



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO USANDO LACTOSUERO COMO MATERIA PRIMA**

**Catalina Álvarez Campuzano**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Departamento de Ingeniería Química  
Manizales, Colombia

2015





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **ANALYSIS OF THE POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION USING MILK WHEY AS FEEDSTOCK**

**Catalina Álvarez Campuzano**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Departamento de Ingeniería Química  
Manizales, Colombia

2015



# **Análisis de la producción de polihidroxitirato usando lactosuero como materia prima**

**Catalina Álvarez Campuzano**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ingeniería- Ingeniería Química**

Director:

Juan Carlos Higueta V, PhD

Línea de Investigación:

Ingeniería de Procesos Químicos y Biotecnológicos

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Departamento de Ingeniería Química  
Manizales, Colombia

2015



*“No debemos olvidar que no son las cosas las que aportan significado a un momento determinado, sino que es el momento el que aporta significado a las cosas”*

*Abraham Joshua Heschel*

*A mi madre, quien ha hecho todo para ayudarme a ser la mujer que soy.*

*A la música, por darme el valor de continuar aún en los momentos difíciles.*

*A César, por mostrarme que los retos son los que le hacen dar valor a cada día.*

*A Ángela Viviana Ruales, por mostrarme que donde menos te imaginas encuentras amigos para toda la vida.*



## **Agradecimientos**

Expreso mi gratitud al profesor Juan Carlos Higueta, por la guía, la paciencia y la motivación en los momentos de dificultad y por todas las oportunidades dadas durante estos años.

Gracias al programa de Jóvenes Investigadores 2013 de Colciencias por el apoyo durante la culminación de este programa.

A la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo mediante la convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados 2013-2015. Además, a la oficina de Proyectos Especiales por el apoyo para la participación en eventos internacionales.

Gracias al Instituto de Biotecnología y a todas las personas que trabajan allí, por la colaboración y soporte en las diferentes actividades.

Un agradecimiento especial a mis compañeros, Laura Vanessa Daza, Javier Mauricio Naranjo, Héctor Forero, Natalia Salgado, Diana L. Manrique, Valentina Aristizabal y a todos los integrantes del Grupo de Investigación en Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos. A Juan David Cardona por su apoyo y gran colaboración.

A mi familia por la paciencia y apoyo, a mis amigos y a la música por mostrarme que la vida es mucho más.



## Resumen

Este proyecto presenta el análisis de la producción de polihidroxibutirato (PHB) usando como materias primas el glicerol, lactosa y lactosuero. El glicerol y el lactosuero son residuos del sector agroindustrial colombiano, que se obtienen como resultado de la producción del biodiesel y del queso, respectivamente. La lactosa es un sustrato puro que se separa del lactosuero y luego se somete a un proceso de purificación. Inicialmente se presentó la aplicación del glicerol, que permite el control de condiciones necesarias para la producción de PHB usando *Bacillus megaterium* como microorganismo acumulador del biopolímero, obteniéndose porcentajes de acumulación de PHB intracelular del 62%. Posteriormente, se estudió el uso de la lactosa, obteniéndose un porcentaje de acumulación del 76% donde se confirmó que para lograr los mejores rendimientos era necesario el control del pH y aireación. Al examinar los procesos de pre-tratamiento de lactosuero, se lograron porcentajes de remoción de las proteínas del 85% y 95 % usando el pre-tratamiento básico y por ultrafiltración. Al usar el lactosuero ultrafiltrado y condiciones de fermentación controladas se logró un porcentaje de acumulación de PHB de 70%, demostrando que es posible producir PHB a partir de un lactosuero de características ácidas. Al realizar el análisis económico se encontró que el costo de producción del PHB usando lactosuero ultrafiltrado es de 3USD/Kg. Se propusieron alternativas como el uso de la pasta de microalgas de *Chlorella vulgaris* para la producción de PHB, bioetanol y lípidos. El análisis económico presentó costos de producción de 8,8 USD/ kg de PHB, 8,45 USD/L de bioetanol y 10,83 USD/L de lípidos. El análisis de producción de PHB usando lactosuero como materia prima, se presenta como una opción posible, que requiere mejoras tecnológicas para hacerlo completamente competitivo en el mercado de los plásticos convencionales.

**Palabras clave:** lactosuero, polihidroxibutirato, lactosa, glicerol, análisis tecno-económico.

## Abstract

This work presents the analysis of the polyhydroxybutyrate (PHB) production using as raw materials glycerol, lactose and milk whey. Glycerol and whey are wastes from colombian agribusiness, obtained as a result of the production of biodiesel and cheese, respectively. Lactose is a pure sugar separated from whey and then purified. Initially, the use of glycerol was analyzed. This substrate allowing the control of conditions for the PHB production, obtaining percentages of intracellular PHB accumulation of 62% using *Bacillus megaterium* as the PHB producing microorganism. Subsequently, lactose was used as substrate and a PHB accumulation rate of 76% was obtained. Furthermore, it was observed that in order to achieve the best PHB accumulation performance it was necessary to control the pH and aeration. Total protein was removed from whey as a pre-treatment process with removal values of 85% and 95%, using the basic pre-treatment process (physical and chemical operations) and ultrafiltration, respectively. A PHB accumulation of 70% was achieved using the ultrafiltration pretreatment method and controlled conditions of fermentation thus demonstrating that the production of PHB from acid whey was possible. The production cost of PHB using ultrafiltrated whey was 3 USD/Kg. The *Chlorella vulgaris* cake was proposed as an alternative for the PHB, bioethanol and lipids production. The economic analysis showed production costs of \$ 8.8 USD/kg for PHB, \$ 8.45 USD/L for bioethanol and \$ 10.83 USD/L for lipids from the microalgae cake cultured in milk whey. The PHB production analysis using whey as raw material appears as a possible option, which requires technology improvements to make it fully competitive in the market of conventional plastics.

**Keywords:** Milk whey, polyhydroxybutyrate, lactose, glycerol, Techno-economic analysis.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>4</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Capítulo 1: Los biopolímeros</b> .....	<b>7</b>
1.1 Resumen .....	7
1.2 Introducción .....	7
1.2.1 Almidón .....	9
1.2.2 PLA .....	12
1.2.3 PHA .....	15
1.3 Conclusiones .....	19
<b>2. Capítulo 2: Producción de PHB a partir de Glicerol</b> .....	<b>21</b>
2.1 Resumen .....	21
2.2 Introducción .....	21
2.3 Materiales y Métodos.....	24
2.3.1 Cepas Bacterianas .....	24
2.3.2 Medio de cultivo .....	24
2.3.3 Cultivos por lotes.....	25
2.3.4 Métodos Analíticos .....	25
2.4 Resultados y Discusión.....	28
2.5 Conclusiones .....	32
<b>3. Capítulo 3. Aplicación de un sustrato alternativo: Lactosa</b> .....	<b>35</b>

3.1	Resumen.....	35
3.2	Introducción.....	35
3.3	Materiales y métodos .....	38
3.3.1	Diseño experimental .....	38
3.3.2	Análisis estadístico .....	39
3.3.3	Fermentaciones.....	39
3.4	Análisis de resultados.....	41
3.4.1	Concentración de PHB .....	42
3.4.2	Concentración de Biomasa .....	43
3.5	Conclusiones.....	46
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4: Producción de PHB usando Lactosuero como materia prima .....</b>	<b>47</b>
4.1	Resumen.....	47
4.2	Introducción.....	47
4.3	Materiales y Métodos .....	50
4.3.1	Métodos de Pre-tratamiento.....	50
4.3.2	Fermentaciones.....	53
4.4	Resultados y discusión.....	56
4.4.1	Remoción de la proteína por los métodos de pre-tratamiento .....	56
4.4.2	Fermentaciones y producción de PHB.....	57
4.4.3	Consumo de Sustrato .....	59
4.5	Conclusiones.....	60
<b>5.</b>	<b>Capítulo 5: Análisis tecno-económico de la producción de PHB.....</b>	<b>63</b>
5.1	Resumen.....	63
5.2	Introducción.....	63
5.2.1	Pre-tratamiento de materia prima y acondicionamiento .....	64
5.2.2	Fermentación.....	64
5.2.3	Extracción y separación.....	64
5.2.4	Simulación .....	65
5.3	Descripción de los procesos.....	66
5.3.1	Producción de PHB por fermentación de lactosuero .....	66
5.3.2	Extracción de Lípidos.....	68
5.3.3	Producción de PHB a partir de pasta de microalgas .....	68
5.3.4	Producción de etanol a partir de pasta de microalgas.....	68
5.4	Resultados y Discusión .....	70
5.5	Conclusiones.....	75
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>77</b>
6.1	Conclusiones.....	77
6.2	Recomendaciones.....	78
	<b>Referencias .....</b>	<b>81</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1.</b> Estructura de la amilosa y amilopectina [40].	10
<b>Figura 1-2.</b> Estructura del ácido poliláctico [48].	13
<b>Figura 1-3.</b> Estructura de un poliéster [52].	15
<b>Figura 1-4.</b> Imagen representativa de una bacteria productora de PHA, donde la bacteria aparece en gris y las vesículas de PHA aparecen en blanco [51].	16
<b>Figura 1-5.</b> Cadena de valor del PHA [37].	17
<b>Figura 1-6.</b> Demanda mundial de biopolímeros [33].	17
<b>Figura 2-1.</b> Perfil experimental de PHB, biomasa total y nitrógeno en una fermentación por lotes de <i>B. megaterium</i> con glicerol como fuente de carbono.	29
<b>Figura 2-2.</b> Perfil experimental de consumo de glicerol en una fermentación por lotes de <i>B. megaterium</i> .	30
<b>Figura 3-1.</b> Estructura $\alpha$ y $\beta$ de la lactosa [79].	36
<b>Figura 4-1.</b> Esquema de pre-tratamiento de lactosuero usando procesos físicos y químicos.	52
<b>Figura 4-2.</b> Pre-tratamiento del lactosuero usando ultrafiltración.	53
<b>Figura 4-3.</b> Consumo de sustrato en las fermentaciones con <i>B. megaterium</i> usando los dos tipos de pre-tratamiento.	60
<b>Figura 5-1.</b> Diagrama de flujo del proceso de producción de PHB usando lactosuero como materia prima.	67
<b>Figura 5-2.</b> Diagrama de flujo del proceso de producción de PHB usando pasta de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> crecida en lactosuero como materia prima.	69
<b>Figura 5-3.</b> Diagrama de flujo del proceso de producción de etanol usando pasta de microalga <i>C. vulgaris</i> crecida en lactosuero como materia prima.	69
<b>Figura 5-4.</b> Comparación del impacto ambiental de la producción PHB, etanol y lípidos de la pasta de microalgas <i>C. vulgaris</i> con la producción de PHB de lactosuero ultrafiltrado.	74

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Categorías de los bioplásticos [33].	8
<b>Tabla 1-2.</b> Principales productores de biopolímeros de almidón [42].	12
<b>Tabla 1-3.</b> Principales productores de PLA [49].	14
<b>Tabla 1-4.</b> Principales empresas de producción de PHA [42].	18
<b>Tabla 2-1.</b> Plantas de producción de Biodiesel en Colombia [63].	23
<b>Tabla 2-2.</b> Datos experimentales de la fermentación por lotes de <i>B. megaterium</i> usando glicerol como fuente de carbono.	28
<b>Tabla 2-3.</b> Tiempo de generación y velocidad máxima de crecimiento del <i>B. megaterium</i> en glicerol.	30
<b>Tabla 2-4.</b> Comparación de la producción de PHB usando glicerol o glucosa como fuente de carbono [42].	32
<b>Tabla 3-1.</b> Concentración promedio (%) de lactosa y cenizas en la leche de algunos mamíferos [76].	36
<b>Tabla 3-2.</b> Valores de las variables independientes de la producción de PHB y su respectivo nivel en el diseño experimental, alfa: 1.41421.	39
<b>Tabla 3-3.</b> Resultados obtenidos en los experimentos sin aireación constante ni control de pH.	41
<b>Tabla 3-4.</b> Resultados análisis de varianza para la producción de PHB con el ajuste cuadrático.	42
<b>Tabla 3-5.</b> Análisis de la viabilidad del uso de algunos modelos para el ajuste de los datos experimentales para la producción de PHB.	42
<b>Tabla 3-6.</b> Resultados análisis de varianza para la producción de PHB con el ajuste 2FI.	43
<b>Tabla 3-7.</b> Análisis de varianza para la concentración de biomasa con el ajuste cuadrático.	44
<b>Tabla 3-8.</b> Análisis de la viabilidad del uso de algunos modelos para el ajuste de los datos experimentales para la producción de biomasa.	44
<b>Tabla 3-9.</b> Análisis de varianza para la concentración de biomasa usando el ajuste 2FI.	44
<b>Tabla 3-10.</b> Resultados obtenidos de PHB y biomasa en condiciones controladas de aireación y pH.	45
<b>Tabla 4-1.</b> Composición de un lactosuero típico ácido y dulce [11].	49
<b>Tabla 4-2.</b> Proteína de lactosuero medida por el método de Bradford y Kjeldahl.	56
<b>Tabla 4-3.</b> Producción de PHB y porcentaje de acumulación de acuerdo con el método de pre-tratamiento.	57

---

<b>Tabla 5-1.</b> Balances de materia y energía de la producción de PHB, etanol y lípidos de la pasta de microalgas <i>C. vulgaris</i> y la producción de PHB de lactosuero.....	70
<b>Tabla 5-2.</b> Evaluación económica de la producción de PHB, etanol y lípidos de la pasta de microalgas <i>C. vulgaris</i> y la producción de PHB de lactosuero. ....	71

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos y Abreviaturas	Término
<b>%p/p</b>	Porcentaje peso-peso
<b>%p/v</b>	Porcentaje peso-volumen
<b>%v/v</b>	Porcentaje volumen– volumen
<b>1,3-PDO</b>	1,3- propanodiol
<b>AP</b>	Potencial de acidificación
<b>ATP</b>	Potencial de toxicidad acuática
<b>CCD</b>	Diseño central compuesto
<b>Co</b>	Número de puntos centrales
<b>DBO</b>	Demanda biológica de oxígeno
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>EPA</b>	Agencia de protección ambiental
<b>F</b>	Número total de puntos
<b>GWP</b>	Potencial de calentamiento global
<b>HB</b>	Hidroxibutirato
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>HTPE</b>	Potencial de toxicidad humana por inhalación o exposición dérmica
<b>HTPI</b>	Potencial de toxicidad humana por ingestión
<b>HV</b>	Hidroxivalerato
<b>k</b>	Número de factores
<b>LPS</b>	Lipo-polisacáridos
<b>meq/kg</b>	Miliequivalentes por kilogramo
<b>N<sub>0</sub></b>	Concentración inicial de biomasa
<b>N<sub>f</sub></b>	Concentración final de biomasa
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Estándares tecnológicos
<b>ODP</b>	Potencial de agotamiento de ozono
<b>P/S</b>	Producto/ sustrato consumido
<b>PA</b>	Poliamidas
<b>PBS</b>	Polibutirato succinato
<b>PBSA</b>	Polibutirato succinato-co-adipato
<b>PBSL</b>	Polibutirato succinato-co-lactato
<b>PBTA</b>	Polibutileno adipato-co-butileno terftalato
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>PCOP</b>	oxidación fotoquímica o potencial de formación de smog
<b>PEI</b>	Potencial de impacto ambiental
<b>PHA</b>	Polihidroxialcanoatos
<b>PHB</b>	Polihidroxibutirato
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico

<b>Símbolos y Abreviaturas</b>	<b>Término</b>
<i>Ppm</i>	Partes por millón
<i>PTT</i>	Politrimetileno tereftalato
<i>PUR</i>	Poliuretanos
<i>PVC</i>	Polivinilcloruro
<i>PVOH</i>	Polivinil alcohol
<i>t</i>	Tonelada
<i>t</i>	Tiempo de fermentación
<i>tg</i>	Tiempo de generación
<i>TPS</i>	Almidón termoplástico
<i>TTP</i>	Potencial de toxicidad terrestre
<i>WAR</i>	Algoritmo de reducción de residuos
<i>X<sub>nm</sub></i>	Efecto de cada variable
$\Delta T$	Intervalo de tiempo
$\alpha$	Valor axial del diseño experimental
$\beta_{nm}$	Coeficientes de cada variable
$\mu_{max}$	Velocidad máxima de crecimiento específica



# Introducción

El petróleo se ha considerado una materia prima esencial en gran cantidad de procesos industriales. Sin embargo, uno de sus derivados, específicamente, los plásticos sintéticos o polímeros, presentan serios problemas de contaminación, por lo que en las últimas décadas se han tratado de encontrar sustitutos [1]. Los biopolímeros se consideran una alternativa sustentable que podría eliminar o al menos reducir de manera evidente los dilemas medio ambientales a los que nos vemos enfrentados en la actualidad [2].

La familia de los polihidroxicanoatos (PHA), es una clase de polímeros termoplásticos biodegradables que pueden producirse a partir de gran variedad de microorganismos. Los PHA tienen un gran potencial como sustitutos de muchos polímeros convencionales ya que poseen propiedades físicas y químicas similares [3]. El más común de los compuestos de PHA es el polihidroxibutirato (PHB). El PHB es un biopolímero que durante las últimas décadas ha cobrado gran importancia en el campo de la industria por sus propiedades físico-químicas y ha sido considerado como posible sustituto de plásticos derivados del petróleo como el polietileno y el polipropileno [4]. Una de las desventajas de este biopolímero es su alto costo de producción, el cual se relaciona de manera directa con la consecución de las fuentes de carbono o materia prima y la energía [5]. De allí la necesidad de evaluar nuevos sustratos como el glicerol y el lactosuero (residuos agroindustriales) que minimicen tanto los costos de adquisición como de producción, esto es, que el producto sea rentable para la industria.

El glicerol es un subproducto resultante de la fabricación de biodiesel, que se produce por una transesterificación del aceite extraído y que se encuentra en una relación másica 1kg glicerol/10 kg Biodiesel [6]. Debido al aumento en la producción de biodiesel, la cantidad de glicerol residual también se ha aumentado provocando una disminución de su precio en el mercado, afectando la rentabilidad de las empresas productoras de biodiesel. A su vez, los bajos precios del glicerol han generado un problema medio

ambiental, debido a que las industrias cosmética y farmacéutica no usan todo el glicerol producido y entonces se encuentran grandes cantidades remanentes de subproducto cuya disposición final constituye un problema para las empresas productoras [7].

El lactosuero, un subproducto de los procesos industriales de la leche, ofrece una buena perspectiva frente a su uso como materia prima para la obtención de biopolímeros, debido a su bajo costo de adquisición y a la gran cantidad que se genera como residuo de la industria láctea del país. Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es descartada en forma de lactosuero, el cual retiene cerca de un 55%p/v del total de componentes de la leche, como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales [8]. El lactosuero residual posee una alta carga contaminante, sin embargo presenta un buen potencial para convertirse en otros productos de valor agregado aunque desafortunadamente no es reutilizado de manera eficiente.

Según La Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegan) [9], en el año 2014 la producción colombiana de leche cruda fue de 6.717 millones de litros, de los cuales se obtuvieron 4 mil toneladas de queso para la comercialización, lo que deja una cantidad de lactosuero residual de aproximadamente 3.600 toneladas, de las cuales el 45% es desechado en las fuentes hídricas, el restante se trasforma en bebidas lácteas, en polvo y lactosa para aplicaciones alimenticias [9].

Con los los datos anteriores, se concluye que es factible proponer nuevos métodos de utilización de estos residuos de bajo costo y de grandes posibilidades de aplicación en el sector industrial, donde se podría reducir de manera eficiente la contaminación producida y minimizar los costos relacionados con la adquisición y transporte de la materia prima.

El grupo de investigación en Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Manizales, se ha centrado principalmente en el desarrollo de nuevas alternativas para el aprovechamiento de residuos agroindustriales del país. Partiendo de la tecnología existente, se diseñan nuevos procesos usando microorganismos o enzimas que sean más eficientes y menos contaminantes, todo esto basado en el concepto de biorrefinerías sostenibles. En la actualidad, a partir de residuos agroindustriales, se han desarrollado con éxito proyectos en el área de los

biocombustibles como el bioetanol y el biodiesel, además de la producción de biomateriales usando estos mismos sustratos.

Con este trabajo se pretende continuar con la línea de investigación aprovechando residuos que ocasionan problemáticas medioambientales, como son el glicerol que ha sido previamente estudiado para la producción de PHB y el lactosuero que proviene de la industria láctea de la región además de probar el consumo de un azúcar complejo como la lactosa (principal azúcar del lactosuero) por parte del microorganismo seleccionado, obteniendo un biomaterial como el PHB a partir de un microorganismo como *Bacillus megaterium*. Luego, usando una pasta de microalgas cultivadas en lactosuero, realizar un proceso de hidrólisis para lograr un sustrato fermentable para la obtención de PHB por *B. megaterium* y finalmente comparar la producción de PHB con el esquema base de producción de bioetanol a partir de la misma pasta de microalgas.

## Hipótesis

Es posible producir polihidroxitirato a partir de microorganismos usando como materia prima el lactosuero.

## Objetivo General

Analizar la producción de polihidroxitirato usando el lactosuero como materia prima.

## Objetivos Específicos

- Analizar las diferentes técnicas de pre-tratamiento para el retiro eficiente de la proteína del lactosuero.
- Evaluar la productividad de *Bacillus megaterium* para la obtención de PHB utilizando lactosuero como sustrato.
- Comparar la viabilidad económica de la producción de PHB con un caso base como es la obtención de etanol utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* en un medio donde se tenga el lactosuero como sustrato.

## Justificación

El lactosuero ha sido estudiado durante décadas, debido a su potencial como fuente para la obtención de diferentes productos de valor agregado, tanto en la industria alimenticia como en la industria bioquímica. Se encuentran artículos publicados alrededor del aprovechamiento del lactosuero desde 1986 [10]–[13]. Todas estas aplicaciones dirigidas principalmente a la obtención de productos de seguridad alimentaria como el suero en polvo, el concentrado de proteínas y finalmente la purificación directa de la lactosa para usos industriales. Adicional a las anteriores aplicaciones, se han realizado investigaciones alrededor de la obtención de etanol directamente de la fermentación del lactosuero usando diferentes microorganismos y se han logrado producciones a escala industrial con este residuo[11], [14]–[16].

