrum utilizando una estrategia de cultivo de dos pasos. J. química. 2019, 2019, 8369179. [Referencia cruzada]
35. Jakiˇc, M.; Vrandeˇciˇc, NS; Erceg, M. Degradación térmica de mezclas de poli (3-hidroxibutirato) / poli (óxido de etileno): Termo-Análisis gravimétricos y cinéticos. EUR. Polimero. J. 2016, 81, 376–385. [Referencia cruzada]
36. Vahabi, H.; Michely, L.; Moradkhani, G.; Akbari, V.; Cochez, M.; Vagner, C.; Renard, E.; Saeb, señor; Langlois, V. Estabilidad térmica y comportamiento de inflamabilidad de compuestos a base de poli (3-hidroxibutirato) (PHB). Materiales 2019, 12, 2239. [CrossRef]
37. Thiré, RM; Arruda, LC; Barreto, LS Morfología y propiedades térmicas de nanocompuestos de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)/atapulgita. Madre. Res. 2011, 14, 340–344. [Referencia cruzada]
38. Abbasi, M.; Abrigos, emergencias; McDonald, AG Extracción con solvente verde y caracterización de las propiedades del poli (3-hidroxibutirato-co- 3-hidroxivalerato) biosintetizado por consorcios microbianos mixtos alimentados con estiércol lácteo fermentado. Biorrecurso. Tecnología. Rep. 2022, 28, 101065. [CrossRef]
39. Abbasi, M.; Pokhrel, D.; Abrigos, emergencias; Guho, Nuevo México; McDonald, AG Efecto del contenido de 3-hidroxivalerato sobre las propiedades térmicas, mecánicas y reológicas de los biopolímeros de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) producidos a partir de estiércol lácteo fermentado. Polímeros 2022, 14, 4140. [CrossRef]
40. Guho, Nuevo México; Pokhrel, D.; Abbasi, M.; McDonald, AG; Alfaro, M.; Brinkman, CK; Coats, ER Producción a escala piloto de poli- 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato a partir de estiércol lácteo fermentado: rendimiento del proceso, caracterización de polímeros e implicaciones de ampliación. Biorrecurso. Tecnología. Rep. 2020, 12, 100588. [CrossRef]
41. Souza Júnior, OF; Staffa, LH; Costa, LC; Chinelatto, MA Comportamiento térmico y reológico de mezclas binarias de poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) y poli (etileno-co-acetato de vinilo) con diferente contenido de acetato de vinilo. Macromol. Síntoma. 2019, 383, 1800020. [Referencia cruzada]
42. Chan, CH; Kummerlöwe, C.; Kammer, HW Cristalización y comportamiento de fusión de mezclas a base de poli (3-hidroxibutirato). Macromol. Química. Física. 2004, 205, 664–675. [Referencia cruzada]
43. Bora, L.; Das, R.; Gohain, D. Un nuevo biopolímero (polihidroxialcanoatos) estable en estado fundido y de alta resistencia a la tracción de Bacillus megaterio (MTCC10086) y su caracterización. J. Microbiol básico. 2014, 54, 1012–1016. [Referencia cruzada]
44. Castillo, D. Efecto del gen fadH1 en la Producción de PHA Contenido Monómeros Insaturados por Pseudomona Putida; Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá, Colombia, 2008.
45. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Síntesis, estructura y propiedades de los polihidroxialcanoatos: poliésteres biológicos. Prog. Polimero. Ciencia. 2000, 25, 1503–1555. [Referencia cruzada]
46. Wang, J.; Liu, S.; Huang, J.; Qu, Z. Una revisión sobre la producción de polihidroxialcanoato a partir de residuos agrícolas Biomasa: Desarrollo, Avances, Enfoque circular y desafíos. Biorrecurso. Tecnología. 2021, 342, 126008. [Referencia cruzada] [PubMed]
47. Kosseva, señor; Rusbandi, E. Tendencias en la biofabricación de polihidroxialcanoatos con especial atención al procesamiento posterior. En t. J. Biol. Macromol. 2018, 107, 762–778. [Referencia cruzada] [PubMed]
48. Canción, J.; Murphy, R.; Narayán, R.; Davies, G. Alternativas biodegradables y compostables a los plásticos convencionales. Filos. Trans. R. Soc. B Biol. Ciencia. 2009, 364, 2127–2139. [Referencia cruzada] [PubMed]
49. Gómez Cardozo, JR; Velasco-Bucheli, R.; Del Cerro, C.; Mata, IDL; Mora Martínez, AL Ingeniería de Bacillus megaterium para mejorar la producción de PHA a partir de glicerol. Asia Pacífico. J. Mol. Biol. Biotecnología. 2019, 27, 64–72.