El glicerol, un subproducto de la obtención del biodiesel, ha cobrado gran importancia por el incremento en la producción de biocombustibles. Debido a las normas implementadas por el gobierno nacional (donde se reglamenta la mezcla diesel con biodiesel), se ha aumentado la producción de glicerol aunque las grandes cantidades de este subproducto, no son totalmente aprovechadas por las industrias que típicamente lo utilizan [17]. Este alcohol es aprovechado en gran medida por las industrias farmacéuticas, cosméticas, de automovilismo, etc., que tienen la necesidad de purificar el glicerol para su uso, lo que encarece los procesos. Por lo tanto, es importante encontrar rutas de aprovechamiento de este subproducto con aplicaciones microbiológicas para la obtención de productos de valor agregado.

El PHB, un producto que ha generado gran interés durante los últimos años, se ha estudiado principalmente en residuos de tipo lignocelulósico y con sustratos de gran costo como la glucosa [18]–[23]. Existen diversas publicaciones alrededor de la obtención de PHB usando lactosuero. Estas publicaciones están basadas sobre todo en

microorganismos recombinantes como *Escherichia coli*, y bacterias como *Cupriavidus necator* y *Alcaligenes latus*, así como otros microorganismos [5], [19], [24]–[27]. Se ha estudiado además el uso y desarrollo de diferentes técnicas para acumular y separar este biomaterial. Adicionalmente se presentan estudios usando el glicerol y el *Bacillus megaterium* que presenta una perspectiva favorable para la obtención de este biomaterial con sustratos de bajo costo [4], [19], [28]–[31].

El grupo de investigación en Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Manizales, ha desarrollado en sus últimas investigaciones el aprovechamiento de residuos agroindustriales. Los residuos analizados provienen tanto de origen lignocelulósico como de otros residuos líquidos que tengan gran potencial en la generación de productos de valor agregado. Todos estos estudios están dirigidos a generar una disminución de los impactos ambientales como resultado del desecho directo de estos subproductos. Este estudio se enfoca especialmente en el aprovechamiento del glicerol, subproducto generado del proceso de obtención del biodiesel y el lactosuero generado en las industrias lácteas. Se pretende comparar la productividad del microorganismo *Bacillus megaterium* usando estos dos sustratos, para observar el potencial de uso en una escala mayor.

# **1. Capítulo 1: Los biopolímeros**

## **1.1 Resumen**

En este capítulo se hace una revisión de las perspectivas generales de los biopolímeros de diferentes fuentes, presentando principalmente los polímeros a base de almidón, el ácido poliláctico y los polihidroxialcanoatos. Los biopolímeros se presentan como una alternativa viable para la sustitución de los plásticos derivados del petróleo, que aún se encuentran en etapas de investigación y desarrollo, en búsqueda de tecnologías que disminuyan sus costos, haciéndolos más competitivos frente a los polímeros sintéticos.

## **1.2 Introducción**

Los plásticos son los nuevos materiales más usados en el mundo. Se han usado en grandes cantidades en la últimas cinco décadas. En países del primer mundo, los polímeros sobrepasan al aluminio y al vidrio en términos de volúmenes usados [32]. Desde productos desechables como botellas de agua y empaques para productos perecederos hasta productos de larga duración como electrodomésticos, los plásticos se han convertido en un elemento básico en el día a día de todas las personas [33]. Sin embargo, los beneficios derivados del uso de tantos productos plásticos vienen con un costo ambiental. Los plásticos derivados del petróleo representan una cantidad significativa de materia prima usada para la producción de objetos de consumo mundial.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) estima que los plásticos constituyen más del 12% de los residuos sólidos municipales que se depositan en la tierra, de los cuales se tienen contenedores y empaques, productos de larga duración y productos desechables como platos y vasos [34]. Adicionalmente, una gran proporción

de productos plásticos llegan a los cuerpos de agua que finalmente llegan al océano, generando amplias áreas de contaminación [35].

La necesidad del hombre por el continuo uso de los materiales plásticos, hace importante buscar alternativas tecnológicas para el desarrollo de materiales sustitutos. Los biopolímeros se presentan como una alternativa atractiva, debido a sus propiedades similares a los plásticos derivados del petróleo, a su biodegradabilidad y la posibilidad de obtenerse a partir de fuentes de carbono renovables. Los plásticos biodegradables de fuentes renovables, se han hecho más disponibles en el mercado gracias a los esfuerzos de compañías de ingeniería química y biotecnología para mejorar la plataforma tecnológica para su producción [36]. Los materiales derivados de fuentes biológicas incluyendo almidón, celulosa, ácidos grasos, azúcares, proteínas y otros pueden ser consumidos por microorganismos, especialmente por bacterias que pueden convertir estas materias primas en diferentes monómeros para la producción de polímeros [37]. La tabla 1-1 muestra una revisión de las categorías de los bioplásticos y los métodos de producción usados en su obtención.

**Tabla 1-1.** Categorías de los bioplásticos [33].

<b>Tipo de Bioplástico</b>	<b>Tipo de Polímero</b>	<b>Método de Producción</b>
Polihidroxialcanoatos (PHA)	Poliéster	Producción directa de PHA por fermentación
Ácido Poliláctico (PLA)	Poliéster	Monómero base (Lactido) por fermentación seguido por una polimerización
Plásticos de Almidón	Polisacárido	Almidón parcialmente fermentado, Almidón Termoplástico (TPS), uniones de almidón modificadas químicamente, Materiales compuestos de almidón
Polímeros de Celulosa	Polisacárido	Esteres orgánicos de celulosa, Celulosa regenerada
Politrimetileno Tereftalato (PTT)	Poliéster	1,3-propanodiol de base biológica (1,3-PDO) por fermentación más ácido tereftálico de origen petroquímico
Poliamidas (PA)	Poliamida	Monómero base ácido 11-amonidecanóico de aceite de ricino o por la fermentación del ácido
Polietileno (PE)	Polioléfina	Etileno como monómero base producido de bioetanol

**Tabla 1-1. (Continúa)**

Polivinilcloruro (PVC)	Polivinilo	Monómero de vinil cloruro se obtiene del etileno de origen biotecnológico
Poliuretanos (PUR)	Poliuretano	Poliol producido de aceites vegetales
Termoestables	Polímeros reticulados	Polimerización por condensación de polioles, ácidos orgánicos y ácidos grasos

La naturaleza de la biodegradabilidad de los plásticos está basada en los polímeros que los constituyen, que deben ser moléculas reconocidas por enzimas presentes en la naturaleza. Por ejemplo, los poliésteres que contienen el grupo funcional éster en su cadena, que puede ser biodegradado debido a que esta molécula está presente en la naturaleza y las enzimas específicas para esterases (esterasa) se presentan fácilmente (triglicéridos, glicerol unido a ácidos grasos por enlaces de éster) [36].

A continuación se hace una revisión de los biopolímeros más importantes: los polímeros de almidón, el ácido poliláctico y los polihidroxialcanoatos.

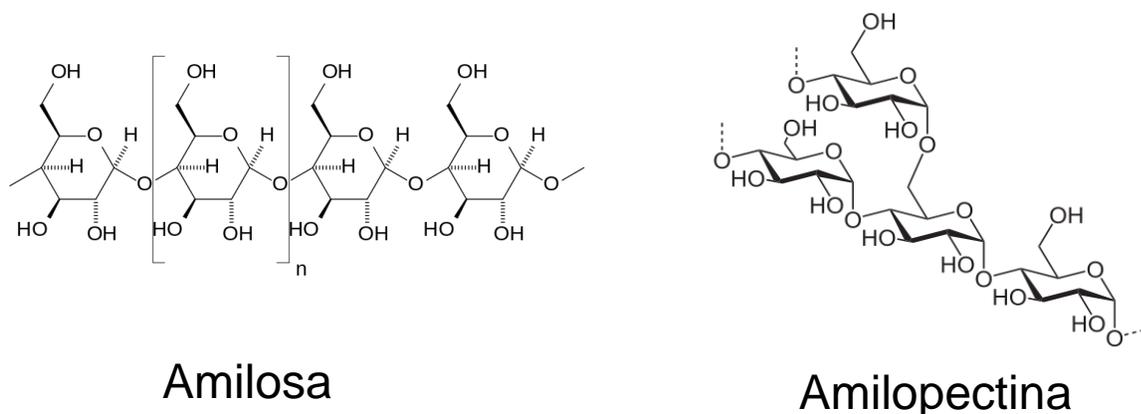
### 1.2.1 Almidón

Una clase importante de plásticos son los plásticos a base de almidón. A principio de los años 90s el desarrollo en la tecnología permitió la obtención de termoplásticos y materiales biodegradables de moléculas complejas naturales como el almidón (de maíz, papa, etc.) [33]. El almidón es el mayor carbohidrato (polisacárido) almacenado en las plantas, está compuesto por una mezcla de dos polímeros, un polisacárido lineal (amilosa) y un polisacárido ramificado (amilopectina) [38]. La figura 1-1 muestra la estructura de la amilosa y la amilopectina, el bloque principal de construcción para ambos polímeros es el monómero de glucosa. La cantidad de amilosa y amilopectina en el almidón varía de acuerdo con el tipo de almidón.

Comercializados desde hace varias décadas los polímeros de almidón se han convertido en unos de los polímeros más importantes en el mercado de los biopolímeros, usados en

el empaque de productos perecederos. La mayoría de las aplicaciones de los plásticos derivados del almidón están relacionadas con los empaques, que incluyen películas para empaques industriales, películas y empaques de aperitivos. Las aplicaciones más actuales incluyen componentes para automóviles (filtros, paneles), aparatos electrónicos, electrodomésticos, entre otros [39]. Las materias primas más comunes para la obtención de polímeros de almidón son el maíz, trigo, papa, tapioca y arroz [38]. Algunas compañías han hecho uso de las corrientes de desecho.

**Figura 1-1.** Estructura de la amilosa y amilopectina [40].



Existen cinco grupos principales de plásticos del almidón:

*Almidón Parcialmente Fermentado:* Se usa el moldeo por inyección, por lo que sus aplicaciones varían desde empaques para CD's hasta macetas para flores además de productos que hacen un importante uso de su característica biodegradable como los accesorios para golf [41].

*Almidón Nativo:* Este almidón se obtiene directamente del proceso de molido y no involucra ningún proceso de fermentación. Este se extrae directamente de los cultivos productores de almidón. El almidón nativo está sujeto a procesos posteriores de mezclado, extrusión, etc. para obtener materiales compuestos de almidón, o derivados por modificación química [42].

*Almidón Termoplástico (TPS):* Se forma por el procesado de almidón nativo en un extrusor bajo condiciones de presión, temperatura, limitaciones de agua y tiempo

suficiente para lograr la ruptura de la estructura de la amilosa y la amilopectina. Compuestos adicionales (aditivos) se pueden integrar al proceso de extrusión para obtener la resina final en un solo paso. Se incluye el uso de plastificantes como el glicerol, poliéteres y úrea, que reducen los enlaces hidrógeno y estabilizan el producto. Las principales áreas de aplicación del almidón termoplástico son bandejas de espumas y cajas especialmente usadas en el envasado de alimentos, productos solubles en agua y los productos digeribles [43].

*Almidón modificado químicamente:* se usan diferentes químicos para reemplazar algunos grupos hidroxilo por grupos éster o éter. Los polímeros entre cruzados también se producen por modificación química. El entrecruzamiento inhibe el crecimiento y la gelatinización del granulo de almidón, lo que aumenta la estabilidad frente a ácidos, tratamientos térmicos y fuerzas cortantes. Este tipo de almidón es costoso y por lo tanto no posee muchas aplicaciones [44].

*Mezclas de Almidón:* se producen por la combinación de TPS, almidón modificado químicamente y en algunas ocasiones almidón nativo, con compuestos petroquímicos, biológicos o inorgánicos. El contenido de almidón de la mezcla varía del 30% al 80% en masa dependiendo de la aplicación final. Se usa para la producción de bolsas biodegradables, películas para empaques, cuerdas, vajillas, cintas, películas técnicas, bandejas y plástico para envolver [45].

En la tabla 1-2 se muestran los principales productores de polímeros de almidón a nivel mundial. El costo de los biopolímeros de almidón ha ido en disminución. Pero el incremento del uso de productos agrícolas para la obtención de productos no alimenticios (principalmente etanol como biocombustible) ha incrementado el precio de los productos agrícolas, limitando de esta manera la disminución de precios de estos polímeros [46]. Se presentan diferentes ventajas con el uso de los polímeros a base de almidón, como el bajo costo de adquisición del almidón, así como la cantidad de la materia prima que se encuentra en grandes cantidades y proviene de fuentes renovables y residuos agroindustriales, su biodegradabilidad y compatibilidad para el uso en aplicaciones para bebés (pañales) y mascotas [47].

A pesar de los esfuerzos realizados aún existen obstáculos que vencer para lograr una mayor comercialización y aceptación por parte de los consumidores de los polímeros a

base de almidón. Algunos de los mayores problemas se relacionan con el precio, ya que el costo de los productos de este tipo es mayor comparado con los de base petroquímica, la falta de visibilidad de los productos, así como la educación y promoción hacia el público de estos productos, disminuyen su rentabilidad [47].

**Tabla 1-2.** Principales productores de biopolímeros de almidón [42].

Compañía	Ubicación	Tipo de polímero de almidón	Co-polímero	Nombre de la marca
Novamont	Italia	Mezcla de almidón	PCL-PVOH	Master-Bi
Rodenburg	Paises Bajos	Almidón parcialmente fermentado	Ninguno	Solanyl
Biotec	Dinamarca	TPS	Ninguno	Bioplast TPS
Limagrain	Francia	Mezcla de almidón	PBS, PLA	Biolice
BIOP	Dinamarca	Mezcla de almidón	PBSA, PBSL, PBTA	Biopar
Liva	China	Mezcla de almidón	N/A	Livan
Plantic	Australia	Mezcla de almidón	N/A	Plantic
Cereplast	Estados Unidos	Mezcla de almidón	PLA, PBS	Cereplast

N/A: no aplica.

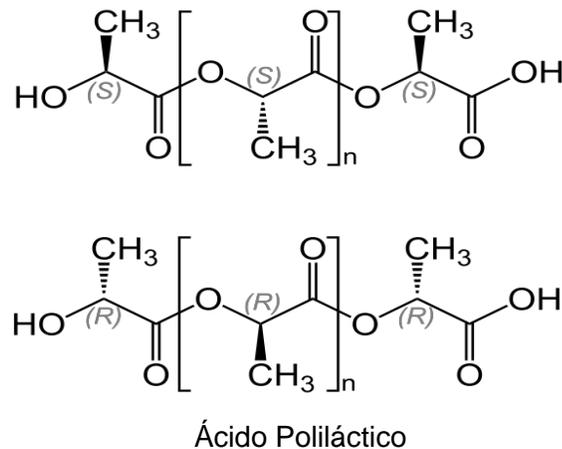
### 1.2.2 PLA

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster termoplástico producido vía polimerización del ácido láctico. El ácido láctico proviene de la fermentación de subproductos de la producción agrícola como la harina de maíz y de otras fuentes ricas en almidón como el trigo. La figura 1-2 presenta la estructura del ácido poliláctico, que está formado por monómeros de ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico), el monómero más simple de los ácidos carboxílicos con un átomo de carbono asimétrico. El ácido láctico se produce por fermentación anaerobia de sustratos de carbono puros (glucosa o sacarosa) o impuros (almidón) usando bacterias o ciertos tipos de hongos. El ácido láctico producido por

fermentación es ópticamente activo, la producción específica de L(+) o D(-) puede alcanzarse de acuerdo con el lactobacilo usado [48].

Como material básico para la producción de PLA, casi todas las materias primas agrícolas pueden usarse. Estas materias primas básicas se transformarán por el uso de un determinado microorganismo en ácido láctico. Existen dos rutas para la producción de PLA. En la primera, el ácido láctico puede convertirse en ácido poliláctico por una policondensación, que resulta en polímeros de baja densidad. El agua generada durante la polimerización debe ser removida para lograr un equilibrio entre las reacciones de polimerización y depolimerización. Este proceso requiere largos tiempos de reacción y altas temperaturas. La segunda ruta es la producción del láctido (el dímero cíclico del ácido láctico), usando una oligomerización y una ciclización. Para la polimerización final del láctido en poliláctico, este debe ser purificado para eliminar el agua residual y la acidez libre. Se recomienda un contenido de agua menor de 50 ppm y una acidez libre de 0,1%meq/kg. Este láctido purificado puede ser polimerizado en un poliláctico, un poliéster alifático. Los polímeros obtenidos pueden ser procesados como cualquier termoplástico por extrusión, moldeo por inyección, etc. [31]. Ambos polímeros se conocen como PLA.

**Figura 1-2.** Estructura del ácido poliláctico [48].



Desde la apertura de la primera planta de producción de PLA en 2002, el PLA ha aumentado su importancia en el mercado. Ejemplos de los productos que se obtienen son las películas para uso industrial, las botellas moldeadas por soplado, productos moldeados por inyección y fibras para cuerdas. El PLA se ha usado para una amplia

gama de aplicaciones y áreas en la industria textil se usa en la producción de camisetas y telas, para la producción de pañales, en la industria electrónica para la fabricación de partes para teléfonos celulares etc. [37].

El desarrollo reciente de PLA resistente al calor aumenta las aplicaciones de este biopolímero, así como su posibilidad de reciclado. La tabla 1-3 muestra los principales productores de PLA en el mundo describiendo la aplicación final del polímero.

**Tabla 1-3.** Principales productores de PLA [49].

<b>Compañía</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>Nombre de la marca</b>
NatureWorks	Estados Unidos	Empaques para botellas de leche, agua y jugos de baja vida de anaquel y en condiciones refrigeradas. Sector de electrónica	NatureWorks
Corbion	Países Bajos	Productos para la industria de los alimentos, farmacéutica y química	PURAC
Galactic	Bélgica	PLA resistente al calor, Reciclado de PLA	Galactic
Toyobo Biologics	Japón	Películas industriales, partes electrónicas, Filtros funcionales	N/A
Tong-Jie-Liang Biomaterials .Co.	China	Películas, resinas, fibras, PLA para inyección	N/A

N/A: No aplica

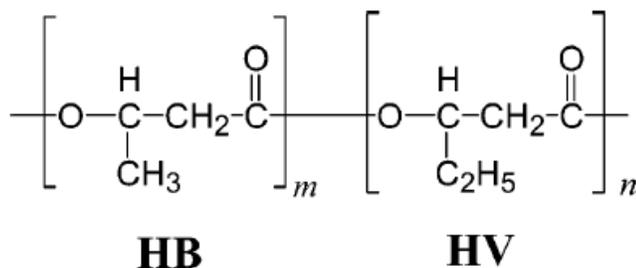
El costo principal en la producción del PLA es la etapa de fermentación para la producción del ácido láctico, que puede representar entre el 40 y 50% de los costos totales. Muchas empresas muestran que cerca del 50% de la inversión inicial se realiza para la producción del monómero de ácido láctico [49]. Una de las principales ventajas de la producción de PLA es el costo de las materias primas, ya que casi cualquier materia prima puede usarse para la etapa de fermentación además del desarrollo de nuevas tecnologías que ayudan a reducir los costos de producción. Una característica esencial de este proceso, es la viabilidad en el uso de los equipos convencionales para la producción de plásticos [33].

Los mayores obstáculos que se presentan en la producción de PLA se relacionan como se mencionó anteriormente con la etapa de fermentación, estos costos deben reducirse al nivel del precio del etileno para lograr un nivel competitivo del PLA. Los costos energéticos y las tecnologías de conversión que aún se encuentran en etapas tempranas de desarrollo, aumentan el costo de producción del PLA [50].

### 1.2.3 PHA

Los polihidroxicanoatos (PHA) son conocidos como poliésteres naturales, producidos por bacterias, con un gran potencial en la aplicación como biopolímeros [51]. Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos, en los que el grupo carboxilo de un monómero forma enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (poliéster). La figura 1-3 muestra la estructura de un poliéster tradicional como el (R)-3-hidroxiacetato (HB), y (R)-3-hidroxivalerato (HV).

**Figura 1-3.** Estructura de un poliéster [52].



Los PHA existen como inclusiones celulares citoplasmáticas, cuando las bacterias se observan en un microscopio de transmisión de electrones, los cuerpos aparecen de color blanco (Figura 1-4). Estas inclusiones funcionan como carbono de reserva para la célula [53].

**Figura 1-4.** Imagen representativa de una bacteria productora de PHA, donde la bacteria aparece en gris y las vesículas de PHA aparecen en blanco [51].



La producción de PHA puede realizarse *in vivo* o *in vitro*. La producción *in vitro* se hace a partir de lactonas, ácidos hidroxialcanóicos o el tioéster sintético 3-hidroxiacetyl-CoA, empleando enzimas como lipasas, proteasas o esterases [54]. La producción *in vivo* se puede realizar por fermentación usando especies de microorganismos que tengan la habilidad de producir PHA ya sea de manera innata o que hayan sido genéticamente modificados. Los microorganismos sintetizan los PHA como reserva de carbono cuando se ven expuestos a condiciones de estrés nutricional, donde hay un exceso en la fuente de carbono y una restricción en otro nutriente como el nitrógeno, fósforo u oxígeno [55].

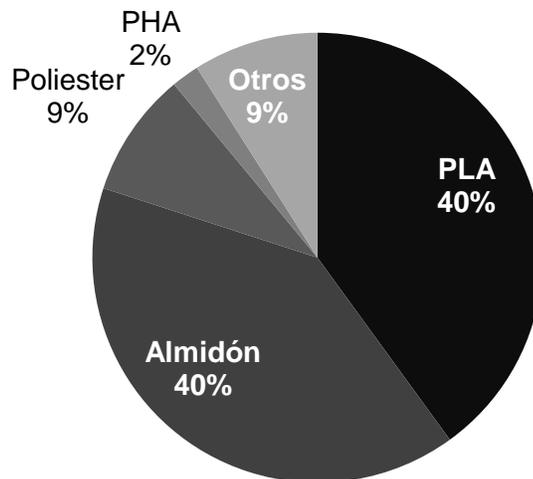
Las fuentes de carbono utilizadas actualmente para la producción de PHA son sacarosa, ácidos grasos y aceites vegetales. Se ha propuesto el uso de casi cualquier tipo de fuente de carbono, como los residuos lignocelulósicos [56]. Lo anterior, debido a la necesidad de reducir los costos asociados a la materia prima para así mejorar el margen de ganancias en la producción de biopolímeros. La diversidad de monómeros de PHA existentes confieren a este tipo de biopolímeros una amplia diversidad de aplicaciones como se muestra en la figura 1-5, que van desde empaques ambientalmente amigables, fibras, implantes biocompatibles, hasta la producción de biocombustibles [37].

**Figura 1-5.** Cadena de valor del PHA [37].



La comercialización de PHA está en sus inicios, la figura 1-6 presenta la demanda mundial de biopolímeros, donde los PHA siguen estando por debajo de otros biopolímeros como el ácido poliláctico y los polímeros de almidón. La tabla 1-4 presenta los principales productores de PHA, sus ubicaciones y los productos principales, muchos de los cuales aún se encuentran en etapa de investigación y desarrollo o en escala piloto, debido a las etapas tempranas de comercialización.

**Figura 1-6.** Demanda mundial de biopolímeros [33].



**Tabla 1-4.** Principales empresas de producción de PHA [42].

Compañía	Ubicación	Materia Prima	PHAs	Nombre de la marca	Escala
Tianan	China	Azúcar de Maíz	P(3HB-co-3HV)	Enmat	Industrial
Telles	Estados Unidos	Azúcar de Maíz	Co-polímeros de PHB	Mirel	Industrial
Kaneka	Japón	Aceites Vegetales	P(3HB-3HHx)	Kaneka	Piloto (anunciado Industrial) R&D
Green BIO/DSM	China	Azúcar (sin especificar)	P(3HB-co-4HB)	Green Bio	(anunciado Industrial) R&D, Piloto (anunciado Industrial)
PHB Industrial	Brasil	Caña de Azúcar	P(3HB) P(3HB-co-3HV)	Biocycle	R&D, Piloto (anunciado Industrial)
Biomer	Alemania	Azúcar (sacarosa)	P(3HB)	Biomer	R&D, Piloto
Mitsubishi gas Chemical	Japón	Metanol (de gas natural)	P(3HB)	Biogreen	R&D, Piloto
Biomatera	Canadá	Azúcar (sin especificar)	P(3HB-co-3HV)	Biomatera	R&D, Piloto
Meridian	Estados Unidos	Aceite de canola	PHAs	Danimer	Industrial
Tepha	Estados Unidos	N/A	N/A	TephaFlez, TephaElast	R&D, Piloto
Tianzhu	China	N/A	P(3HB-co-HHx)	Tianzhu	R&D, Piloto

R&D: Investigación y desarrollo, N/A: No aplica.

Los PHA comercializados en la actualidad pueden ser usados en los procesos convencionales de los polímeros como moldeo, extrusión, etc., obteniendo productos como empaques, películas para agricultura, elementos de cuidado personal (cepillos de dientes), lapiceros, juguetes y accesorios domésticos. Entre los beneficios del uso de los PHA se encuentra su moldeo sencillo, donde se obtienen superficies más uniformes y paredes más delgadas. Facilidad para la disposición y el tratamiento de residuos debido a su biodegradabilidad y producción de fuentes renovables, lo que lo hace un gran material para los productos de un solo uso (platos y vasos descartables) [36].

Los obstáculos que se presentan en la comercialización de los PHA se observan en las etapas de desarrollo tecnológico iniciales en las que se encuentra su producción, especialmente su separación y purificación. Por la parte ambiental durante la producción

de PHA se generan grandes cantidades de biomasa, un problema de bajas conversiones y manejo de residuos. Otra limitante que se presenta en la producción de PHA, es la aprobación del uso de los biopolímeros que provienen de microorganismos para su contacto directo con alimentos. Lo anterior es debido a la posibilidad de que existan sustancias tóxicas que causen efectos a la salud humana ya que no provienen de fuentes conocidas (como por ejemplo por síntesis de monómeros derivados del petróleo). Además, no existe una conciencia real de los consumidores por el uso de los biopolímeros, por lo que no hay una cadena de valor real.

### **1.3 Conclusiones**

El uso de los biopolímeros para la sustitución de los polímeros sintéticos, se presenta como una gran alternativa. Sin embargo, la producción de muchos de estos como el almidón, PLA y PHA siguen en etapas de investigación y desarrollo, que impiden su aplicación y uso masivo. Es necesario por esta razón generar cadenas de valor que permitan una mayor comercialización y de esta manera mayores avances en estas industrias.

Los obstáculos presentados en la producción de estos biopolímeros como su costo de producción y calidad del material deben seguir en investigación y desarrollo, para lograr mejoras en estos procesos de producción y convertirse en una alternativa barata y renovable. Es necesaria la búsqueda e implementación de nuevas materias primas, ya que se entra en competencia con productos de alta demanda como el etanol. Además los biopolímeros compiten entre sí por materias primas (maíz, caña de azúcar, sacarosa, glucosa), aumentando los costos de producción debido al precio del sustrato.



## **2. Capítulo 2: Producción de PHB a partir de Glicerol**

### **2.1 Resumen**

En este capítulo se hace una descripción general del PHB, asimismo, se presenta un sustrato alternativo para la producción de este biopolímero como es el glicerol, usando como microorganismo una bacteria gram positiva como *Bacillus megaterium*. Se determinaron algunos parámetros de crecimiento del microorganismo, donde se encontró que el tiempo de generación fue de 7 h y la velocidad máxima de crecimiento específica del microorganismo fue  $0,09 \text{ h}^{-1}$ . Se halló que la producción de PHB a partir de glicerol es una gran alternativa para el desarrollo de este producto, dando rendimientos similares a los obtenidos con glucosa (62 y 59% respectivamente).

### **2.2 Introducción**

El primer PHA aislado fue el PHB, por Lemoigne en 1926 [57], este es el polímero de reserva encontrado en muchos tipos de bacterias, que crecen en una gran variedad de ambientes naturales [52]. El PHB tiene propiedades similares al polipropileno. Es un termoplástico que puede ser procesado por técnicas de extrusión e inyección. Su punto de fusión es de  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y tiene un amplio rango de temperaturas de uso desde  $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $120^{\circ}\text{C}$ . Es utilizado como empaque de productos perecederos, producción de cubiertos, objetos de aseo personal (cuchillas de afeitarse, cepillos de dientes), entre otros [18].

Uno de los problemas principales que retrasa la producción de PHB a nivel comercial es su alto costo de comercialización, comparado con los materiales convencionales derivados del petróleo [26]. Para reducir los costos de producción del PHB se ha propuesto el uso de diferentes sustratos de bajo costo como los residuos agroindustriales. El bagazo de caña de azúcar, las aguas residuales, los lodos activados, el glicerol y el lactosuero han sido estudiados como posibles sustitutos de las fuentes de carbono convencionales [58]–[60].

En Colombia la agroindustria es el sector más importante de la industria manufacturera, generando gran cantidad de residuos que no están siendo aprovechados y al contrario, se convierten en un problema ambiental [18]. Las empresas de este tipo que mayor aumento han mostrado durante los últimos años han sido las relacionadas con el sector de los biocombustibles, como el etanol y el biodiesel. Estas empresas se han visto impulsadas por diversos proyectos propuestos por el gobierno nacional relacionados con la mezcla de los combustibles tradicionales, gasolina y ACPM, con el bioetanol y el biodiesel. Este último ha generado la puesta en marcha de plantas productoras del biocombustible a partir de palma africana principalmente. La tabla 2-1 muestra las plantas productoras de biodiesel en Colombia que actualmente están en funcionamiento.

El glicerol es un subproducto resultante de la fabricación de biodiesel, que se produce por una transesterificación del aceite extraído con un alcohol de cadena corta, generalmente metanol en presencia de un catalizador como el NaOH. El glicerol es un subproducto que se encuentra en una relación másica 1kg glicerol/10 kg biodiesel, en su estado crudo está compuesto principalmente por glicerol, ácidos grasos libres, metilésteres de ácidos grasos y algunas trazas de sales [61]. El incremento en la producción de biodiesel ha aumentado la cantidad de glicerol residual, disminuyendo su precio en el mercado, afectando la rentabilidad de las empresas productoras de biodiesel.

El glicerol puro es una materia prima importante para las industrias alimenticia, farmacéutica, cosmética, papelera y del cuero entre otras [62]. El problema que presentan estos usos finales es la necesidad de purificación del glicerol, que son procesos de gran consumo energético que hacen inviable el uso de este producto por pequeñas y medianas empresas. Por esto ha sido necesario buscar alternativas al uso

del glicerol crudo, como su aplicación como sustrato para la obtención de productos de valor agregado por medio de la fermentación, esto debido a su naturaleza de cadenas de carbono reducidas que puede reemplazar el azúcar usado comúnmente.

**Tabla 2-1.** Plantas de producción de Biodiesel en Colombia [63].

Región	Empresa	Capacidad (T/año)	Área Sembrada (Ha)**	Fecha entrada en Operación
Santa Marta	Biocombustibles Sostenibles del Caribe	100.000	29.240	Marzo,2009
Codazzi	Oleoflores	60.000	17.544	Enero, 2008
Barranquilla	Romil de la Costa	10.000	0	
Gálapa	Biodiésel de la Costa	10.000	0	
Santa Marta	Odín Energy	36.000	10.526	Junio, 2008
Facatativá	BioD	120.000	36.810	Febrero 2009
Barrancabermeja	Ecodiesel de Colombia	120.000	36.810	Junio, 2008
San Carlos de Guaroa	Aceites Manuelita	120.000	36.810	Julio, 2009
Castilla la Grande	Biocastilla	15.000	4.601	
<b>Total</b>		<b>591.000</b>	<b>172.341</b>	

\*\*Las cifras del área sembrada son tomadas del Sistema de Información del Sector Palmero (SISPA)

Los microorganismos usados para la producción de PHB son normalmente bacterias que pueden ser cultivadas en condiciones de estrés nutricional como *Cupriavidus necator* y *Bacillus megaterium* o existen las que acumulan PHB como parte de su crecimiento regular como *Escherichia coli* recombinante y *Alcaligenes latus* [19], [27], [64], [65].

El PHB producido por bacterias gram negativas como *C. necator* y *A. latus* requieren para su aplicación en el área de la biomedicina una etapa adicional de purificación, ya que estos microorganismos gram negativos contienen endotoxinas en la membrana de lipopolisacáridos (LPS). Los microorganismos gram positivos como *B. megaterium* no poseen esta membrana de LPS por lo que son más convenientes para la producción de

PHB para aplicaciones biomédicas. Adicionalmente las cepas de *Bacillus* presentan un mayor y más rápido crecimiento en diferentes sustratos, con la dificultad de que no acumulan la misma cantidad de biopolímeros como *C. necator* que acumula hasta el 80% del peso seco de la célula [19].

En este capítulo se presenta entonces el crecimiento de *Bacillus megaterium* y la producción de PHB en un medio formulado, donde se tiene un estrés por la relación fuente de carbono/nitrógeno. La fuente de carbono analizada será el glicerol, mientras que la fuente de nitrógeno será el sulfato de amonio (fuente de amonio recomendada) [19].

## 2.3 Materiales y Métodos

### 2.3.1 Cepas Bacterianas

La cepa de *Bacillus megaterium* usada en este trabajo, es una cepa silvestre aislada de los sedimentos superficiales del Estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina), traída al laboratorio gracias a un intercambio de un estudiante de la Universidad Nacional. Fue caracterizada como productor de PHB en la presencia de un exceso de fuente de carbono y la restricción de la fuente de nitrógeno [19]. El cultivo base adaptado a glicerol como única fuente de carbono se mantuvo a 4 °C luego de crecer en un agar con medio formulado. Las células adaptadas de *B. megaterium* se guardaron a -80°C en micro-viales de 2 mL que contenían 30% de glicerol y 70% del medio de cultivo líquido.

### 2.3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo se preparó con la siguiente concentración de compuestos:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 9 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2g/L; y 1 mL/L de solución de elementos traza compuesta por :  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,25 g/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1g/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/L;  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0,23 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0,2 g/L; y HCl, 10mL. La fuente de carbono usada fue glicerol puro (99%). La fuente de

carbono y el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  fueron esterilizados por separado y agregados de manera aséptica al medio luego de enfriarse.

### 2.3.3 Cultivos por lotes

Las fermentaciones para producir PHB se llevaron a cabo por 96 h en biorreactores (Biotron, Co) de 1,5 L. El volumen de trabajo fue de 1,2 L, se usó el 10% v/v de un medio crecido con el mismo microorganismo como pre-inoculo. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 32°C, 200 rpm y 5 L/min como flujo de aire. La concentración inicial de glicerol fue de 20 g/L y de sulfato de amonio de 1 g/L. El pH se mantuvo controlado en un valor de 7 durante la fermentación usando una solución de NaOH al 2,5 N.

### 2.3.4 Métodos Analíticos

#### ▪ Biomasa

La biomasa fue medida usando la técnica de peso seco. Muestras de 1 mL fueron recolectadas en un tubo de micro-centrífuga previamente secado y pesado, luego se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante resultante se conservó para análisis posteriores. La biomasa precipitada se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente, el agua sobrante se descartó. La biomasa final fue pesada luego de un secado por 48 h a 60°C.

#### ▪ Extracción de PHB

Luego de la fermentación, las células se recuperaron por centrifugación a 18 °C, 6000 rpm por 20 min. El PHB intracelular se extrajo usando el método del Cloroformo-hipoclorito [65]. El medio de dispersión contiene 50 mL de cloroformo y 50 mL de hipoclorito de sodio disuelto 30% p/p en agua. El polvo fue tratado a 38°C por 1 h en un

agitador orbital a 100 rpm. La mezcla obtenida se centrifuga a 4000 rpm por 10 min, lo que da como resultado 3 fases. El PHB se recolecta de la fase inferior que contiene PHB disuelto en cloroformo. El PHB se precipita usando 10 volúmenes de metanol frío [65].

#### ▪ **Cuantificación de PHB**

La biomasa seca es usada para la metanólisis del monómero de acuerdo con el método descrito por Braunegget *et al.* [66] y modificado por Lageveen *et al.* [67]. Aproximadamente 10 mg de masa celular se hicieron reaccionar en un tubo con una solución que contiene 1 mL de cloroformo, 0,85 mL de metanol, 0,15 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0,2 mL de estándar interno (ácido benzoico en metanol). La reacción se llevó a cabo por 140 min a 100°C. Luego de la reacción, se adicionaron 0,5 mL de agua destilada y el tubo fue agitado vigorosamente en vortex (Velp Científica) por 1 min. Luego de la separación de fases, de la fase orgánica (fase inferior) se removieron y se transfirieron 500µL a un vial de vidrio. A continuación, se inyectaron 10 µL a un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se usó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 series II, que estaba equipado con una columna capilar HP-5MS (25 m longitud, 0.32 mm diámetro interno). Se usó helio como fase móvil (velocidad de 5cm/min). El inyector y el detector se operaron a 230°C y 275°C respectivamente. Se usó un programa de temperatura para lograr una separación eficiente de los ésteres (120 °C por 5min, rampa de temperatura de 8 °C por min, 180 °C durante 12 min). Para la identificación y cuantificación del PHB derivatizado se usó un espectrómetro de masas Agilent Technologies.

#### ▪ **Cuantificación de la Biomasa Residual**

La biomasa residual corresponde a la biomasa restante luego de la extracción de PHB. Esta está relacionada con la acumulación de PHB intracelular. Esta se calcula restando la biomasa total con la concentración de PHB obtenido.

### ▪ Porcentaje de acumulación de PHB

El porcentaje de acumulación de PHB está referido a la cantidad de PHB almacenado en la célula, este se calcula usando la Ecuación 2.1

$$\% \text{ Acumulación PHB} = \frac{[\text{PHB intracelular}]}{[\text{Biomasa Total}]} \times 100\% \quad \text{Ecuación 2.1}$$

### ▪ Cuantificación del glicerol

La concentración de glicerol se determinó en un HPLC (Hitachi LaChrom Elite) equipado con un auto-muestreador (Hitachi LaChrom Elite L-2200), una columna de monitoreo de fermentación Bio-Rad Aminex (150 mm x 7.8 mm), un horno de columna (Hitachi LaChrom Elite L-2300), un bomba HPLC (Hitachi LaChrom Elite L-2130) y un detector de índice de refracción Hitachi LaChrom Elite L-2490. El volumen de inyección fueron 20 µl. La columna se mantuvo a 65°C y la bomba fue operada con un flujo de 0,3 mL min<sup>-1</sup>.

### ▪ Cuantificación de Nitrógeno

La concentración de iones amonio en el caldo de cultivo se midió usando el método de destilación de Kjeldahl [68].

### ▪ Parámetros de crecimiento del microorganismo

Para calcular el tiempo de generación (tg) y la velocidad específica de crecimiento (µ) se usan las Ecuaciones 2.2 y 2.3 [69].

$$tg = \frac{t \ln(2)}{[\ln(N_F) - \ln(N_0)]} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{tg} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde  $t$  corresponde al tiempo de fermentación,  $N_f$  es la concentración final de biomasa y  $N_0$  es la concentración inicial de biomasa.

## 2.4 Resultados y Discusión

Usando una cepa de *Bacillus megaterium* previamente adaptada al consumo de glicerol, crecida en agar con un medio formulado como el ya descrito (sección 2.3.2) y con una concentración de glicerol de 20g/L, se realizaron las fermentaciones (por triplicado), en biorreactor con la metodología propuesta para el seguimiento de la biomasa, consumo de sustrato, nitrógeno y acumulación de PHB. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2-2 y las figuras 2-1 y 2-2.

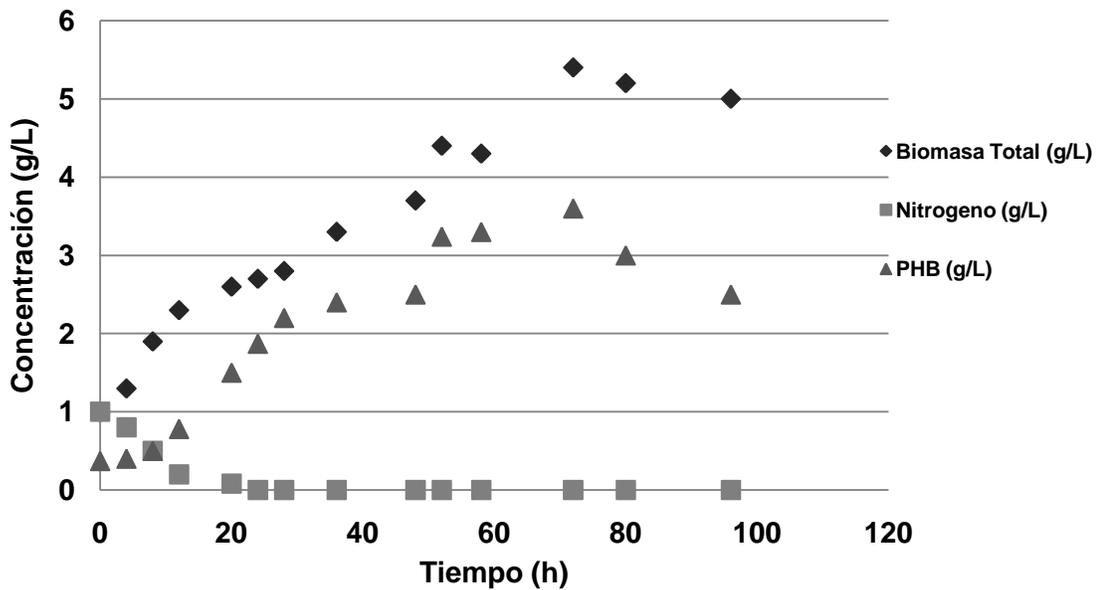
**Tabla 2-2.** Datos experimentales de la fermentación por lotes de *B. megaterium* usando glicerol como fuente de carbono.

Tiempo (h)	pH	Nitrógeno (g/L) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glicerol (g/L)	Biomasa Total (g/L)	PHB (g/L)	Biomasa Residual (g/L)
0	7	1	18,34	1	0,37	0,63
4	6,5	0,8	16,94	1,3	0,4	0,9
8	5,79	0,5	10,13	1,9	0,5	1,4
12	5,14	0,2	3,1	2,3	0,78	1,52
20	5,3	0,08	1,84	2,6	1,5	1,1
24	5,3	0	1,66	2,7	1,87	0,83
28	5,58	0	1,42	2,8	2,2	0,6
36	5,9	0	0,87	3,3	2,4	0,9
48	6,21	0	0,34	3,7	2,5	1,2
52	6,3	0	0,34	4,4	3,24	1,16
58	6,49	0	0,24	4,3	3,3	1
72	6,55	0	0,2	5,4	3,6	1,8
80	6,55	0	0,19	5,2	3	2,2
96	6,55	0	0,2	5	2,5	2,5

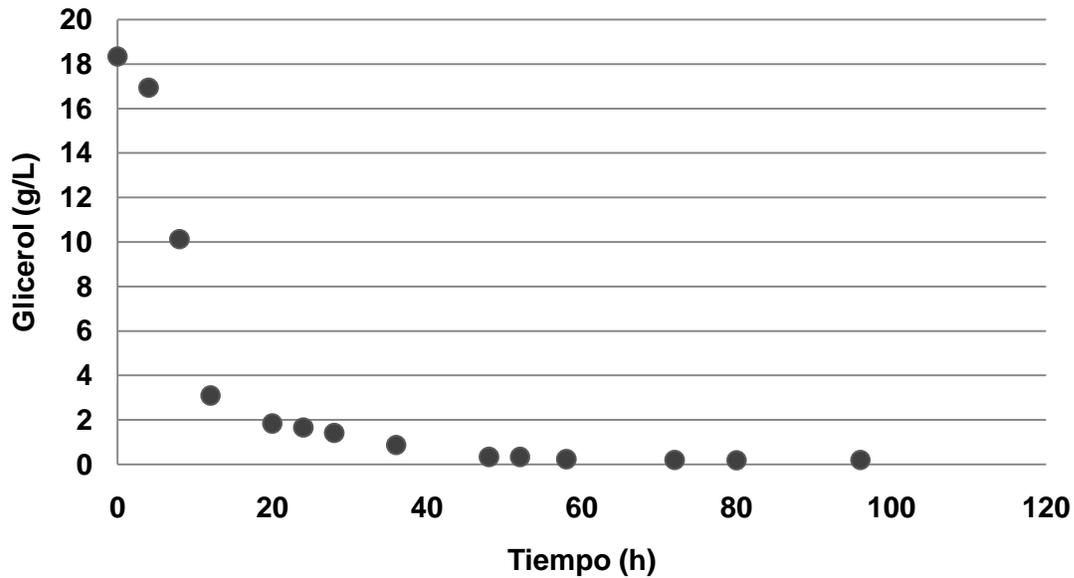
Se observó que la producción de PHB está directamente relacionada, tanto con la concentración de sustrato como con la concentración de la fuente de nitrógeno, que al momento de estar en su mínima cantidad se presentan las mayores concentraciones de PHB de 3,6 g/L, así como se ve un aumento considerable en la cantidad de biomasa presente en el medio (5,4 g/L). El sustrato presenta una disminución acorde al

crecimiento de biomasa, el mayor consumo por parte del microorganismo se presenta entre el inicio de la fermentación y las 20 h de cultivo. Se muestra un consumo total de glicerol hasta las 72 h de 18,1 g/L, exhibiéndose un consumo casi total del sustrato para este momento de la fermentación, por lo que se observa desde este momento la fase de muerte del microorganismo. Al comparar las figuras 2-1 y 2-2, se observa que luego de las 36 h de crecimiento se ha consumido la mayor cantidad del sustrato presente, pero el crecimiento de la biomasa continua a pesar de este hecho. Este comportamiento se puede explicar ya que el PHB puede ser utilizado por el microorganismo como fuente de energía para los procesos metabólicos [70]. Por lo tanto, es probable que los valores de PHB medidos después de la hora 36 no sean el total real que debería ser acumulado por la célula, sino un porcentaje restante luego de su consumo como fuente de energía.