50. Gómez Cardozo, JR; Mora Martínez, AL; Yepes Pérez, M.; Correa Londoño, GA Producción y caracterización de polihidroxialcanoatos y microorganismos nativos sintetizados a partir de desechos grasos. En t. J. Polim. Ciencia. 2016, 2016, 6541718. [Referencia cruzada]
51. Salazar, A.; Yepes, M.; Correa, G.; Mora, A. Producción de polihidroxialcanoato a partir de sustratos de azúcar inexplorados. Dina 2014, 81, 73–77. [Referencia cruzada]
52. Cardona, AC; Mora, AL; Marín, M. Identificación molecular de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos en subproductos de lácteos y caña de azúcar. Rev. Fac. Nac. De Agrón. Medellín 2013, 66, 7129–7140.
53. Salgaonkar, BB; Mani, K.; Braganca, JM Caracterización de polihidroxialcanoatos acumulados por una sustancia moderadamente halófila aislado de salina Bacillus megaterium cepa H16. J. Aplica. Microbiol. 2013, 114, 1347–1356. [Referencia cruzada]

Machine Translated by Google

54. Alkotaini, B.; Sathiyamoorthi, E.; Kim, BS Potencial de Bacillus megaterium para la producción de polihidroxialcanoatos utilizando el alga roja Gelidium amansii. Biotecnología. Ing. Bioprocesos. 2015, 20, 856–860. [Referencia cruzada]
55. Winnacker, M. Polihidroxialcanoatos: avances recientes en su síntesis y aplicaciones. EUR. J. Ciencia de los lípidos. Tecnología. 2019, 121, 1900101. [Referencia cruzada]
56. Chen, GQ; Jiang, XR; Guo, Y. Biología sintética de microbios que sintetizan polihidroxialcanoatos (PHA). Sintetizador. Sistema. Biotecnología. 2016, 1, 236–242. [Referencia cruzada]
57. Tian, P.; Shang, L.; Ren, H.; Mi, Y.; Fan, D.; Jiang, M. Biosíntesis de polihidroxialcanoatos: investigación y desarrollo actuales. África. J. Biotecnología. 2009, 8, 709–714.
58. Cavalheiro, JM; Raposo, RS; De Almeida, MCM; Cesario, MT; Sevrin, C.; Grandfils, C.; Da Fonseca, M. Efecto de los parámetros de cultivo en la producción de poli (3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) y poli (3-hidroxibutirato-4-hidroxibutirato- 3-hidroxivalerato) por Cupriavidus necator utilizando glicerol residual. Biorrecurso. Tecnología. 2012, 111, 391–397. [Referencia cruzada]
59. Mercado de polihidroxialcanoato (PHA) por tipo (longitud de cadena corta, longitud de cadena media), métodos de producción (fermentación de azúcar, fermentación de aceite vegetal), aplicación (envasado y servicios alimentarios biomédicos) y pronóstico regional global hasta 2028. Disponible en línea : https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html?gad_source=1&gclid=Cj0 KCQjwhtWvBhD9ARIsAOP0GogViHNhj3GJBVD8HaHD2hI_z9qSSB0dUmUTml rvudbLClu9nmLCIaAgzzEALw_wcB (consultado el 15 de mayo de 2024).