**Figura 2-1.** Perfil experimental de PHB, biomasa total y nitrógeno en una fermentación por lotes de *B. megaterium* con glicerol como fuente de carbono.



**Figura 2-2.** Perfil experimental de consumo de glicerol en una fermentación por lotes de *B. megaterium*.



Con los datos de la tabla 2-2 se construyó la tabla 2-3, donde se presentan el tiempo de generación ( $t_g$ ) y la velocidad máxima de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ), del microorganismo usado. Estos cálculos se realizan para la fase exponencial de crecimiento, como se observa en la figura 2-1. Este experimento no presentó una fase clara de adaptación, por lo que se considera la fase de crecimiento exponencial desde el tiempo inicial hasta las 72 h de fermentación. Teniendo en cuenta esto, se realizó el cálculo para cada intervalo de tiempo en esta fase del crecimiento, encontrándose que el tiempo de generación hallado es de 7,31 h, con un respectivo valor de  $\mu_{max}$  de  $0,09 \text{ h}^{-1}$ .

**Tabla 2-3.** Tiempo de generación y velocidad máxima de crecimiento del *B. megaterium* en glicerol.

$\Delta T$	$t_g$ (h)	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
0-4 h	10,57	0,07
<b>4-8 h</b>	<b>7,31</b>	<b>0,09</b>
8-12 h	14,51	0,05
12-20 h	45,23	0,02
20-24 h	73,46	0,01
24-28 h	76,24	0,01

**Tabla 2-3 (Continúa)**

28-36 h	33,75	0,02
36-48 h	72,70	0,01
48-52 h	16,00	0,04
52-72 h	67,69	0,01

Se encuentran pocos reportes del tiempo de generación y de la velocidad específica de crecimiento del *B. megaterium* usado en la producción de PHB. Al comparar el tiempo de generación y la velocidad máxima de crecimiento específica reportados para el *C. necator* usando como sustrato el glicerol, se tiene que el tiempo de generación de este microorganismo es de 4,65 h y su velocidad máxima de crecimiento específica es de 0,149 h<sup>-1</sup> [71]. Esto permite observar que, en las condiciones en que se realizaron los experimentos en este trabajo, el tiempo requerido para que *B. megaterium* aumente su población celular es mayor y su velocidad específica de crecimiento es menor, lo que podría traducirse en tiempos de fermentación mayores para lograr los mismos rendimientos de biomasa. Adicionalmente se realizaron cultivos del microorganismo en las mismas condiciones inicialmente propuestas, en presencia de glucosa y glicerol, para comparar el crecimiento y la acumulación de PHB en estos dos sustratos. La tabla 2-4 presenta la comparación de la producción de PHB usando glicerol y glucosa como fuentes de carbono. En esta tabla se observa que bajo condiciones controladas, se puede lograr una mayor acumulación de PHB usando el glicerol, comparado con el sustrato tradicional como la glucosa, lográndose porcentajes de acumulación de 62,4 y 59,1 % con el glicerol y la glucosa respectivamente. Al controlar las condiciones como el pH y la saturación de oxígeno en el medio, se logra estimular el metabolismo del microorganismo hacia la producción y acumulación de PHB. Al realizar el control del pH se favorece el equilibrio con el pH interior de la célula, lo que le permite mejores funciones metabólicas ya que no se lleva la energía hacia mecanismos para sobrevivir a ambientes con condiciones de pH no óptimas [72]. Lo anterior acoplado a las condiciones de estrés nutricional permiten obtener mayores productividades de PHB que cuando no se tiene el control del pH y aireación.

**Tabla 2-4.** Comparación de la producción de PHB usando glicerol o glucosa como fuente de carbono [42].

Item	Glicerol 20g/L		Glucosa 20 g/L
	Condiciones sin control <sup>1</sup>	Condiciones controladas	Condiciones controladas
Peso Seco (g/L)	5,7	7,7	7,1
Acumulación de PHB (g/L)	3,4	4,8	4,2
% Acumulación de PHB	60	62,4	59,1
% Consumo de sustrato	59	71,5	57,5
Rendimiento P/S <sup>2</sup> (g/g)	0,3	0,3	0,4

1 Condiciones sin control de pH ni aireación. 2 producto/sustrato consumido

Al comparar los resultados obtenidos de acumulación intracelular de PHB con los valores reportados por otros autores se encuentran porcentajes de acumulación usando un microorganismo como *C. necator* y glicerol como fuente de carbono de 62,7% [71] y 47% [73]. Usando *Bacillus megaterium* y glicerol como sustrato se encuentran porcentajes de acumulación de 60% [19] y de 62% [74]. Estos resultados permiten mostrar que el porcentaje de acumulación de PHB usando *B. megaterium* y glicerol como fuente de carbono obtenido en este trabajo (62,4%) es similar a los resultados reportados por otros autores, lo que muestra la fortaleza del uso del glicerol como fuente de carbono y el uso de un nuevo microorganismo nativo en la producción de PHB. Para comparar los resultados con el uso de glucosa, se encuentran porcentajes de acumulación de *E. coli* del 72% [75] y de 70,04% usando *Bacillus sp* 871 [76]. Con la glucosa como sustrato *B. megaterium* a las condiciones propuestas muestra un rendimiento menor (59,1%) por lo que no es un buen sustrato para usar con este microorganismo.

## 2.5 Conclusiones

El uso de glicerol como fuente de carbono es una alternativa que presenta gran viabilidad, ya que es un residuo que muestra buenos porcentajes de acumulación de PHB por *B. megaterium*. La aplicación de este sustrato permite de esta manera darle un valor agregado y una posibilidad de uso a su gran producción.

Los porcentajes de acumulación de PHB por parte del *B. megaterium* crecido en glicerol, son similares a los reportados por cepas usadas industrialmente, por lo que se abre la posibilidad para el uso industrial del microorganismo y del sustrato.



## **3. Capítulo 3. Aplicación de un sustrato alternativo: Lactosa**

### **3.1 Resumen**

En este capítulo se muestra el análisis de la producción de PHB usando como sustrato la lactosa, azúcar mayoritario de los subproductos de la industria láctea como el lactosuero. Se propone el uso de un diseño experimental central compuesto rotatorio para analizar las concentraciones óptimas del sustrato y la concentración de nitrógeno en la producción de PHB. Se encontró que el control del pH y la aireación constante son fundamentales en la acumulación de PHB intracelular, obteniendo valores de acumulación de PHB de 78% que corresponde a 0,99 g/L de PHB. Se demostró que el uso de lactosa sin hidrolizar, usando *Bacillus megaterium*, como fuente de carbono para la producción de PHB es posible.

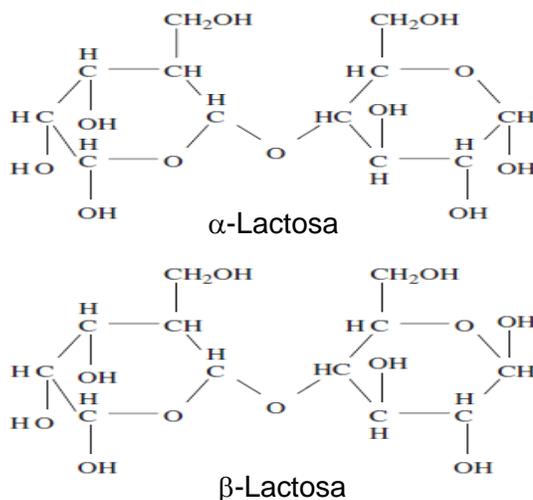
### **3.2 Introducción**

La lactosa es el carbohidrato principal en la leche de los mamíferos. La leche solo contiene otros azúcares como la glucosa, fructosa y otros oligosacáridos. La concentración de lactosa en la leche varía ampliamente entre las especies. La lactosa de la leche de vaca cambia entre especies y factores individuales [76]. La tabla 3-1 presenta la concentración promedio de lactosa y otros compuestos en leches de diferentes mamíferos.

**Tabla 3-1.** Concentración promedio (%) de lactosa y cenizas en la leche de algunos mamíferos [76].

Especie	Agua	Lactosa	Ceniza
Humano	87,4	6,9	0,21
Vaca	87,2	4,9	0,70
Cabra	87,0	4,2	0,86
Camello	87,6	3,26	0,70
Yegua	89,0	6,14	0,51
Reno	63,3	2,5	1,40

La lactosa es un disacárido compuesto por  $\alpha$  o  $\beta$ -glucosa y  $\beta$ -galactosa (figura 3-1). Dependiendo del tipo de glucosa que intervenga en la molécula, la lactosa tiene dos formas isoméricas ( $\alpha$  o  $\beta$ ), que poseen propiedades fisicoquímicas completamente diferentes (solubilidad, cristalización, refracción de la luz, etc.) [77]. Las diferentes estructuras presentan una solubilidad diferente, la forma  $\alpha$  tiene una solubilidad de 7g /100 g a 15 °C, mientras que la forma  $\beta$  tiene una solubilidad de 50g/100g a 15 °C [78].

**Figura 3-1.** Estructura  $\alpha$  y  $\beta$  de la lactosa [79].

La lactosa puede ser fácilmente separada tanto de la leche como del lactosuero en una forma más o menos pura (entre 88.5% y 99,7%) usando procesos de membrana y concentración [80] y se puede usar como ingrediente en comidas y preparaciones farmacéuticas [78]. La lactosa es producida por cristalización directamente del suero de

leche o del lactosuero desproteinizado por ultrafiltración o tratamientos térmicos. El proceso de cristalización cuenta con 3 pasos principales: 1) Concentración de lactosuero por una evaporación al vacío multi-etapas. 2) Cristalización espontánea o por siembra. 3) Remoción de los cristales por centrifugación [81]. Las aplicaciones de la lactosa varían desde el uso como aglomerante y diluyente de pigmentos hasta su uso en la formulación de tabletas de medicamentos gracias a su baja higroscopicidad [76].

Se han explorado estrategias de obtención de PHB, para la reducción en el costo de producción y la obtención de altas productividades [82]. Parámetros como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y el pH del medio, influyen en el metabolismo de las bacterias acumuladoras de PHB, por lo que es necesario realizar optimizaciones del medio. El uso de herramientas estadísticas como el diseño experimental permite realizar estas optimizaciones usando la menor cantidad posible de experimentos [83]–[85].

Durante años se han evaluado diferentes modelos de diseño experimental para la producción de PHB, todos los estudios dirigidos a la optimización en la producción del biopolímero [23], [83], [86]–[88]. El tipo de diseño experimental más usado es un diseño central compuesto, rotatorio, el cual se emplea en este trabajo. El diseño central compuesto (CCD), es un diseño de segundo orden muy popular introducido por Box y Wilson en 1951. Es usado ampliamente por la simplicidad, que permite la estimación de parámetros en modelos completos de segundo orden. Además de diseños exactos, los CCDs tienen altas eficiencias para los criterios de optimización usados [80]. Este diseño experimental está comúnmente constituido por: i) Un conjunto de puntos del diseño factorial completo  $2^k$  o del diseño factorial  $2^{k-p}$ . ii) Un grupo de “puntos axiales”  $2k$  a lo largo del eje, donde cada factor es seleccionado en sus niveles mayores o menores (hacia una distancia  $\pm \alpha$  del centro del diseño) y los otros factores en su nivel central. iii) Un número de puntos centrales. El número total de puntos de diseño necesitado ( $F$ ) es determinado por la Ecuación 3-1 [89].

$$F = 2^k + 2k + C_o \quad \text{Ecuación 3-1}$$

Donde  $k$  es el número de factores y  $C_o$  es el número de puntos centrales.

Alfa es la distancia de los puntos axiales del centro. Se usa para dar la propiedad de ortogonalidad al diseño, minimizar el sesgo que surge si el modelo planteado es de grado dos pero el modelo verdadero es de grado superior y finalmente para dar la propiedad de rotabilidad al diseño [90].

Para hacer este diseño rotatorio, se debe hacer la determinación de alfa, calculándola de la siguiente forma (Ecuación 3-2) [91].

$$\alpha = (F)^{1/4} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Este modelo permite su aplicación en amplios campos, además permite el aumento en la cantidad de puntos a evaluar, agregando puntos axiales y algunos puntos centrales, mejorando la precisión del modelo propuesto.

## 3.3 Materiales y métodos

### 3.3.1 Diseño experimental

Para el modelamiento de la producción de PHB a partir de lactosa como fuente de carbono, se utilizó un diseño central compuesto rotatorio con 13 corridas y 5 réplicas en el centro. Se consideraron dos variables independientes de entrada con 3 niveles cada una a saber, concentración de lactosa (g/L) y concentración de nitrógeno (g/L). Las variables de respuesta fueron la concentración de PHB (g/L) y concentración de biomasa (g/L). Todos los análisis correspondientes a las respuestas se realizaron por duplicado. Las variables independientes y sus niveles codificados evaluados en ambos métodos se muestran en la Tabla 3-2.

**Tabla 3-2.** Valores de las variables independientes de la producción de PHB y su respectivo nivel en el diseño experimental, alfa: 1.41421.

Variables	Niveles		
	-alfa	0	alfa
CL: Concentración de lactosa (g/L)	10	30	50
VN: Concentración de nitrógeno (g/L)	0,1	0,6	1

La lactosa usada para este diseño experimental no se sometió a ningún tratamiento térmico, para evitar su posible hidrólisis. La solución de lactosa concentrada se filtró usando un filtro al vacío con membranas de celulosa-acetato con un tamaño de poro de 0,45µm.

### 3.3.2 Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos experimentales del diseño fueron analizados utilizando el software de Design Expert versión 8.0 (Stat-Ease Inc., EE.UU.). Los efectos lineales y cuadráticos para cada una de las variables de respuesta y su importancia, se evaluaron mediante un análisis de varianza. Estos resultados se obtuvieron a través del ajuste de los datos a la Ecuación 3-3 un modelo de regresión polinomial, donde  $X_i$ ,  $X_iX_i$  y  $X_iX_j$  son los efectos lineales y cuadráticos de las variables de entrada que influyen en la respuesta y  $\beta_o$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ , y  $\beta_{ik}$  son los coeficientes de cada variable. La calidad del ajuste del modelo se evaluó mediante los coeficientes de determinación ( $R^2$  y  $R^2$  ajustado) y el análisis de la varianza (ANOVA) y la evaluación de la significancia del modelo obtenido y de la falta de ajuste ( $P < 0,05$ ).

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i<j<k} \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad \text{Ecuación 3-3}$$

### 3.3.3 Fermentaciones

- Cultivos

Los cultivos de *Bacillus megaterium*, se realizaron en erlenmeyer de 500 mL, conservando las condiciones de agitación a 200 rpm y temperatura de 32 °C. Se usó un pre-inóculo crecido previamente a las mismas condiciones de fermentación con alta concentración de biomasa (aproximadamente 3,5 g/L). Se adicionó 10%v/v del pre-inóculo a cada uno de los experimentos con el fin de intentar asegurar condiciones similares en cada uno de los cultivos. Las fermentaciones se llevaron a cabo de manera simultánea.

#### ▪ **Biomasa**

La biomasa fue medida usando la técnica de peso seco. Muestras de 1 mL fueron recolectadas en un tubo de micro-centrífuga previamente secado y pesado, luego se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min. La biomasa precipitada se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente, el agua sobrante se descartó. La biomasa final fue pesada luego de un secado por 48 h a 60°C.

#### ▪ **Cuantificación de PHB**

La biomasa seca es usada para la metanólisis del monómero de acuerdo al método descrito por Braunegget *et al.* [66] y modificado por Lageveen *et al.* [67]. Aproximadamente 10 mg de masa celular se hicieron reaccionar en un tubo con una solución que contiene 1 mL de cloroformo, 0,85 mL de metanol, 0,15 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0,2 mL de estándar interno (ácido benzoico en metanol). La reacción se llevó a cabo por 140 min a 100°C. Luego de la reacción, se adicionaron 0,5 mL de agua destilada y el tubo fue agitado vigorosamente por 1 min en vortex (Velp Científica). Luego de la separación de fases, de la fase orgánica (fase inferior) se removieron y se transfirieron 500µL a un vial de vidrio. A continuación, se inyectaron 10 µL a un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se usó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 series II, que estaba equipado con una columna capilar HP-5MS (25 m longitud, 0.32 mm diámetro interno). Se usó helio como gas transportador (velocidad de 5cm/min). El inyector y el detector se operaron a 230°C y 275°C respectivamente. Se usó un programa de temperatura para lograr una separación eficiente de los ésteres (120 °C por 5min, rampa de temperatura de 8 °C por min, 180 °C

durante 12 min). Para la identificación y cuantificación del PHB derivatizado se usó un espectrómetro de masas Agilent Technologies.

#### ▪ Porcentaje de acumulación de PHB

El porcentaje de acumulación de PHB está referido a la cantidad de PHB almacenado en la célula, este se calcula usando la Ecuación 3.4

$$\% \text{ Acumulación PHB} = \frac{[\text{PHB intracelular}]}{[\text{Biomasa Total}]} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3.4}$$

### 3.4 Análisis de resultados

Se realizaron los 13 experimentos de manera simultánea, logrando de esta manera la mayor uniformidad, y el mismo control de los factores externos para todos los puntos. La tabla 3-3 presenta los resultados obtenidos de los diferentes.

**Tabla 3-3.** Resultados obtenidos en los experimentos sin aireación constante ni control de pH.

Experimento	Concentración Inicial de Lactosa g/L	Concentración Inicial de Nitrógeno g/L	Concentración de Biomasa g/L	Concentración PHB g/L
1	44,14	0,88	1,67	$3,50 \times 10^{-3}$
2	30,00	0,60	1,27	$4,00 \times 10^{-3}$
3	30,00	0,60	1,00	$3,00 \times 10^{-3}$
4	50,00	0,60	1,20	$2,60 \times 10^{-3}$
5	10,00	0,60	1,33	$3,00 \times 10^{-3}$
6	44,14	0,32	0,60	$8,80 \times 10^{-3}$
7	30,00	0,60	0,07	$0,0 \times 10^0$
8	15,86	0,88	1,27	$1,05 \times 10^{-2}$
9	30,00	1,00	1,07	$7,00 \times 10^{-4}$
10	15,86	0,32	0,60	$7,90 \times 10^{-3}$
11	30,00	0,20	0,27	$5,20 \times 10^{-3}$
12	30,00	0,60	1,13	$5,40 \times 10^{-3}$
13	30,00	0,60	0,13	$4,70 \times 10^{-3}$

### 3.4.1 Concentración de PHB

Después del análisis obtenido por medio del software Desing Expert, se evaluaron los dos modelos recomendados para el ajuste de los datos experimentales, en primera instancia un modelo cuadrático y seguido de un modelo 2FI. Debido a que solo se contemplaron dos variables dependientes no se realizó la eliminación de los factores y las interacciones no significativas ( $P > 0,05$ ).

El valor F del modelo para la concentración de PHB para un ajuste cuadrático fue de 0.85 con un p-valor  $< 0,5566$  lo que implica que el modelo no fue significativo al nivel de confianza del 95%. De hecho este valor se encuentra dentro de los límites de ruido y dispersión del modelo y aunque la falta de ajuste también fue no significativa, el modelo no permite un buen ajuste a los datos, como también lo demuestra los valores de  $R^2$ : 0,37 y  $R^2$  ajustado: -0,06. Los resultados se presentan en la tabla 3-4.

**Tabla 3-4.** Resultados análisis de varianza para la producción de PHB con el ajuste cuadrático.

Ajuste	Valor F	p-valor	$R^2$	$R^2$ ajustado
Cuadrático	0,85	0,5566	0,37	-0,06

Pese a estos resultados se evaluó también un ajuste de los datos por el modelo 2FI, la cual fue sugerido a partir de un análisis de la varianza en el software Desing Expert como se detalla en la tabla 3-5.

**Tabla 3-5.** Análisis de la viabilidad del uso de algunos modelos para el ajuste de los datos experimentales para la producción de PHB.

Modelo	Falta de ajuste	$R^2$	$R^2$ ajustado	
Lineal	0,16	-0,03	-0,67	
2FI	0,17	0,04	-1,62	<b>Sugerido</b>
Cuadrático	0,11	-0,07	-2,54	<b>Sugerido</b>
Cubico	0,03	-0,37	-25,72	Alias

El valor F del modelo para la concentración de PHB para un ajuste con el modelo 2FI (tabla 3-6) fue de 1,18 con un p-valor  $< 0,37$ , resultados similares a lo obtenido para el modelo cuadrático, como también lo demuestra los valores de  $R^2$ : 0,28 y  $R^2$  ajustado: 0,04. Así mismo, al analizar la influencia de las variables dependientes todos los p- valores estuvieron por encima de 0,05, por lo que este modelo no tiene una fuerte influencia en la producción de PHB. Los coeficientes de determinación  $R^2$  y  $R^2$  ajustado negativo muestran que los modelos propuestos no explican nada de la varianza de las variables seleccionadas a partir de su relación lineal. Indicando que la media tiene mejor ajuste que los modelos propuestos.

**Tabla 3-6.** Resultados análisis de varianza para la producción de PHB con el ajuste 2FI.

Ajuste	Valor F	p-valor	$R^2$	$R^2$ ajustado
2FL	1,18	0,37	0,28	0,04

### 3.4.2 Concentración de Biomasa

Después del análisis obtenido por medio del software Desing Expert, se evaluaron los dos modelos recomendados para el ajuste de los datos experimentales, se realizó en primera instancia un modelo cuadrático, seguido de un modelo 2FI. Debido a que solo se contemplaron dos variables dependientes no se realizó la eliminación de los factores y las interacciones no significativas ( $P > 0,05$ ).

El valor F del modelo para la concentración de biomasa para un ajuste cuadrático fue de 1,63 con un p-valor  $< 0,263$  lo que implica que el modelo no fue significativo al nivel de confianza del 95%, además el valor F está alejado del esperado de 1. De hecho este valor se encuentra dentro de los límites de ruido y dispersión del modelo y aunque la falta de ajuste también fue no significativa, el modelo no permite un buen ajuste a los datos, como también lo demuestra los valores de  $R^2$ : 0,54 y  $R^2$  ajustado: 0,21. Los resultados se presentan en la tabla 3-7.

**Tabla 3-7.** Análisis de varianza para la concentración de biomasa con el ajuste cuadrático.

<b>Ajuste</b>	<b>Valor F</b>	<b>p-valor</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>
Cuadrático	1,63	0,263	0,54	0,21

Pese a estos resultados se evaluó también un ajuste de los datos por el modelo 2FI, la cual fue sugerida a partir de un análisis de la varianza en el software Desing Expert como se detalla en la tabla 3-8.

**Tabla 3-8.** Análisis de la viabilidad del uso de algunos modelos para el ajuste de los datos experimentales para la producción de biomasa.

<b>Modelo</b>	<b>Falta de ajuste</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	
Lineal	0,86	0,20	0,021	-
2FI	0,81	0,13	-0,086	<b>Sugerido</b>
Cuadrático	0,96	0,21	0,11	<b>Sugerido</b>
Cubico	0,88	-0,032	0,15	Alias

El valor F del modelo para la concentración de biomasa para un ajuste con el modelo 2FI fue de 1,59 con un p-valor < 0,26, resultados similares a lo obtenido para el modelo cuadrático, como también lo demuestra los valores de R<sup>2</sup>: 0.35 y R<sup>2</sup> ajustado: 0.13 (Tabla 3-9).

**Tabla 3-9.** Análisis de varianza para la concentración de biomasa usando el ajuste 2FI.

<b>Ajuste</b>	<b>Valor F</b>	<b>p-valor</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>
2FI	1,59	0,26	0,35	0,13

Así mismo, al analizar la influencia de las variables dependientes todos los p-valores estuvieron por encima de 0.05, por lo que estas variables no tienen una fuerte influencia en la concentración de biomasa. Los resultados obtenidos tanto para la concentración de biomasa, como para el PHB, se ven afectados por las condiciones no controladas de

aireación y pH, que se presentan como indispensables para la acumulación del PHB dentro de la célula.

Debido a las bajas concentraciones de biomasa y PHB obtenidas en el diseño experimental, y para analizar el efecto del pH y de la aireación usando lactosa como sustrato, se realizó el análisis de los tres puntos que en condiciones sin control presentaron mayor acumulación de PHB. Estos puntos fueron los experimentos 6,8 y 10. Para este caso los experimentos se llevaron a cabo en biorreactores (Biotron, Co) de 1,5 L, con un volumen de fermentación de 600 mL, con 200 rpm de agitación, 5 L min<sup>-1</sup> de flujo de aire, temperatura 32°C y control de pH a 7 por 48 h. Los resultados obtenidos de estos experimentos se muestran en la tabla 3-10.

**Tabla 3-10.** Resultados obtenidos de PHB y biomasa en condiciones controladas de aireación y pH.

Experimento	Concentración inicial de Lactosa (g/L)	Concentración inicial de Nitrógeno (g/L)	Concentración de Biomasa (g/L)	Concentración PHB (g/L)	% Acumulación de PHB
6	44,14	0,32	1,1	0,99	78
8	15,86	0,88	1,8	1,3	72
10	15,86	0,32	1,3	0,67	45

De la tabla 3-10 se puede observar que al realizar los experimentos con condiciones controladas de aireación y pH, aumenta en gran proporción la cantidad de PHB acumulado en las células. En el experimento 8 se logró una acumulación del 72,22%, en el experimento 6 se logró una acumulación del 78% y en el experimento 10 que presentó la menor acumulación fue de 45%. Lo anterior demuestra la necesidad de controlar estas variables para lograr altos rendimientos de acumulación de PHB usando un microorganismo como el *B. megaterium*. Otro estudio reporta una acumulación de PHB 26% usando el mismo microorganismo y lactosa como sustrato [92], lo que es bajo comparado con los valores obtenidos durante esta investigación.

Con los resultados obtenidos de las fermentaciones en biorreactor, se logra apreciar que las mejores condiciones para la acumulación de PHB son las que tienen altas relaciones carbono/nitrógeno, lo que genera el estrés necesario a la célula para la acumulación del

producto deseado. Sin embargo, el uso de bajas concentraciones de lactosa y una concentración de nitrógeno cercana a la máxima también presenta altos rendimientos de acumulación de PHB intracelular, lo que favorece los costos de producción con este sustrato.

Mantener una saturación de oxígeno (por encima de 30%) [18] y una restricción en la fuente de nitrógeno es importante para lograr inducir la ruta metabólica de producción PHB, donde se favorezca la formación de acetilCoA que sirva de sustrato para la formación de PHB. Las limitaciones de nitrógeno además incrementan la relación NADPH/NADP y las enzimas que ayudan a la asimilación de acetilCoA se inhiben, por lo que el flujo de AcetilCoA hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos disminuye, aumentando su ruta metabólica hacia la producción de PHB [93]. Además, el control del pH se ha observado es una variable importante para la mayor acumulación de PHB. Thirumala, 2010 [70] muestra que se presentan cambios en la cantidad de PHB acumulado (1,8 hasta 1,4 g/L de PHB) al variar el pH entre 6,8 y 7,5 [70] encontrando un pH óptimo de 7; lo que permitió usar esta referencia para la aplicación de esa condición de pH en este trabajo.

### **3.5 Conclusiones**

La producción de PHB usando como fuente de carbono lactosa sin hidrolizar es posible, aunque es necesario asegurar el control de pH y una excelente aireación para lograr altas concentraciones y mostrar la posibilidad de este sustrato como sustituto de la glucosa.

El uso del diseño experimental, permite verificar la influencia de las variables seleccionadas sobre las variables de respuesta de interés.

Para lograr resultados con significancia estadística y tener datos confiables para el análisis, es indispensable controlar todas las variables externas que no se miden en el diseño experimental propuesto.

## **4. Capítulo 4: Producción de PHB usando Lactosuero como materia prima**

### **4.1 Resumen**

En este capítulo se presenta la producción de PHB usando lactosuero como materia prima. El lactosuero, un subproducto de la industria láctea que genera grandes problemas de contaminación posee un potencial como materia prima para la obtención de productos biotecnológicos. El PHB se produjo luego de la aplicación de 2 pre-tratamientos, uno térmico-químico y el segundo usando una membrana de ultrafiltración. Ambos tratamientos se utilizaron con el objetivo de reducir la cantidad de proteínas presentes en este sustrato. Se obtuvo una remoción de proteína del 85% usando el pre-tratamiento termo-químico y un 95% usando la ultrafiltración. En las fermentaciones se obtuvieron el 1 y 3% de acumulación intracelular de PHB, cuando no se controlaron las condiciones de fermentación. Al controlar las variables de aireación y pH y usando el lactosuero ultrafiltrado se logró un porcentaje de acumulación de 77% de PHB. El control de aireación y pH son variables fundamentales, para aumentar la acumulación de PHB en el microorganismo usado.

### **4.2 Introducción**

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía tanto de países desarrollados como en desarrollo. En el año 2011 la mayor producción de leche fue en la unión europea con 135.435 toneladas métricas, seguido por Estados Unidos

con 88.950 toneladas métricas e India con 52.500 toneladas métricas [9]. Esta industria genera cantidades importantes de residuos como el lactosuero y la grasa de la leche, cuya disposición requiere grandes inversiones de capital [94].

Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es descartada en forma de lactosuero, el cual retiene cerca de un 55% del total de componentes de la leche, como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales. El lactosuero residual posee una alta carga contaminante, sin embargo se ha encontrado que tiene un buen potencial para convertirse en otros productos de valor agregado (etanol, biopolímeros) desafortunadamente no es reutilizado de manera eficiente [94].

El lactosuero de quesería es un subproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína durante la elaboración del queso. La composición y tipo de lactosuero varían considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y de la tecnología empleada. Los constituyentes mayoritarios del lactosuero se encuentra que la lactosa es el principal componente nutritivo (4,5 % p/v), seguido por las proteínas (0,8% p/v), y lípidos (0,5% p/v) [95].

Según Fedegan (Federación Colombiana de Ganaderos) [96] en el año 2014 la producción colombiana de leche cruda fue de 6.717 millones de litros, de los cuales se obtuvieron 4 mil toneladas de queso para la comercialización. Estas cifras dejan una cantidad de lactosuero residual de aproximadamente 3.600 toneladas, que las industrias de derivados de la leche deben tratar o convertir en otro tipo de producto, que ayude a reducir la cantidad de contaminantes vertidos a las corrientes de agua o suelos del país. Adicional a la cantidad de lactosuero producido a nivel nacional, se le suma la importación de cerca de 9.486,8 toneladas de este subproducto solo en el año 2014 y la exportación de 50 toneladas en el mismo año, este ha sido el año de mayor importación de lactosueros en la última década [97] esta importación se relaciona con los tipos de aplicaciones y las condiciones que se requieren del lactosuero. Las industrias lácteas colombianas se ven afectadas por la cantidad de lactosuero producido, del cual el 45% es desechado en las fuentes hídricas. El restante lactosuero se transforma en bebidas lácteas (45%), en polvo (30%) y en lactosa para aplicaciones alimenticias el (15%), lo que sobra de lactosuero se transforma en concentrados de proteína [98].

Existen distintos tipos de lactosuero, cada uno con composiciones diferentes que dependen del tipo de leche para quesería, del contenido de humedad del queso y de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada. Los lactosueros de quesos más ácidos tienen un mayor contenido de minerales que los de quesos menos ácidos. Estas propiedades son importantes durante el tratamiento térmico y la precipitación de proteínas lactoséricas necesarios para la conversión del lactosuero hacia otros productos de valor agregado [11]. En la Tabla 4-1 se puede detallar la composición nutricional del lactosuero dulce y ácido, observándose que el dulce tiene mayor lactosa y mayor proteína respecto al ácido.

**Tabla 4-1.** Composición de un lactosuero típico ácido y dulce [11].

<b>Componente</b>	<b>Lactosuero dulce [g/L]</b>	<b>Lactosuero ácido [g/L]</b>
Sólidos totales	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Proteína	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfatos	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Es necesario tener en cuenta que en un lactosuero la fracción coagulable por calor consiste predominantemente de las proteínas  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbúmina. La fracción denominada proteosa-peptona y los compuestos a base de nitrógeno no proteico no son coagulables mediante tratamientos térmicos ni mediante manipulación del pH pues, además de ser termoestables, son solubles en su punto isoeléctrico. Lo anterior genera un gran reto para la producción de PHB debido a la necesidad de someter el microorganismo a estrés nutricional que principalmente se resume a la disminución en la cantidad de nitrógeno en relación con la fuente de carbono [12].

El lactosuero es un compuesto altamente contaminante debido a su alta carga orgánica, que se ve reflejada en altos índices de demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO). El lactosuero genera alrededor de 350 mg/L de DBO y cerca

de 680 mg/L de DQO. Este valor es equivalente al de las aguas negras producidas en un día por 450 personas [8].

Diferentes posibilidades para el uso del lactosuero se han propuesto durante años, pero la mayor parte del efluente es descartado. Existe un problema ambiental serio al descartar el lactosuero, ya que este afecta las propiedades físicas y químicas de los suelos, resultando en la disminución en la productividad de los cultivos y al ser arrojado a fuentes hídricas reduce la cantidad de oxígeno disuelto [11]. Por lo tanto, es importante encontrar otras alternativas de aplicación de este residuo hacia fermentaciones donde se obtengan productos de mayor valor agregado y de importancia industrial.

El estudio del lactosuero para su uso en la producción de PHA y en especial de PHB ha sido reportado desde hace varios años, usando microorganismos como *E. coli* nativa y modificadas genéticamente, *Ralstonia eutropha*, *A. latus* y *Cupriavidus necator* [4], [31], [99]–[102]. Pocos estudios por otro lado se han realizado con *Bacillus megaterium* en lactosuero como materia prima [103].

Uno de los principales problemas que se presentan en el uso del lactosuero para la producción de PHB, es la necesidad del control de condiciones para ejercer estrés nutricional con el exceso de fuente de carbono y la restricción de nitrógeno disponible [42]. Teniendo en cuenta esta necesidad de optimizar las condiciones del medio se deben realizar diferentes procesos de pre-tratamiento, donde se logren obtener las condiciones más favorables para el crecimiento del microorganismo productor de PHB (*B. megaterium*).

## **4.3 Materiales y Métodos**

### **4.3.1 Métodos de Pre-tratamiento**

Debido a la necesidad de tener un medio con una baja concentración de nitrógeno para mejorar la producción de PHB, al lactosuero se le debe realizar un pre-tratamiento. El tratamiento previo a la utilización del lactosuero como sustrato para la producción de

PHB debe eliminar la mayor cantidad de proteínas posible, ya que estas son una fuente de nitrógeno y se encuentran en gran cantidad en el sustrato seleccionado. Se proponen entonces dos tipos de pre-tratamiento: uno básico que solo incluye procesos físicos y químicos para lograr la precipitación de proteínas. El segundo un pre-tratamiento usando la tecnología de ultrafiltración para separar la mayor parte de las proteínas.

- **Pre-tratamiento Básico**

Inicialmente se realiza un tratamiento térmico al pH normal al que llega el lactosuero (4-4.5) a 115 °C por 15 min en autoclave, de esta manera se precipitan las proteínas. Luego se realiza una centrifugación a 6000 rpm por 15 min para retirar la mayor cantidad de proteína que se encuentra aún disuelta en el lactosuero. Esta centrifugación se logra debido al tamaño del flóculo obtenido con el tratamiento térmico. Enseguida se procede a realizar el ajuste a pH 7 usando NaOH concentrado 12 M, para no diluir la concentración de azúcares presentes en el lactosuero. Después de realizado el ajuste de pH al de fermentación, es necesario remover las sales que se precipitan mediante una centrifugación a 6000 rpm por 10 min.

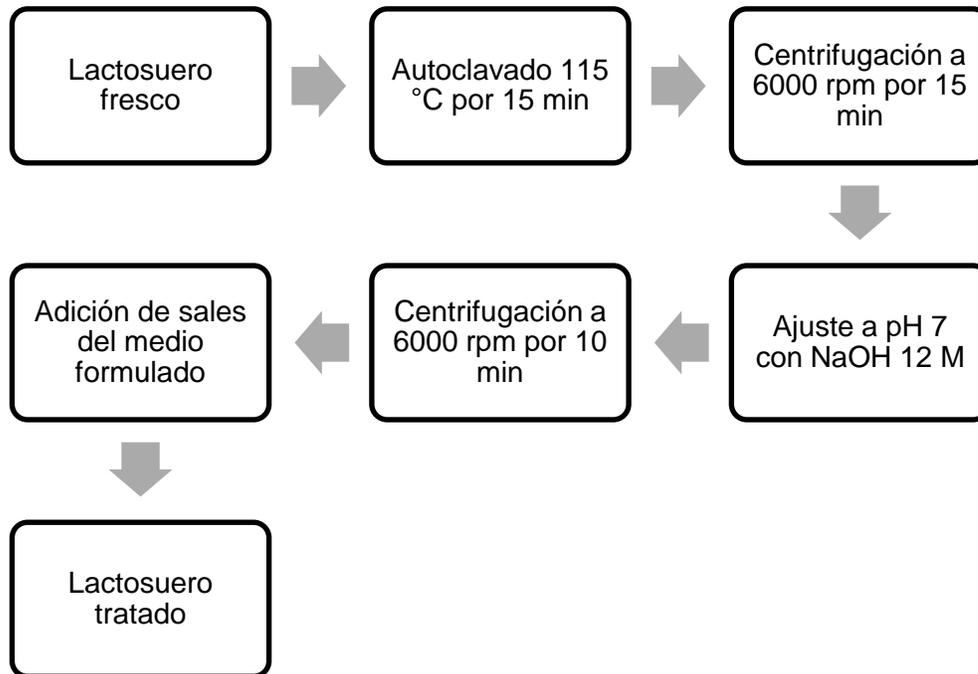
Por último, para evitar realizar un segundo proceso de esterilización que podría degradar los azúcares (glucosa y galactosa) que servirán como fuente de carbono para *Bacillus megaterium* y que incrementará los gastos energéticos del proceso, será necesario mantener las condiciones de asepsia en todos los pasos subsecuentes después de la desnaturalización de la proteína y la hidrólisis de la lactosa en el tratamiento térmico. Por lo tanto se recomienda mantener aséptico todo el material que se requerirá para llevar a cabo todos los pasos posteriores. La figura 4-1 muestra el diagrama del proceso de pre-tratamiento básico del lactosuero para usarse como fuente de carbono en la producción de PHB.

- **Pre-tratamiento usando ultrafiltración**

El pre-tratamiento usando ultrafiltración consiste inicialmente en un tratamiento térmico a 115 °C por 15 min del lactosuero para precipitar las proteínas menos solubles del lactosuero, luego se realiza la filtración por la membrana de diálisis. Seguido, se efectúa la neutralización a pH 7 del lactosuero, luego una centrifugación de las sales para

precipitarlas a 6000 rpm por 10 min y finalmente se esteriliza el lactosuero desproteinizado para su uso como medio de cultivo. El diagrama del proceso de pre-tratamiento se presenta en la figura 4-2.

**Figura 4-1.** Esquema de pre-tratamiento de lactosuero usando procesos físicos y químicos.

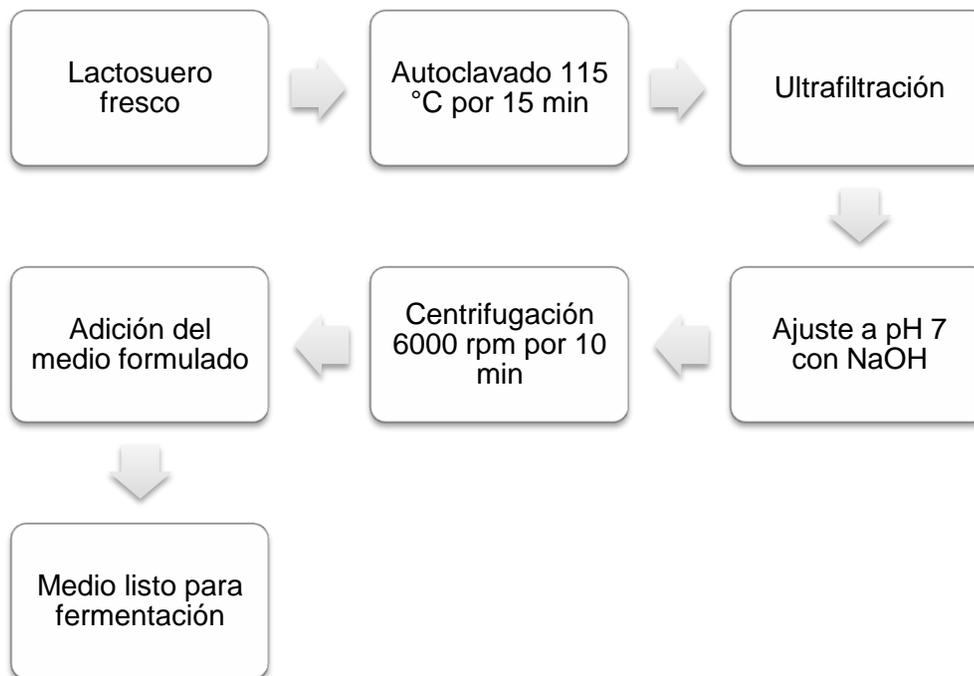


Para este pre-tratamiento, se usó la ultrafiltración para separar las proteínas desnaturalizadas y no precipitadas durante el proceso térmico. La ultrafiltración es el tipo de filtración que utiliza membranas para separar diferentes tipos de sólidos y líquidos. El tamaño de poro no es tan fino como en la nanofiltración y tampoco requiere tanta energía para efectuar la separación. Las membranas de ultrafiltración tienen un tamaño de poro menor que el de las membranas de microfiltración de entre 10 y 1000 Å [104]. Las proteínas solubles del lactosuero como la  $\alpha$ -lactoalbumina y la  $\beta$ -lactoglobulina tienen pesos moleculares de 14,2 kDa y 18,4 kDa respectivamente, que serán sometidas al proceso de ultrafiltración.

Las membranas de ultrafiltración usadas son de tipo diálisis y están dispuestas en forma de capilares (hollow fibers), construidas con materiales plásticos que son porosos semipermeables (celulosa-acetato) para una diafiltración, con un caudal de entrada de

210 mL min<sup>-1</sup>. La diafiltración consiste en un proceso donde una solución con mezcla de proteínas (lactosuero) se recircula usando un flujo cruzado. El permeato que pasó a través de la membrana es reemplazado con una cantidad igual de mezcla fresca. El resultado es el lavado de las proteínas que son completamente rechazadas [105].

**Figura 4-2.** Pre-tratamiento del lactosuero usando ultrafiltración.



### 4.3.2 Fermentaciones

- **Cultivos**

Los cultivos se realizaron en erlenmeyer de 250 mL, conservando las condiciones de agitación 200 rpm y temperatura 32 °C. Se adicionó a todos los experimentos la misma cantidad de pre-inóculo 10 % v/v usando como cepa el microorganismo *B. megaterium* asilado de un estuario en Bahía Blanca, Argentina traída al laboratorio gracias a un intercambio de un estudiante de la Universidad Nacional. Para el cultivo en condiciones controladas se usó un biorreactor (Biotron, Co) de 1,5 L y un volumen de reacción de

600mL. El pH se mantuvo en 7 usando una solución de NaOH al 2,5 N, la aireación se mantuvo en 5 L min<sup>-1</sup>, la agitación fue de 200 rpm y la temperatura se mantuvo a 32 °C.

#### ▪ **Biomasa**

La biomasa fue medida usando la técnica de peso seco. Muestras de 1 mL fueron recolectadas en un tubo de micro-centrífuga previamente secado y pesado, luego se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante resultante se conservó para análisis posteriores. La biomasa precipitada se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente, el agua sobrante se descartó. La biomasa final fue pesada luego de un secado por 48 h a 60°C hasta peso constante.