60. Kumar, M.; Rathour, R.; Singh, R.; Sol, Y.; Pandey, A.; Gnansounou, E.; Lin, KY; Tsang, CC; Thakur, IS Polihidrox-bacteriano yalkanoates: Oportunidades, desafíos y perspectivas. J. Limpio. Pinchar. 2020, 263, 121500. [Referencia cruzada]
61. Abd El-malek, F.; Khairy, H.; Farag, A.; Omar, S. La sostenibilidad de los bioplásticos microbianos, producción y aplicaciones. En t. J. Biol. Macromol. 2020, 157, 319–328. [Referencia cruzada]
62. Loizidou, M.; Moustakas, K.; Rehan, M.; Nizami, AS; Tabatabaei, M. Nuevos desarrollos en sistemas sostenibles de conversión de residuos en energía. Renovar. Sostener. Energía Rev. 2021, 151, 111581. [CrossRef]
63. Lambert, S.; Wagner, M. Desempeño ambiental de los plásticos biodegradables y de origen biológico: el camino por recorrer. Química. Soc. Rdo. 2017, 46, 6855–6871. [Referencia cruzada]
64. Xiang, H.; Wen, X.; Miu, X.; Li, Y.; Zhou, Z.; Zhu, M. Mecanismos de despolimerización térmica de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Prog. Nat. Ciencia. Madre. En t. 2016, 26, 58–64. [Referencia cruzada]
65. Miranda, fiscal del distrito; Marín, K.; Sundman, O.; Hedenström, M.; Quillaguamán, J.; Gorzsás, A.; Brosrom, M.; Carlborg, M.; Lundvist, J.; Romero-Soto LJonsson, LJ; et al. Producción y caracterización de poli(3-hidroxibutirato) de Halomonas boliviensis LC1 cultivado en hidrolizados de tallos de quinua. Fermentación 2023, 9, 556. [CrossRef]
66. Sirohi, R.; Pandey, JP; Tarafdar, A.; Agarwal, A.; Chaudhuri, SK; Sindhu, R. Un proceso ecológico ambientalmente sostenible para la utilización de granos de trigo dañados para la producción de poli-3-hidroxibutirato. Reinar. Tecnología. Innovación. 2021, 21, 101271. [Referencia cruzada]
67. Zhuikov, VA; Zhuikova, YV; Makhina, TK; Myshkina, VL; Rusakov, A.; Useinov, A.; Voinova, VV; Bonartseva, GA; Berlín, AA; Bonartsev, AP; et al. Caracterización comparativa de propiedades estructurales de películas de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) bajo degradación hidrolítica y enzimática: búsqueda de un punto de transición en el contenido de 3-hidroxivalerato. Polímeros 2020, 12, 728. [CrossRef]
68. Mohapatra, S.; Pattnaik, S.; Maity, S.; Sharma, S.; Akhtar, J.; Pati, S.; Samantaray, DP; Varma, A. Análisis comparativo de la producción de PHA por Bacillus megaterium OUAT 016 en fermentación sumergida y en estado sólido. Arabia J. Biol. Ciencia. 2020, 27, 1242–1250. [Referencia cruzada]
69. Han, J.; Hou, J.; Zhang, F.; Ai, G.; Li, M.; Cai, S.; Liu, H.; Wang, L.; Wang, Z.; Zhang, S.; et al. Múltiples vías de suministro de propionil coenzima A para la producción del poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) bioplástico en Haloferax mediterranei. Aplica. Reinar. Microbiol. 2013, 79, 2922–2931. [Referencia cruzada]
70. Cheng, HN; Biswas, A.; Bermellón, K.; Meléndez-Rodríguez, B.; Lagaron, JM Análisis de RMN y distribuciones de secuencias de tríadas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Polimero. Prueba. 2020, 90, 106754. [Referencia cruzada]
71. Wang, Y.; Chen, R.; Cai, J.; Liu, Z.; Zheng, Y.; Wang, H.; Li, Q.; Él, N. Biosíntesis y propiedades térmicas del PHBV producido. del ácido levulínico por Ralstonia eutropha. MÁS UNO 2013, 8, e60318. [Referencia cruzada] [PubMed]
72. Forni, D.; Abeja, G.; Kreuzer, M.; Wenk, C. Nuevos plásticos biodegradables en la nutrición de ovejas: efectos del pretratamiento con NaOH de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) sobre la digestibilidad in vivo y la desaparición in vitro (Rusitec). J.Anim. Física. Animación. Nutrición. 1999, 81, 41–50. [Referencia cruzada]
73. Elles Montero, AE; García Echeverry, CA Mezcla Sinérgica Entre Polihidroxibutirato (PHB) y Caucho Natural (Látex) para Obtenga un copolímero. Tesis de Licenciatura, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia, 2012.
74. Barham, P.; Keller, A.; Otún, E.; Holmes, P. Cristalización y morfología de un termoplástico bacteriano: poli-3-hidroxibutirato. J. Mater. Ciencia. 1984, 19, 2781–2794. [Referencia cruzada]
75. Gutiérrez, G.; Getzabeth, M. Producción de Poli-Hidroxialcanoatos por Bacterias del Género Bacillus de Origen Marino. maestría Tesis, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España, 2008.

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son únicamente de los autores y contribuyentes individuales y no de MDPI ni de los editores. MDPI y/o los editores renuncian a toda responsabilidad por cualquier daño a personas o propiedad que resulte de cualquier idea, método, instrucción o producto mencionado en el contenido.