#### ▪ **Cuantificación de PHB**

La biomasa seca es usada para la metanólisis del monómero de acuerdo con método descrito por Braunegget *et al.* [66] y modificado por Lageveen *et al.* [67]. Aproximadamente 10 mg de masa celular se hicieron reaccionar en un tubo con una solución que contiene 1 mL de cloroformo, 0,85 mL de metanol, 0,15 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0,2 mL de estándar interno (ácido benzoico en metanol). La reacción se llevó a cabo por 140 min a 100°C. Luego de la reacción, se adicionaron 0,5 mL de agua destilada y el tubo fue agitado vigorosamente en vortex (Velp Scientifica) por 1 min. Luego de la separación de fases, de la fase orgánica (fase inferior) se removieron y se transfirieron 500µL a un vial de vidrio. A continuación, se inyectaron 10µL a un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se usó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 series II, que estaba equipado con una columna capilar HP-5MS (25 m longitud, 0.32 mm diámetro interno). Se usó helio como gas transportador (velocidad de 5cm/min). El inyector y el detector se operaron a 230°C y 275°C respectivamente. Se usó un programa de temperatura para lograr una separación eficiente de los ésteres (120 °C por 5min, rampa de temperatura de 8 °C por min, 180 °C durante 12 min). Para la identificación y cuantificación del PHB derivatizado se usó un espectrómetro de masas Agilent Technologies.

#### ▪ **Cuantificación de Proteínas**

La concentración de proteína en el lactosuero se midió usando el método de destilación de Kjeldahl y multiplicando por un factor de 6,38 correspondiente a los lácteos y sus derivados [65].

Con el fin de realizar una cuantificación previa (aproximada) de proteínas presentes en el lactosuero, se aplicó el método Quick Start Bradford (BIO-RAD). Se usó albumina de suero bovina como estándar para la determinación de la cantidad de proteínas presentes en las muestras analizadas [106].

#### ▪ **Cuantificación de los azúcares del lactosuero**

La concentración de glicerol se determinó en un HPLC (Hitachi LaChrom Elite) equipado con un auto-muestreador (Hitachi LaChrom Elite L-2200), una columna ORH-801, un horno de columna (Black & Decker), una bomba HPLC (Hitachi LaChrom Elite L-2130) y un detector de índice de refracción Hitachi LaChrom Elite L-2490. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$ . La columna se mantuvo a 35°C y la bomba se operó con un flujo de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ . La fase móvil usada fue agua levemente acidificada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,0025N.

#### ▪ **Porcentaje de acumulación de PHB**

El porcentaje de acumulación de PHB está referido a la cantidad de PHB almacenado en la célula, este se calcula usando la Ecuación 4.1

$$\% \text{ Acumulación PHB} = \frac{[\text{PHB intracelular}]}{[\text{Biomasa Total}]} \times 100\% \quad \text{Ecuación 4.1}$$

## 4.4 Resultados y discusión

### 4.4.1 Remoción de la proteína por los métodos de pre-tratamiento

Se realizó inicialmente la caracterización básica del lactosuero usado (proveniente de la industria local Normandy), que llega con un pH entre 4 y 4,5 y una alta concentración de sólidos suspendidos. Este hecho hace necesario, antes de realizar cualquier procedimiento, hacer una filtración convencional usando un filtro de tela, para retirar los sólidos iniciales. Luego de esta filtración se realizó la cuantificación de las proteínas. La tabla 4-2 presenta las concentraciones de proteína encontradas en el lactosuero sin tratar y luego de los diferentes pre-tratamientos.

El principal objetivo de realizar los pre-tratamientos es lograr una concentración final de nitrógeno menor a 1g/L, para lograr la relación exceso de fuente de carbono y escasez de nitrógeno para el crecimiento del *B. megaterium* y la acumulación de PHB por parte del microorganismo.

**Tabla 4-2.** Proteína de lactosuero medida por el método de Bradford y Kjeldahl.

	Proteína método de Bradford (g/L)	Proteína método de Kjeldahl (g/L)	% Proteína removida
<b>Lactosuero crudo</b>	7,49	N/R	N/R
<b><u>Lactosuero tratado</u></b>			
<b>pre-tratamiento básico</b>	1,07	N/R	85,71
<b>Lactosuero ultrafiltrado</b>	0,32	0,46	95,73

N/R: no realizado

En la tabla 4-2 se puede observar la remoción de proteína por la aplicación de los métodos de pre-tratamiento propuestos. El uso de pre-tratamiento convencional elimina

el 85% de la proteína presente en el lactosuero, mientras que el pre-tratamiento incluyendo la ultrafiltración elimina el 95% del total de la proteína presente en el lactosuero. Esto nos muestra que usando el método de ultrafiltración se pueden lograr mejores condiciones para la fermentación de *B. megaterium* para la producción y acumulación de PHB. La energía requerida para este proceso es mucho menor si se compara con la cantidad de operaciones unitarias usadas en el pre-tratamiento convencional, que incluye dos procesos de centrifugación.

#### 4.4.2 Fermentaciones y producción de PHB

Se realizaron las fermentaciones a las condiciones establecidas durante 48 horas realizando el seguimiento de la concentración de biomasa, de la acumulación de PHB y finalmente del sustrato consumido a lo largo de la fermentación.

La tabla 4-3 muestra la acumulación de PHB en las células de *B. megaterium*. Los resultados de la acumulación usando el pre-tratamiento básico muestran una menor acumulación de PHB (1%). Este resultado tan bajo se podría deber a la alta cantidad de proteína que aún queda en el lactosuero, por lo que el estrés nutricional por escasez de nitrógeno disponible no se presenta y por ende no se obtienen los resultados esperados. Para el lactosuero ultrafiltrado, el porcentaje de acumulación fue de 3%, a pesar de que se tiene la mayor remoción de proteína, en estos experimentos no se realizó control de las variables como el pH y la aireación, lo que influye en la concentración final como se presentó en el capítulo 2.

**Tabla 4-3.** Producción de PHB y porcentaje de acumulación de acuerdo con el método de pre-tratamiento.

Tipo de pre-tratamiento	Peso seco de biomasa (g/L)	PHB (g/L)	% Acumulación de PHB
Lactosuero tratado pre-tratamiento básico	7,43±7	0,09±0,09	1±1
Lactosuero ultrafiltrado	5,87±0,15	0,19±0,01	3±0

±: Desviación estándar del triplicado.

Otros estudios presentan un porcentaje de acumulación de PHB usando lactosuero como el de Duque *et al.*, 2014 [107] donde usando un cultivo mixto de microorganismos se tiene una acumulación del 26%p/p de PHB [107]. El estudio de Paris *et al.*, 2014 [108] que por el contrario usó una cepa de *E. coli* CML3-1 recombinante, obtuvo porcentajes de acumulación del 21% p/p. En el mismo estudio, analizaron una cepa de *E.coli* P8-X8 modificada genéticamente que alcanzó porcentajes de acumulación de 38,65% p/p [108]. En el estudio de Obruca *et al.*, 2011 [109] donde se usó una cepa de *B. megaterium* CCM-2037, presentó una acumulación máxima de PHB de 27,36% p/p bajo condiciones normales de cultivo [109].

Sabiendo la importancia de controlar las condiciones de fermentación y al observar que la mayor acumulación de PHB se presentó usando el lactosuero ultrafiltrado, se realizó el crecimiento del *B. megaterium* en biorreactor. Las condiciones se mantuvieron a 32 °C, aireación de 5 L min<sup>-1</sup>, agitación de 200 rpm. El control de pH se llevó a cabo con una solución de NaOH 2,5N esterilizada previamente y la fermentación se realizó por 48h. Durante la fermentación se realizó el seguimiento de la biomasa (sección 4.3.2), obteniendo una concentración máxima de 4,27 g biomasa/L. La concentración final de PHB fue 3,28 g PHB/L, de esta manera se obtuvo un porcentaje de acumulación de PHB intracelular del 77%.

La concentración de PHB obtenida durante este estudio fue similar a la obtenida para otros sustratos como el glicerol 62% y 70% para glucosa. Además al realizar la comparación con otros microorganismos y el mismo sustrato como se presentó anteriormente se observa una acumulación mayor del producto. Esto muestra la posibilidad del uso del lactosuero ultrafiltrado como un sustrato viable para la producción de PHB, usando *B. megaterium*. El posible uso del lactosuero como materia prima en este tipo de fermentaciones, permitiría una reducción en la disposición final de este residuo hacia fuentes hídricas o suelos. Este residuo presenta una alternativa como opción para la obtención de productos de valor agregado. Como se explicó en el capítulo 3, la aireación juega un papel fundamental para la producción de los precursores metabólicos del PHB, por lo que nuevamente se muestra el efecto donde se aumenta en

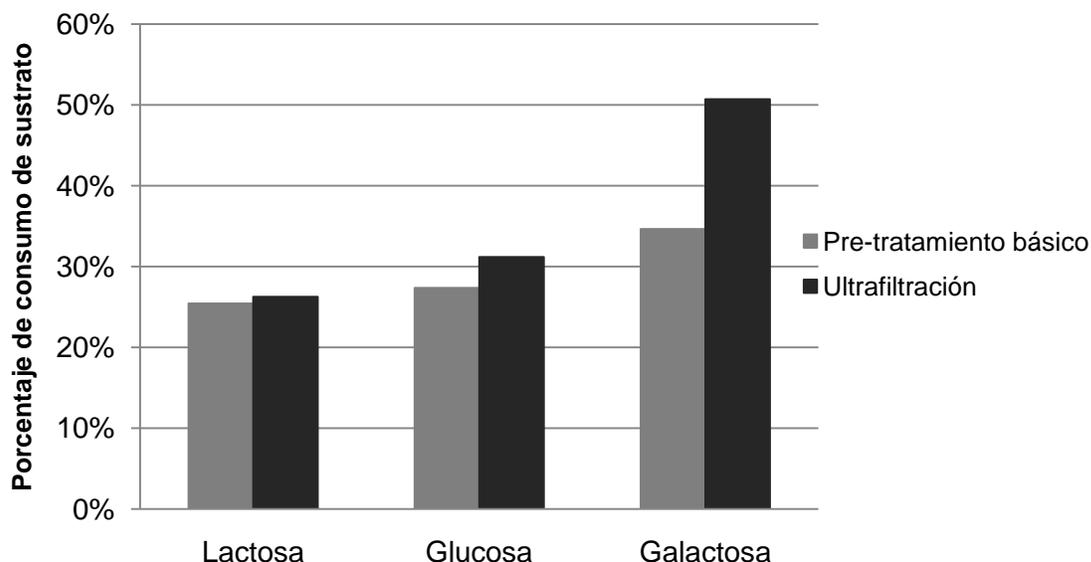
gran proporción la acumulación de PHB al momento de realizar el control de esta variable.

#### 4.4.3 Consumo de Sustrato

Adicionalmente, se realizó la medición del consumo de sustrato por parte del microorganismo en las fermentaciones realizadas, teniendo en cuenta el tipo de pre-tratamiento realizado. La figura 4-3 presenta el consumo de Lactosa, glucosa y galactosa en las fermentaciones usando lactosuero luego de 48 h de cultivo.

En la figura 4-3 se aprecia un consumo de lactosa similar en las fermentaciones realizadas usando el pre-tratamiento básico y el pre-tratamiento con ultrafiltración (consumo aproximado de 24g/L de lactosa). Al comparar con otros estudios donde se presentan consumos de lactosa de 25 g/L [110] y de 15 g/L [109], se observa que el consumo de lactosa del microorganismo es similar a los reportados, lo cual indica que *B. megaterium* nativo puede perfectamente utilizar la lactosa como fuente de carbono principal asimilable. En los diferentes estudios analizados no se presenta el consumo de otros azúcares reductores, ya que el azúcar de mayor contenido en el lactosuero es la lactosa.

**Figura 4-3.** Consumo de sustrato en las fermentaciones con *B. megaterium* usando los dos tipos de pre-tratamiento.



Durante la cuantificación de azúcares por HPLC para la galactosa se presentó un consumo de 32 % del azúcar total en las fermentaciones de pre-tratamiento básico y de 50% en las fermentaciones con ultrafiltración. Para la glucosa se presentaron consumos de sustrato de 30% en las fermentaciones con lactosuero ultrafiltrado y 27% en las fermentaciones usando lactosuero con pre-tratamiento básico. El mayor consumo que se presenta en la galactosa en las fermentaciones usando ambos pre-tratamientos, se debe a que este es un azúcar más simple, que se metaboliza de manera sencilla por este microorganismo. Aunque se comprobó en el capítulo 3 de este trabajo que la cepa de *Bacillus megaterium* usada, consume, asimila y produce PHB usando lactosa filtrada, el microorganismo intentará consumirse inicialmente las fuentes de energía más simples que estén disponibles en el medio como la glucosa y la galactosa.

## 4.5 Conclusiones

El uso de diferentes pre-tratamientos para acondicionar el lactosuero para su uso como sustrato en la producción de PHB, hace posible la producción de este biomaterial. El uso

de mejores tecnologías para el tratamiento del sustrato, permite mejores condiciones de cultivo y la posibilidad de obtener mejores resultados.

El uso del lactosuero como sustrato, muestra la posibilidad de producción de biopolímeros vía fermentación directa. El control de las principales variables de fermentación (i.e. aireación y pH) que afectan la acumulación intracelular del PHB, es necesario para obtener mejores rendimientos producto/sustrato, que permitan a su vez poner este residuo en la mira de la industria para su aprovechamiento hacia la obtención de biopolímeros.



# 5. Capítulo 5: Análisis tecno-económico de la producción de PHB

## 5.1 Resumen

En esta capítulo se presentan diferentes esquemas de simulación para comparar la viabilidad tecno-económica y el impacto ambiental del proceso de producción de PHB desde una fermentación directa usando *B. megaterium*, comparándolo con la producción de PHB, etanol y lípidos a partir de una torta de microalgas de *Chlorella vulgaris* crecida en lactosuero de manera heterotrófica, mostrando el potencial de uso del lactosuero para su aplicación con diferentes tecnologías. Se obtiene un costo de producción de 5 y 3 USD/ kg de PHB, el primero a partir de la pasta de microalgas, el segundo usando el lactosuero pre-tratado con ultrafiltración. El costo de producción del bioetanol obtenido fue de 1,78 USD/kg. Los costos de producción de PHB y etanol son altos comparados con los de los polímeros derivados del petróleo y el bioetanol de caña.

## 5.2 Introducción

El proceso de producción de PHB se divide en 3 grandes etapas que son el pre-tratamiento y acondicionamiento de la materia prima, la fermentación y la extracción y purificación.

### **5.2.1 Pre-tratamiento de materia prima y acondicionamiento**

Los pre-tratamientos realizados dependen del tipo de materia prima que se va a utilizar y el tipo de microorganismo, ya que los sustratos se deben llevar a condiciones que sean asimilables por el microorganismo. Para tal fin, diferentes procesos físicos, químicos y biológicos son utilizados, ya sea para remover impurezas que inhiben la fermentación, para descomponer la materia prima en componentes asimilables por el microorganismo y/o para alcanzar concentraciones necesarias para comenzar la fermentación. Para el lactosuero, los pre-tratamientos y el acondicionamiento del sustrato para la fermentación, se han descrito en el capítulo 4.

### **5.2.2 Fermentación**

Para la etapa de fermentación es de vital importancia tener en cuenta el microorganismo a usar, ya que de esta selección dependen las condiciones finales de fermentación como la temperatura, aireación, control de pH y agitación. Luego se selecciona el régimen en el que se va a llevar a cabo la fermentación, que puede ser por lotes, lotes alimentados o continuo dependiendo del producto deseado.

### **5.2.3 Extracción y separación**

En este nivel, el PHB es extraído del citoplasma celular y para ello la membrana celular es destruida y el PHB es recuperado en solventes. Es así como el PHB queda separado de la biomasa residual y posteriormente es concentrado y purificado. Por lo tanto, el proceso de separación se puede dividir en tres partes: Pre-tratamiento, extracción y purificación [111]. Existen varias alternativas para la etapa de separación. La elección del proceso depende de criterios técnicos, económicos y ambientales. Para el pre-tratamiento se tiene procesos como el calentamiento, un pre-tratamiento ácido o básico y el congelamiento. En la extracción se tienen procesos como extracción con solventes,

usando fluidos supercríticos, digestión enzimática y ruptura celular mecánica. Finalmente para la purificación se usa peróxido de hidrógeno combinado con la acción de enzimas.

### 5.2.4 Simulación

Con el fin de realizar una evaluación técnica, económica y ambiental del proceso de producción de PHB y realizar su comparación con la producción de PHB, etanol y lípidos usando pasta de microalga crecida en lactosuero, se realizaron unas simulaciones con el programa Aspen-Plus v.8.2. Para tal fin se utilizó el microorganismo *B. megaterium* nativo con rendimientos experimentales obtenidos en el desarrollo de este trabajo para la producción de PHB de lactosuero y de pasta de microalgas *Chlorella vulgaris* cultivada en lactosuero y reportada por otros autores [111]. Para la producción de etanol se usó el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. Para los esquemas de producción de PHB, etanol y lípidos a partir de pasta de microalgas se usaron rendimientos reportados en la literatura [19], [20], [112], [113]. Se evaluaron de esta manera 3 esquemas. Uno de producción de PHB usando lactosuero ultrafiltrado y *B. megaterium* como único microorganismo en el proceso. Luego se propone la producción de PHB a partir de la pasta hidrolizada de microalga de *Chlorella vulgaris* cultivada en lactosuero y usando *B. megaterium* como microorganismo productor de PHB. Además, a modo de comparación se propone la producción de etanol usando la misma pasta hidrolizada de microalga crecida en lactosuero y *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo productor de etanol. Para los dos esquemas anteriores se propone la extracción de los lípidos como una etapa inicial del proceso.

Las propiedades físico-químicas de los componentes que no se incluyen en la base de datos de Aspen Tech (compuestos biológicos) se obtuvieron del Instituto Nacional de Estándares Tecnológicos (NIST) [114], y calculados por el método de contribución de grupos propuesto por Marrero y Gani [115]. Las propiedades físico-químicas para los componentes como enzimas y microorganismos se obtuvieron del trabajo de Wooley y Putsche [116].

La evaluación económica se realizó en la herramienta Aspen Plus Economic Analyzer v8.2 usando parámetros específicos para condiciones de Colombia, como costos de materias primas, tasa de retorno, salarios, tasa de interés, todo esto para calcular el costo de producción por unidad de producto. Para los precios de solventes y otros materiales se usaron los reportes de ICIS pricing. Los costos de electricidad, agua potable y vapor de alta y baja presión se establecieron para las condiciones colombianas en 0,1 USD/kWh, 1,252 USD/m<sup>3</sup> y 8,18 UDS/tonelada respectivamente [111]. El precio de la pasta de microalgas se fijó en 0,7 USD/kg (base húmeda), este valor está relacionado principalmente con los servicios y los equipos usados en el proceso de acumulación de biomasa.

El análisis ambiental se efectuó usando el algoritmo de reducción de residuos (WAR por sus siglas en inglés) [117] para el cálculo del potencial de impacto ambiental (PEI). Debido a que el PEI no puede ser medido directamente, se usan diferentes indicadores para calcularlo. El software incluye ocho categorías de impacto: toxicidad humana por ingestión (HTPI), toxicidad humana por exposición dérmica o inhalación (HTPE), potencial de toxicidad terrestre (TTP), potencial de toxicidad acuática (ATP), potencial de calentamiento global (GWP), potencial de agotamiento de ozono (ODP), potencial de oxidación fotoquímica (PCOP) y potencial de acidificación (AP). Para realizar el análisis de impacto ambiental para los diferentes sistemas propuestos, se usaron los balances de materia y energía generados durante la etapa de simulación (Aspen Plus) como una base. Este software es una herramienta útil para analizar el impacto ambiental que se genera únicamente en la etapa de producción y es una base para comparar diferentes procesos y configuraciones.

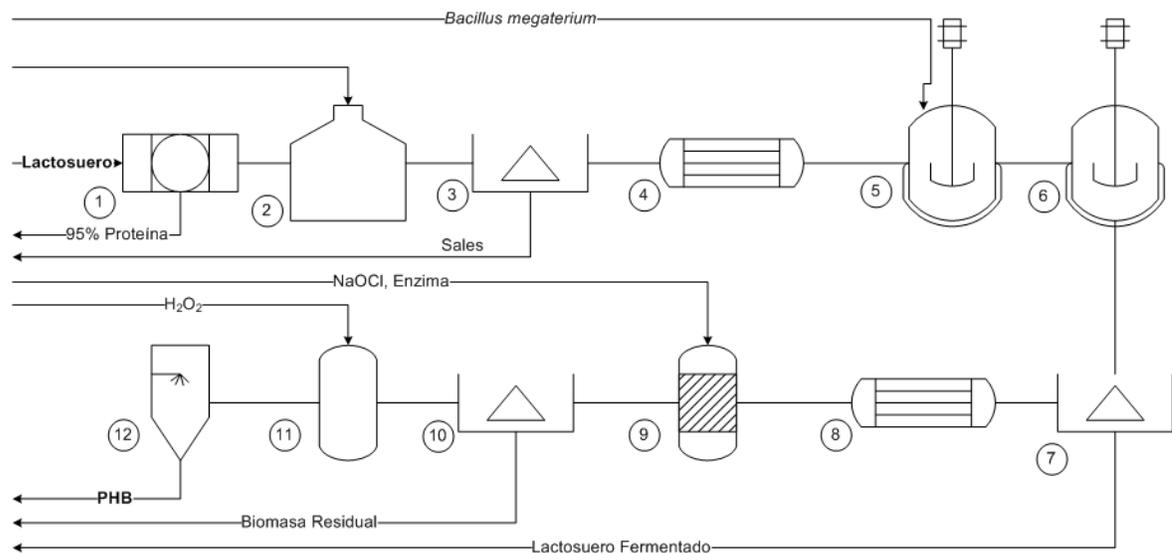
## **5.3 Descripción de los procesos**

### **5.3.1 Producción de PHB por fermentación de lactosuero**

El lactosuero previamente filtrado en una lona para eliminar los sólidos suspendidos de mayor tamaño se filtró usando una membrana de celulosa-acetato, donde se logró una remoción del 95% de proteína presente en el lactosuero. En seguida se realiza un

proceso de neutralización para llevar el medio de cultivo a las condiciones de pH, se realizó una esterilización. Seguido por la adición de la solución de sales de suplemento para el medio de cultivo previamente esterilizada y la adición del microorganismo para la fermentación. La fermentación se llevó a cabo en reactores con agitación a 32°C, con una agitación de 200 rpm y una aireación de 5L min<sup>-1</sup>. Luego del proceso de fermentación se realizó una centrifugación a 6000 rpm para separar el caldo de cultivo de la biomasa producida. La biomasa se sometió a un calentamiento a 85°C, con el fin de desnaturalizar las proteínas y el material genético y desestabilizar la membrana celular de los microorganismos. Para realizar la extracción de PHB se usó el método de digestión con hipoclorito y la enzima *Burkodelia sp PTU9*. Usando una solución con 2 %p/p de enzima, 30 %p/p de hipoclorito de sodio. La biomasa es lavada con agua donde se disuelve el PHB. Para la purificación se usa una solución de peróxido de hidrógeno 1,2 % v/v. Finalmente la mezcla se lleva a un secador por aspersion donde se obtienen los pellets de PHB con una pureza del 99,9% [42]. La figura 5-1 muestra el diagrama del proceso de producción de PHB usando lactosuero ultrafiltrado.

**Figura 5-1.** Diagrama de flujo del proceso de producción de PHB usando lactosuero como materia prima.



1. Membrana de ultrafiltración; 2. Neutralización con NaOH; 3. Centrifugación; 4. Esterilización; 5. Reactor para pre-inóculo; 6. Reactor de fermentación; 7. Centrifugación; 8. Calentamiento, 9. Hidrólisis enzimática; 10. Centrifugación; 11. Purificación; 12. Secado por aspersion.

### 5.3.2 Extracción de Lípidos

La extracción de lípidos se da luego del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en un medio formulado con 40% de lactosuero y sales de suplemento. Luego de la separación de la biomasa del medio, esta se lleva a un secado con aire a 60°C, seguido por una extracción por prensado de los lípidos contenidos en la pasta seca. Para la producción de etanol y PHB a partir de la pasta de microalgas se realiza previamente la extracción de lípidos como se muestra en las figuras 5-2 y 5-3 [118].

### 5.3.3 Producción de PHB a partir de pasta de microalgas

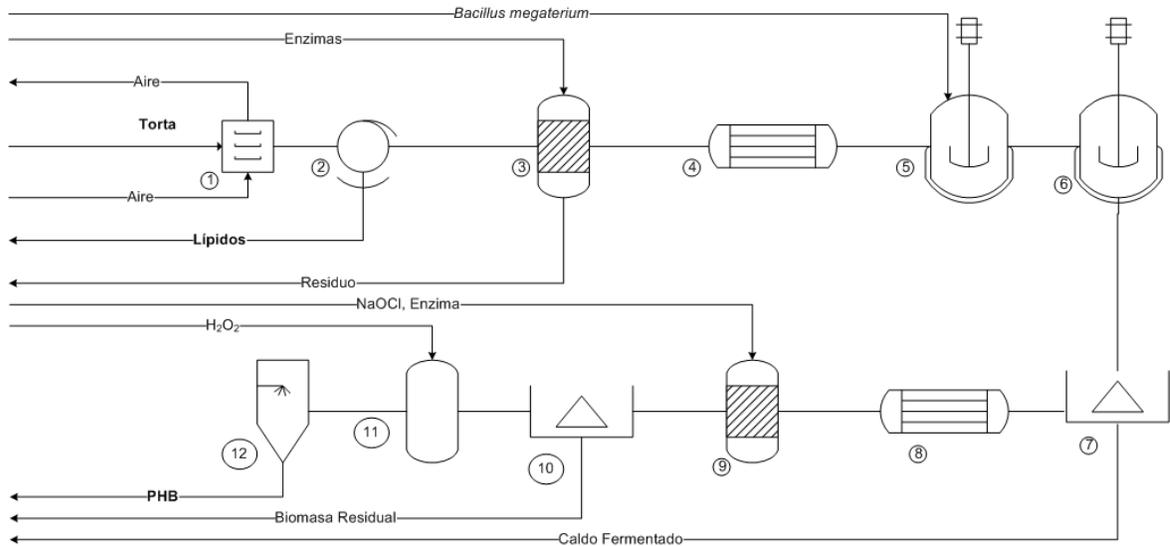
Luego de la extracción de lípidos, se realizó una hidrólisis de la pasta residual de microalgas con un coctel enzimático a 60°C en un reactor agitado de 50L, se realizó la fermentación a 32°C, 200 rpm, 5 L min<sup>-1</sup> de flujo de entrada de aire al reactor, además de un control de pH a 7. Usando *B. megaterium* como microorganismo acumulador de PHB. El medio fermentado se centrifugó para separar la biomasa, que a se calentó hasta 85°C para lograr una mejor extracción del PHB, luego se sometió a una digestión con una solución de la enzima *Burkodelia sp* PTU9 al 2 %p/p e hipoclorito de sodio al 30% p/p. La biomasa se lavó con agua donde se disolvió el PHB. Se realizó la purificación con una solución de peróxido de hidrógeno al 1,2%v/v, esta mezcla se secó por aspersion obteniendo pellets de PHB con una pureza del 99,99%. El diagrama de flujo del proceso de producción de PHB a partir de pasta de microalga *C. vulgaris* usando *B. megaterium* como microorganismo acumulador de PHB se presenta en la figura 5-2 [102].

### 5.3.4 Producción de etanol a partir de pasta de microalgas

Para la producción de bioetanol, luego de la extracción de los lípidos de la pasta de microalga crecida en 40% lactosuero, se realiza la hidrólisis enzimática (detallada en la sección anterior). El caldo obtenido se esterilizó para su uso como medio de cultivo del microorganismo productor de etanol *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación se llevó a cabo en un reactor a 30°C por 24 h. Se requirieron dos etapas de destilación para

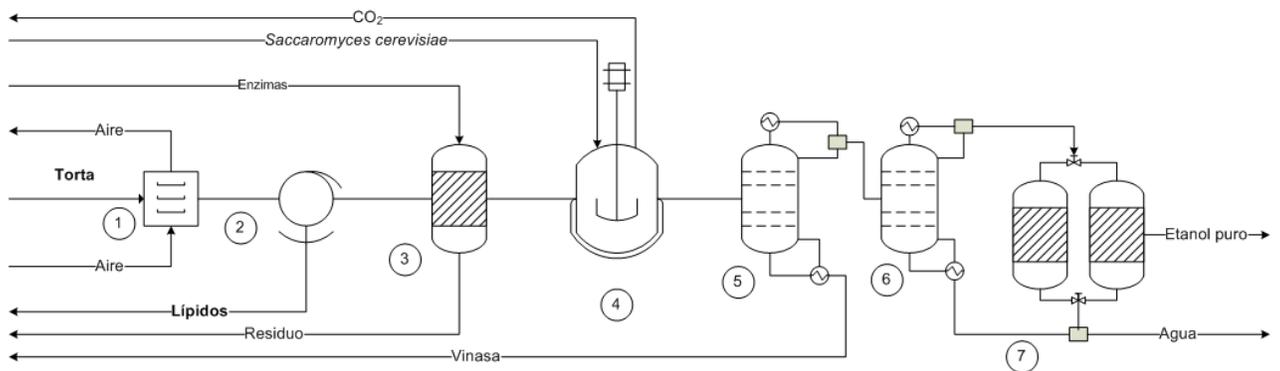
obtener un producto con una concentración del 85% p/p. Finalmente se realizó un paso de deshidratación del etanol usando tamices moleculares, en un proceso de absorción-desorción selectivos para superar la barrera del azeótropo [111].

**Figura 5-2.** Diagrama de flujo del proceso de producción de PHB usando pasta de microalga *Chlorella vulgaris* crecida en lactosuero como materia prima.



1. Secador; 2. Extracción mecánica de lípidos; 3. Hidrólisis enzimática, 4. Esterilización, 5. Reactor de pre-inóculo; 6. Reactor de fermentación; 7. Centrifugación; 8. Calentamiento; 9. Tratamiento enzimático; 10. Centrifugación; 11. Purificación; 12. Secado por aspersión.

**Figura 5-3.** Diagrama de flujo del proceso de producción de etanol usando pasta de microalga *C. vulgaris* crecida en lactosuero como materia prima.



1. Secador; 2. Extracción mecánica de lípidos; 3. Hidrólisis enzimática; 4. Reactor de fermentación; 5. Torre de destilación 1; 6. Torre de destilación 2; 7. Tamices moleculares.

## 5.4 Resultados y Discusión

Luego de realizar las simulaciones respectivas se obtuvieron los balances de materia y energía de los procesos propuestos. Estos resultados se presentan en la tabla 5-1 en la cual se puede comparar el consumo de energía de los procesos propuestos. Sin incluir la extracción de lípidos que se realiza de la misma forma en el proceso de producción tanto de PHB como de bioetanol a partir de la pasta de microalgas, la energía requerida por los procesos analizados es similar. Aunque la cantidad de producto deseado sea menor en el proceso usando lactosuero ultrafiltrado, se debe tener en cuenta que la cantidad de pasta de microalgas usada es baja ya que el rendimiento biomasa/sustrato es de alrededor de 5,2 g/L. Todo esto se ve reflejado en los costos de producción.

**Tabla 5-1.** Balances de materia y energía de la producción de PHB, etanol y lípidos de la pasta de microalgas *C. vulgaris* y la producción de PHB de lactosuero.

Item	PHB (kg/h)	Etanol (kg/h)	Lípidos (kg/h)	PHB (Lactosuero) (kg/h)
<b>Materias Primas</b>				
Lactosuero	N/A	N/A	N/A	100
Pasta <i>C.vulgaris</i>	11,11	11,11	11,11	N/A
Agua	1775,09	3443,00	35,84	2350,20
Solventes	169,51	N/A	N/A	150,30
Microorganismos	58,33	92,60	N/A	58,33
<b>Productos</b>				
Residuos sólidos	214,81	1770,00	17,70	40,9
CO <sub>2</sub>	50,26	8,08	N/A	22,54
Agua	950,00	523,99	9,23	1547,2
Vinaza	846,72	1238,04	N/A	989,07
Producto principal	0,38	6,60	20,03	0,02
<b>Energía (KW)</b>	2920,83	1159,90	255,08	2084,95

N/A: No aplica;

**Tabla 5-2.** Evaluación económica de la producción de PHB, etanol y lípidos de la pasta de microalgas *C. vulgaris* y la producción de PHB de lactosuero.

Característica	PHB <sup>1</sup>		Etanol		PHB <sup>2</sup>		Lípidos	
	Costo (USD/kg)	Contribución	Costo (USD/L)	Contribución	Costo (USD/kg)	Contribución	Costo (USD/L)	Contribución
Materias Primas	0,07	1%	1,58	19%	0,10	3%	2,02	19%
Servicios	3,49	39%	3,98	47%	1,0	33%	5,11	47%
Labor operativa	1,04	12%	0,61	7%	0,39	13%	0,78	7%
Mantenimiento	0,51	6%	0,80	9%	0,19	6%	1,03	9%
Cargas Operativas	0,87	10%	0,15	2%	0,32	10%	0,19	2%
Gastos Generales	1,00	22%	0,70	8%	0,74	24%	0,90	8%
Gastos Administrativos	0,91	10%	0,63	7%	0,34	11%	0,80	7%
<b>Costo Total</b>	<b>8,88</b>	<b>100%</b>	<b>8,45</b>	<b>100%</b>	<b>3,07</b>	<b>100</b>	<b>10,83</b>	<b>100</b>

1: PHB a partir de la pasta hidrolizada de microalga *C. vulgaris* crecida en medio formulado con lactosuero; 2: PHB obtenido por fermentación directa de lactosuero usando *B. megaterium*

De la tabla 5-1 se tienen que los tamaños de los procesos propuestos son 3,3 t/año de PHB, 57,65 t/año de etanol y 174,98 t/año de lípidos todos a partir de pasta de microalga cultivada en lactosuero. Para el PHB producido a partir de la fermentación directa del lactosuero usando *Bacillus megaterium*, se tiene una producción de 0,17 t/año. Al comparar con procesos convencionales como la producción de etanol a partir de caña de azúcar en Colombia durante el 2014 se produjeron 320 t/año de etanol [119] una cifra superior al proceso propuesto. Para el aceite de palma en Colombia en el año 2014 se extrajeron 1 109 586 t/año que comparado con los lípidos extraídos de la pasta de microalga es un valor superior [120]. La compañía Meridian. Inc ubicada en los estados unidos produce 15 000 t/año de PHA [33]. Con los valores anteriores se muestra la necesidad del estudio y mejora los procesos tecnológicos aplicados de manera que se logren obtener cantidades de producto similares y evaluar nuevamente la viabilidad de producción.

El análisis económico presentado en la tabla 5-2, muestra una posibilidad de producción de PHB a partir de pasta de microalgas con un costo de 8,88 USD/kg. Este valor es alto comparado con el precio de venta del PHB que está alrededor de los 3 USD/kg [121] y de los plásticos derivados del petróleo que tienen un precio alrededor de 0,7 USD/kg [122]. Al comparar con el precio obtenido del PHB producido directamente de la fermentación del lactosuero que es de 3,07 USD/kg, se ve la reducción de costos relacionados con los servicios principalmente. Esto se debe a que se necesitan menos corrientes de servicios para la producción directa del PHB, además presenta una mejor perspectiva respecto al producido con pasta de microalgas, ya que se encuentra en un rango más cercano al precio de venta del biopolímero. Al realizar la evaluación económica de la producción de bioetanol donde se obtuvo un valor de 8,45 USD/L, comparado con el precio de venta en Colombia del bioetanol que es de 0,74 USD/L [123], nos muestra que esta alternativa de producción para el biocombustible es económicamente inviable. Este alto costo se debe a los rendimientos de producción de microalgas que son muy bajos (5,2 g microalga/ L de lactosuero) comparados con los cultivos convencionales como la caña de azúcar (95,58 T caña/hectárea sembrada) [63]. El precio de producción de los lípidos es de 10,83 USD/L, que al comparar con el precio del aceite de palma para la producción de biodiesel 0,65 USD/L [124] es alto, por lo que no se muestra como una materia prima competitiva para la producción de biodiesel. Para mejorar todos los procesos propuestos, es

necesario encontrar rutas de separación con menores costos y mejores rendimientos de extracción y purificación. Este análisis además puede ir integrado a la aplicación de cepas genéticamente modificadas de microorganismos tanto para la producción de PHB como las microalgas. Estas cepas presentan mejores rendimientos frente a los sustratos utilizados, de esta manera se pueden lograr rendimientos que reduzcan en mayor manera los costos de producción referidos a las utilidades y la mano de obra.

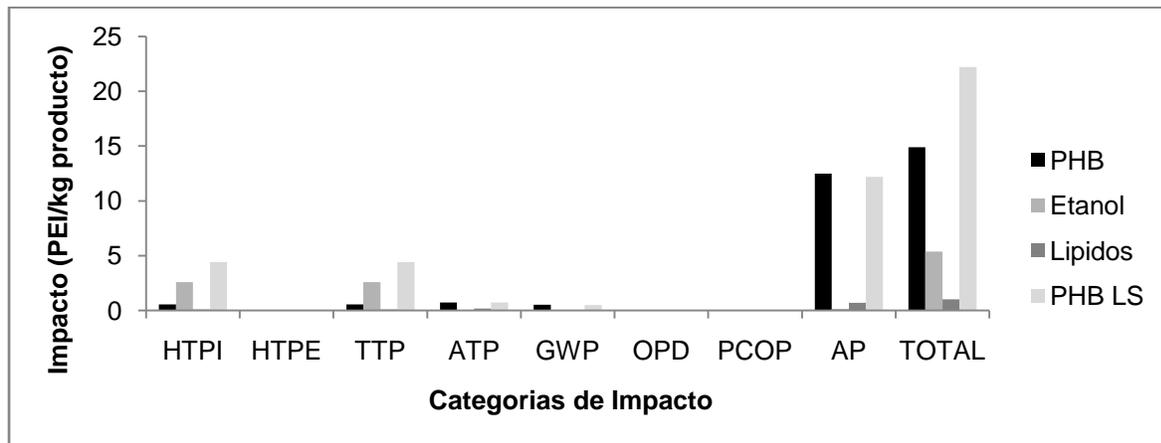
Finalmente se realizó la evaluación ambiental de los procesos y se comparó entre ellos para observar las diferencias más significativas. La figura 5-4 presenta el impacto ambiental de la producción de PHB, etanol y lípidos a partir de pasta de microalgas y de la obtención de PHB por fermentación del lactosuero ultrafiltrado.

Es importante resaltar que con el uso de herramientas como Aspen plus se realiza una evaluación preliminar del diseño conceptual de los procesos, que permite evidenciar las principales falencias de las tecnologías usadas, al realizar la comparación entre estos y generar un primer acercamiento para el desarrollo de un proceso a escala industrial.

El escalado de procesos biotecnológicos requiere grandes estudios y una mayor profundidad, ya que el cambio de las condiciones de crecimiento de los microorganismos se puede ver afectado por la escala del proceso, generando inhibiciones u otras rutas metabólicas no deseadas. Además, el pre-tratamiento de las materias primas requiere estudios de tecnologías que puedan emplearse en escala industrial y obteniendo rendimientos similares a los presentados en la etapa de evaluación preliminar.

Se observa una gran diferencia en el impacto ambiental entre los diferentes procesos. El alto índice de acidificación (AP) en la producción de PHB se debe al uso de solventes como el peróxido de hidrógeno y el hipoclorito de sodio, para la purificación tratamiento de la biomasa, para la producción de PHB. Los índices de HTPI y TTP que se presentan más altos para la producción de etanol y de PHB a partir del lactosuero ultrafiltrado, se deben en gran medida a la disposición de la vinaza que aún posee grandes cantidades de azúcares, y de la proteína del lactosuero que es filtrada y precipitada durante la fase del pre-tratamiento del proceso de producción y que no es considerada como un producto de valor agregado.

**Figura 5-4.** Comparación del impacto ambiental de la producción PHB, etanol y lípidos de la pasta de microalgas *C. vulgaris* con la producción de PHB de lactosuero ultrafiltrado.



PHB LS= PHB producido por fermentación de lactosuero ultrafiltrado. HTPI=Toxicidad humana por ingestión, HTPE= Toxicidad humana por exposición dérmica o inhalación, TTP= Potencial de toxicidad terrestre, ATP= Potencial de toxicidad acuática, GWP= Potencial de calentamiento global, ODP= Potencial de agotamiento de la capa de ozono, PCOP= Potencial de oxidación fotoquímica, AP= Potencial de acidificación.

El alto impacto ambiental presentado por el proceso de producción de PHB usando lactosuero ultrafiltrado se debe en gran medida al uso de solventes y a las corrientes de efluentes que además de altas concentraciones de azúcares como lactosa, tienen altas cantidades de proteínas. Los valores de impacto ambiental para la producción de etanol usando caña de azúcar están en 1,2 PEI/kg de producto. Este valor comparado con el obtenido (5,37 PEI/kg de producto) es menor, lo que se puede explicar ya que en el proceso convencional por caña de azúcar todos los subproductos son usados para la obtención de productos de valor agregado (por el ejemplo, el bagazo se usa en la producción de papel o energía) [105]. El impacto ambiental para la producción de PHB usando como sustrato glicerol es de 4 PEI/kg de producto, este valor bajo se puede explicar debido al uso de un sustrato menos contaminante como el glicerol, donde las corrientes efluentes con altas cargas contaminantes son menores [39]. El aprovechamiento de las corrientes de residuos que poseen altas cargas de proteínas

pueden ser usadas en la producción de alimentos para animales y concentrados proteicos. El lactosuero es un subproducto de la industria alimenticia que al inicio del proceso no tiene contacto con solventes que impidan su aplicación para el consumo. Las corrientes que contienen altas cargas de azúcares como las provenientes de la producción de etanol y de la fermentación del PHB, se pueden usar para el crecimiento de otros microorganismos y obtener otros productos de valor agregado, reduciendo de esta manera la carga contaminante de estos efluentes y su impacto ambiental.

## 5.5 Conclusiones

El uso de herramientas de simulación para hacer aproximaciones a los procesos industriales, permite tener comparaciones con los procesos llevados a cabo a escala laboratorio y observar posibles puntos críticos a tener en cuenta durante el escalado al proceso real.

La producción de PHB así como la de etanol a partir de la pasta de microalga, no presentan una viabilidad económica, ya que los costos asociados a los servicios y cargos operativos son altos, por lo que no se presentan como una alternativa para reemplazar las materias primas convencionales. Es necesario entonces, analizar la posibilidad de estudiar estos productos acoplados a un biorrefinería donde se compartan los costos de los procesos propuestos.

La producción de PHB a partir de lactosuero ultrafiltrado, es una alternativa viable ya que sus costos de producción están cercanos a los precios de venta, lo que permite evaluar un posible escudo hacia procesos de mayor tamaño para tener un margen de ganancias.

El proceso de producción de PHB usando lactosuero ultrafiltrado presenta los mayores impactos ambientales, lo que lleva a buscar alternativas al uso de solventes y al aprovechamiento de todas las corrientes de residuos para lograr mejores proyecciones ambientales.

Realizar una evaluación de las tecnologías empleadas se hace indispensable, debido a la necesidad de reducir los costos, reducir los impactos ambientales y hacer más competitivos los procesos de producción deseados y llegar a hacer del uso de los residuos una alternativa viable para la obtención de biocombustibles y biomateriales.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Los biopolímeros son una alternativa para la sustitución de los polímeros sintéticos. A pesar que la producción de biopolímeros como los derivados del almidón, PLA y PHA se encuentran en etapas de desarrollo, se muestra que la aplicación y uso de estos productos necesita la generación de cadenas de valor agregado. Se resalta que el uso de los biopolímeros tiene beneficios ambientales. Se han encontrado algunos obstáculos especialmente relacionados con los costos de la materia prima que han limitado su uso, por lo que la investigación de nuevas alternativas para mejorar la producción de los biopolímeros debe iniciar en los sustratos y llegar hasta las etapas de separación y purificación.

A pesar de que los costos de pre-tratamiento de los residuos pueden aumentar los costos de producción, los bajos precios de adquisición de estas materias primas pueden compensar estos gastos. En el caso del glicerol y la lactosa los altos rendimientos permiten establecer estos sustratos como fuentes de carbono potenciales para la producción de PHB usando *B. megaterium*.

La aplicación de herramientas como el diseño experimental usando un software como Design Expert, permite definir de manera precisa como afectan las variables seleccionadas el resultado deseado y de esta manera encontrar los valores óptimos. Para el proceso de producción de PHB usando *B. megaterium* no solamente el control de la relación carbono:nitrógeno es fundamental, el control del variables como el pH y la aireación que permite encontrar resultados coherentes, comparables y reproducibles es

primordial; apreciándose esta influencia en mayor medida en las fermentaciones realizadas usando como sustratos lactosa y lactosuero.

La selección de las tecnologías para el pre-tratamiento del lactosuero debe considerar no solamente el rendimiento en la producción de PHB, sino también la cantidad de energía requerida y de operaciones unitarias que están directamente relacionadas con los costos de producción. Todo esto influencia el costo final del producto, haciéndolo menos competitivo en el ámbito comercial con los plásticos derivados del petróleo y con el precio actual de venta del biopolímero producido de sustratos convencionales.

Este estudio muestra que la producción de PHB y etanol a partir de pasta de microalgas, así como el PHB producido por fermentación del lactosuero ultrafiltrado, no es económicamente viable en Colombia cuando se obtienen como únicos productos. Una mejora en el proceso podría permitir que estos productos a partir de las materias primas propuestas estén disponibles en el mercado colombiano, anclado con el aumento en la conciencia y educación ambiental del público.

El uso de herramientas de simulación como una alternativa económica para la aproximación a los procesos reales de la industria, permite predecir el comportamiento del sistema, encontrar puntos críticos que requieran mayores análisis y profundización, llevar los procesos a escala piloto y su posible implementación a escala industrial.

## **6.2 Recomendaciones**

Emplear el lactosuero como materia prima requiere nuevas evaluaciones tecnológicas para mejorar la relación carbono-nitrógeno y lograr obtener mayores rendimientos de PHB. Una reducción en los costos relacionados con el pre-tratamiento de la materia prima y las utilidades usadas en el proceso, es necesaria. El estudio de las opciones de separación y purificación es indispensable, ya que en estas etapas se generan los mayores impactos ambientales debido al uso de solventes, por lo que el análisis de procesos alternativos como los fluidos supercríticos, ultrasonido y microondas deben ser considerados.

Realizar una evaluación de las tecnologías empleadas es importante, debido a la necesidad de reducir los costos y volver más competitivos los procesos deseados, convirtiendo el lactosuero en una alternativa viable para la obtención de biocombustibles y biomateriales.

El PHB tiene variadas aplicaciones que dependen de las propiedades físico-químicas del pellet, por lo que el estudio detallado de estas propiedades es necesario para lograr las características específicas para cada aplicación. Variables como la influencia del tipo de sustrato, microorganismo, tipo de fermentación y tecnología de separación usadas pueden afectar las propiedades finales del biomaterial. Estos son puntos importantes para la estandarización del proceso, y de esta manera identificar los puntos clave durante la producción y lograr una optimización. Los siguientes niveles de investigación, deben incluir además de todo lo anterior el estudio a escala piloto y acoplarlo a esquemas de biorrefinerías.

El PHB generado se podría utilizar como materia prima para la obtención de productos de mucho más valor agregado como el ácido crotónico y otros compuestos derivados que son de interés farmacéutico y medicinal. Al considerar el PHB de esta manera, el valor final del producto generado es tan alto que compensaría los costos de producción del PHB y haría de esta tecnología un proceso rentable.



## Referencias

- [1] G.-Q. Chen, "Industrial Production of PHA," *Plast. from Bact. Nat. Funct. Appl.*, vol. 14, pp. 121–132, 2010.
- [2] A. Sukan, I. Roy, and T. Keshavarz, "Dual Production of Biopolymers from Bacteria," *Carbohydr. Polym.*, no. Accepted Manuscript, 2015.
- [3] T. Keshavarz and I. Roy, "Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 321–326, 2010.
- [4] K. R. Shah, "Optimization and production of Polyhydroxybutarate ( PHB ) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 377–387, 2014.
- [5] A. M. Nath, P. Dixit, A. Bandiya, S. Chavda, and A. J. Desai, "Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, pp. 5749–5755, 2008.
- [6] J. A. Posada and C. A. Cardona, "Propionic acid production from raw glycerol using commercial and engineered strains," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, pp. 2354–2361, 2012.
- [7] R. E. da Costa and E. E. Silva-Lora, "The energy balance in the production of palm oil biodiesel-Two case studies: Brazil and Colombia," 2000.
- [8] F. Carvalho, A. R. Prazeres, and J. Rivas, "Cheese whey wastewater: characterization and treatment.," *Sci. Total Environ.*, vol. 445–446, pp. 385–96, Feb. 2013.

- [9] FEDEGAN, "Federación Nacional de Ganaderos," *Estadísticas*, 2014. [Online]. Available: <http://portal.fedegan.org.co>. [Accessed: 03-Jan-2015].
- [10] A. Koutinas, H. Papapostolou, D. Dimitrellou, N. Kopsahelis, E. Katechaki, A. Bekatorou, and L. Bosnea, "Whey valorisation: a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production.," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 15, pp. 3734–9, Aug. 2009.
- [11] M. González Siso, "The biotechnological utilization of cheese whey: A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–11, Jul. 1996.
- [12] A. R. Prazeres, F. Carvalho, and J. Rivas, "Cheese whey management: a review.," *J. Environ. Manage.*, vol. 110, pp. 48–68, Nov. 2012.
- [13] M. Pescuma, E. M. Hébert, F. Mozzi, and G. Font de Valdez, "Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content.," *Food Microbiol.*, vol. 25, no. 3, pp. 442–51, May 2008.
- [14] S. Sansonetti, S. Curcio, V. Calabrò, and G. Iorio, "Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source," *Biomass and Bioenergy*, vol. 33, no. 12, pp. 1687–1692, Dec. 2009.
- [15] W. B. Silveira, F. J. V. Passos, H. C. Mantovani, and F. M. L. Passos, "Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 36, no. 7, pp. 930–936, May 2005.
- [16] P. M. R. Guimarães, J. A. Teixeira, and L. Domingues, "Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 375–84, 2010.
- [17] J. A. J. A. J. a Posada, L. E. Rincón, and C. A. Cardona, "Desing and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem," *Bioresour. Technol.*, vol. 111, pp. 282–293, May 2012.

- 
- [18] J. M. Naranjo, "Producción de Polihidroxitirato a Partir de Residuos Agroindustriales," Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, 2010. Tesis de Maestría
- [19] J. M. Naranjo, J. A. López, J. C. Higueta, M. A. Cubitto, C. A. Cardona, and M. A. Villar, "Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 17, pp. 250–258, 2012.
- [20] J. A. Posada, J. M. Naranjo, J. A. López, J. C. Higueta, and C. A. Cardona, "Design and analysis of PHB production processes from crude glycerol," *Process Biochem.*, vol. 46, pp. 310–317, 2011.
- [21] D. Meng, Y. Wang, L. Wu, R. Shen, J. Chen, Q. Wu, and G. Chen, "Production of poly ( 3-hydroxypropionate ) and poly ( 3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxypropionate ) from glucose by engineering *Escherichia coli*," *Metab. Eng.*, vol. 29, pp. 189–195, 2015.
- [22] C. Fernández-dacosta, J. A. Posada, R. Kleerebezem, M. C. Cuellar, and A. Ramirez, "Microbial community-based polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment," *Bioresour. Technol.*, vol. 185, pp. 368–377, 2015.
- [23] A. D. Tripathi, S. K. Srivastava, and R. P. Singh, "Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes sp.*," *Biomass and Bioenergy*, vol. 55, pp. 243–250, 2013.
- [24] S. Povolò, P. Toffano, M. Basaglia, and S. Casella, "Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 20, pp. 7902–7, Oct. 2010.
- [25] S. Ram Kumar Pandian, V. Deepak, K. Kalishwaralal, J. Muniyandi, N. Rameshkumar, and S. Gurunathan, "Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei*

- SRKP2: a green chemistry approach.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 74, no. 1, pp. 266–73, Nov. 2009.
- [26] S. Y. Lee, A. P. J. Middelberg, and Y. K. Lee, "Poly ( 3-hydroxybutyrate ) production from whey using recombinant *Escherichia coli*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 19, no. 10, pp. 1033–1035, 1997.
- [27] A. F. Mohidin Batcha, D. M. R. Prasad, M. R. Khan, and H. Abdullah, "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source.," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Sep. 2013.
- [28] S. Kulpreecha, A. Boonruangthavorn, B. Meksiriporn, and N. Thongchul, "Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 107, no. 3, pp. 240–245, 2009.
- [29] P. Kanjanachumpol, S. Kulpreecha, V. Tolieng, and N. Thongchul, "Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 36, pp. 1463–1474, 2013.
- [30] D. J. L. Faccin, M. P. Corrêa, R. Rech, M. A. Z. Ayub, A. R. Secchi, and N. S. M. Cardozo, "Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 3, pp. 325–333, 2012.
- [31] E. Gasser, P. Ballmann, S. Dröge, J. Bohn, and H. König, "Microbial production of biopolymers from the renewable resource wheat straw," *J. Appl. Microbiol.*, pp. 1035–1044, 2014.
- [32] L. Shen, J. Haufe, and M. K. Patel, "Product overview and market projection of emergin bio-based plastics PRO-BIP 2009," Utrecht, The Netherlands, 2009.
- [33] D. Roland-Holst, S. Heft-Neal, R. Triolo, and B. Bijan, "Bioplastics in California: Economic Assessment of Market Conditions for PHA/PHB Bioplastics Produced fom Waste Methane," 2013.

- 
- [34] EPA, "Plastics," *Just the Facts*, 2014. [Online]. Available: <http://www.epa.gov/osw/conserva/materials/plastics.htm>. [Accessed: 03-Mar-2015].
- [35] E. Akaraonye, T. Keshavarz, and I. Roy, "Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 85, no. July 2009, pp. 732–743, 2010.
- [36] F. Razza and F. Degli Innocenti, "Bioplastics from renewable sources: the benefits of biodegradability," *Asia-Pacific J. Chem. Eng.*, vol. 7, no. 3, pp. 2301–s309, 2012.
- [37] G. Chen and M. K. Patel, "Plastics Derived from Biological Sources : Present and Future : A Technical and Environmental Review," *Chem. Rev.*, vol. 112, pp. 2082–2099, 2012.
- [38] C. G. Oates, "Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 8, no. 11, pp. 375–382, 1997.
- [39] D. Phylipsen, M. Kerssemeeckers, M. Patel, J. de Beer, and P. Eder, *Clean Technologies in the Materials sector - Current and future environmental performance of material technologies*. Sevilla: European Commission-Institute for Prospective Technological Studies (IPTS), 2002.
- [40] N. Singh, "Starch in Food: Structure, Function and Applications," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 1, pp. 108–109, 2006.
- [41] P. V. Aguilar, "Obtención de almidón fermentado a partir de yuca ( *Manihot esculenta crantz* ) variedad valencia , factibilidad de uso en productos de panadería," vol. 23, pp. 15–23, 2010.
- [42] J. M. Naranjo V, "Design and analysis of the polyhydroxybutyrate ( PHB ) production from agroindustrial wastes in Colombia," Universidad Nacional de Colombia, 2014. Tesis de Doctorado
- [43] H. Acosta, H. S. Villada, A. Torres, and J. G. Ramírez, "Morfología superficial de almidones termoplásticos agro de yuca y nativo de papa observados por

- microscopía óptica y microscopía de fuerza atómica,” *Inf. Tecnol.*, pp. 718–764, 2006.
- [44] L. Sivoli-Rodriguez and E. Perez-Sira, “Características Físico-químicas y Funcionales del Almidón de Maiz Modificado Químicamente. Formación de Enlaces Cruzados,” *Tecnol. Aliment.*, vol. 38, no. 1, p. 5, 1998.
- [45] C. W. Chiu and J. P. Zallie, “Debranching starch, blending with sugar, water; gelatinizing, molding,” 12-Dec-1989.
- [46] M. Kolybaba, L. G. Tabil, S. Panigrahi, W. J. Crerar, T. Powell, and B. Wang, “Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future,” in *CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting*, 2003.
- [47] International-Starch-Institute, “Starch,” *Starch*, 2014. [Online]. Available: <http://starch.dk/isi/applic/index.asp>. [Accessed: 02-Apr-2014].
- [48] S. Jacobsen and H. Fritz, “Polylactide (PLA)—a new way of production,” *Polym. Eng. ...*, vol. 39, no. 7, pp. 1311–1319, 1999.
- [49] Innovative Industry, “The lactic acid big business,” *Report*, 2010. [Online]. Available: <http://www.innovativeindustry.net/the-lactic-acid-big-business>. [Accessed: 01-Jan-2015].
- [50] PURAC, “Lactides: the missing link for PLA,” in *1st PLA Worl's Congress*, 2008.
- [51] C. Mayet, A. Deniset-Besseau, R. Prazeres, J. M. Ortega, and A. Dazzi, “Analysis of bacterial polyhydroxybutyrate production by multimodal nanoimaging,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 3, pp. 369–374, 2013.
- [52] R. W. Lenz and R. H. Marchessault, “Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology,” *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, 2005.
- [53] D. Bello Gil and H. Brandl, “Selección de Bacterias Productoras de Poli-hidroxitirato,” *ICIDCA*, vol. 41, no. 2, pp. 10–18, 2007.

- 
- [54] A. Steinbüchel and B. Fuchtenbusch, "Bacterial and other biological systems for polyester production," *Tibtech Oct.*, vol. 16, 1988.
- [55] A. Khardenavis, M. Suresh, S. Mudliar, and T. Chakrabarti, "Biotechnological conversion of agro.industrial wastewaters into biodegradable plastics, poly-b-hydroxybutyrate," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 18, pp. 3579–84, 2007.
- [56] R. V. Nonato, P. E. Mantelatto, and C. E. V Rossell, "Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, pp. 1–5, 2001.
- [57] M. Lemoigne, "Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide b-oxybutyrique," *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris).*, vol. 8, pp. 770–782, 1926.
- [58] M. K. Gouda, a E. Swellam, and S. H. Omar, "Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources.," *Microbiol. Res.*, vol. 156, pp. 201–207, 2001.
- [59] W. Wang, W. Zhou, J. Liu, Y. Li, and Y. Zhang, "Biodiesel production from hydrolysate of *Cyperus esculentus* waste by *Chlorella vulgaris.*," *Bioresour. Technol.*, vol. 136, pp. 24–9, May 2013.
- [60] P. I. Nickel, M. J. Pettinari, M. A. Galvagno, and B. S. Méndez, "Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 77, pp. 1337–1343, 2008.
- [61] O. J. Sánchez, L. F. Gutiérrez, and C. A. Cardona, "Production of Biodiesel from Palm Oil by Extractive Reaction," vol. 21, pp. 1231–1236, 2010.
- [62] AMS-USDA, "Glycerin Handling/Processing," *Report*, 2013. [Online]. Available: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5104381>. [Accessed: 03-Jan-2015].

- [63] FedeBiocombustibles, "Información Estadística Sector Biocombustibles," *Ethanol production plants in operation*, 2015. [Online]. Available: [http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar\\_info-titulo-Alcohol\\_Carburante\\_\(Etanol\).htm](http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar_info-titulo-Alcohol_Carburante_(Etanol).htm). [Accessed: 12-Mar-2015].
- [64] Y. K. Leong, P. L. Show, C. W. Ooi, T. C. Ling, and J. C. W. Lan, "Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*," *J. Biotechnol.*, vol. 180, no. 2014, pp. 52–65, 2014.
- [65] R. Z. Sayyed, N. S. Gangurde, and S. B. Chincholkar, "Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB from *Alcaligenes faecalis*," *Indian J. Microbiol.*, vol. 49, no. September, pp. 230–232, 2009.
- [66] G. Braunegg and B. Sonnleitner, "A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass.," *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 6, pp. 29–37, 1978.
- [67] R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, and B. Witholt, "Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates," *Appl Env. Microbiol*, vol. 54, pp. 2924–2932, 1988.
- [68] J. Lynch and D. M. Barbano, "Kjeldahl Nitrogen Analysis as a Reference Method for Protein Determination in Dairy Products.," *J. AOAC Int.*, vol. 82, pp. 1289–1398, 1999.
- [69] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press Inc., 1995.
- [70] M. Thirumala, S. V. Reddy, and S. K. Mahmood, "Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus sp.* isolated from soil and activated sludge.," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 271–278, 2010.
- [71] M. S. I. Mozumder, H. De Wever, E. I. P. Volcke, and L. Garcia-Gonzalez, "A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal

- polyhydroxybutyrate production,” *Process Biochem.*, vol. 49, no. 3, pp. 365–373, 2014.
- [72] M. Villano, M. Beccari, D. Dionisi, S. Lampis, A. Miccheli, G. Vallini, and M. Majone, “Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding,” *Process Biochem.*, vol. 45, pp. 714–723, 2010.
- [73] I. L. García, J. A. López, M. P. Dorado, N. Kopsahelis, M. Alexandri, S. Papanikolaou, M. a. Villar, and a. a. Koutinas, “Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 130, pp. 16–22, 2013.
- [74] J. M. Naranjo, J. A. Posada, J. C. Higueta, and C. A. Cardona, “Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 133, pp. 38–44, 2013.
- [75] K. Khosravi-Darani, Z. B. Mokhtari, T. Amai, and K. Tanaka, “Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, pp. 1407–1424, 2013.
- [76] P. F. Fox, *Advance Dairy Chemistry Volume 3*. Washington, DC: Springer- Science + Business Media, 1997.
- [77] J. Jimenez, “Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la b-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*,” Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 2003.
- [78] G. Schaafsma, “Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition,” *Int. Dairy J.*, vol. 18, pp. 458–465, 2008.
- [79] M. G. Gänzle, G. Haase, and P. Jelen, “Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives,” *Int. Dairy J.*, vol. 18, pp. 685–694, 2008.

- [80] R. R. De Souza, R. Bergamasco, S. C. da Costa, X. Feng, S. H. B. Faria, and M. L. Gimenes, "Recovery and purification of lactose from whey," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 49, no. 11, pp. 1137–1143, 2010.
- [81] P. L. H. McSweeney and P. F. Fox, *Advanced dairy chemistry*, Third Edit., vol. 3, 2009.
- [82] M. I. Campos, T. V. B. Figueiredo, L. S. Sousa, and J. I. Druzian, "The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations," *Ind. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 338–346, 2014.
- [83] S. Khanna and A. K. Srivastava, "Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*," *Process Biochem.*, vol. 40, pp. 2173–2182, 2005.
- [84] S. H. Park, H. J. Kim, and J.-I. Cho, "Optimal central composite designs for fitting second order response surface regression models," *Korea Science & Engineering Foundation*. pp. 1–23, 2003.
- [85] E. Yacuzzi, F. Martín, M. Quiñones, and M. Popovsky, "El Diseño Experimental y los Métodos de Taguchi: Conceptos y Aplicación en la Industria Farmacéutica," *Ser. Doc. Trab. Univ. del Cema*, vol. 258, pp. 1–30, 2013.
- [86] J. Wang and H. Q. Yu, "Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 75, pp. 871–878, 2007.
- [87] S. V. N. Vijayendra, N. K. Rastogi, T. R. Shamala, P. K. Anil Kumar, L. Kshama, and G. J. Joshi, "Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus sp.* CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source," *Indian J. Microbiol.*, vol. 47, no. June, pp. 170–175, 2007.
- [88] C. Hong, H. Hao, and W. Haiyun, "Process optimization for PHA production by activated sludge using response surface methodology," *Biomass and Bioenergy*, vol. 33, no. 4, pp. 721–727, 2009.

- 
- [89] D. Vivanco-Pezantes, "Introducción a planeamientos de experimentos," in *Informe Final de Investigación*, Callao: Universidad Nacional del Callao, 2011, p. 123.
- [90] G. E. P. Box and K. B. Wilson, "On the experimental attainment of optimum conditions," *J. R. Stat. Soc.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–45, 1951.
- [91] P. M. Peregrina Peña, "Empleo de superficies de respuesta para la solución de problemas de inventarios estocásticos," 2000.
- [92] S. Omar, a. Rayes, a. Eqaab, I. Voß, and a. Steinbüchel, "Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain," *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, pp. 1119–1123, 2001.
- [93] S. Y. Lee and J. Il Choi, "Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment," *Waste Manag.*, vol. 19, pp. 133–139, 1999.
- [94] I. M. Mohammed Aider, D.d.H., "Skim acid milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions," *Innov. food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 10, no. 1, pp. 331–341, 2009.
- [95] A. Foegeding and M. McGuffey, "Advances in modifyin and understanding whey protein functionality," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 13, no. 5, pp. 151–159, 2002.
- [96] Federación Colombiana de Ganaderos -FEDEGAN and Fondo Nacional del Ganado-FNG, "Balance y perspectivas del sector ganadero colombiano," 2015.
- [97] Fedegan, "Encuesta Nacional Agropecuaria," 2013. [Online]. Available: <http://portal.fedegan.org.co>. [Accessed: 10-Jul-2014].
- [98] R. A. Parra Huertas, "Lactosuero: importancia en la industria de alimentos," *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellin*, vol. 62, no. 1, pp. 4967–4982, 2009.
- [99] M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, E. Chiellini, S. Casella, P. Horvat, and G. Braunegg, "Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters," *Intech*, vol. Chapter 2, pp. 19–60, 2012.

- [100] M. Koller, "Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly ( hydroxyalkanoate ) Production by *Haloferax mediterranei* on Whey," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2015, p. 8, 2015.
- [101] A. R. Sav, A. K. Mittal, A. A. Thorat, S. Dubey, and U. C. Banerjee, "A Comparative study on the production of PHA by three different *Pseudomonas sp .*," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 10, pp. 940–954, 2014.
- [102] A. Sathish, K. Glaittli, R. C. Sims, and C. D. Miller, "Algae Biomass Based Media for Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Production by *Escherichia coli*," *J. Polym. Environ.*, vol. 22, pp. 272–277, 2014.
- [103] S. Obruca, P. Benesova, S. Petrik, J. Oborna, R. Prikryl, and I. Marova, "Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds," *Process Biochem.*, vol. 49, pp. 1409–1414, 2014.
- [104] M. Mulder, "Basic Principles of Membrane Technology," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 72, no. 3. p. 564, 1998.
- [105] R. W. Baker, *Membrane Technology and Applications*, vol. 1996, no. 73. 2012.
- [106] L. Bio-Rad, "Quick Start-Bradford Protein Assay," Bio-Rad Laboratories, 2014.
- [107] A. F. Duque, C. S. S. Oliveira, I. T. D. Carmo, A. R. Gouveia, F. Pardelha, A. M. Ramos, and M. a M. Reis, "Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition," *N. Biotechnol.*, vol. 31, no. 00, pp. 276–288, 2014.
- [108] J. Pais, I. Farinha, F. Freitas, L. S. Serafim, V. Martínez, J. C. Martínez, M. Arévalo-Rodríguez, M. Auxiliadora Prieto, and M. A M. Reis, "Improvement on the yield of polyhydroxyalkanotes production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 55, pp. 151–158, 2014.

- 
- [109] S. Obruca, I. Marova, S. Melusova, and L. Mravcova, "Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037," *Ann. Microbiol.*, vol. 61, pp. 947–953, 2011.
- [110] A. A. Pantazaki, C. P. Papanephytous, A. G. Pritsa, M.- Liakopoulou-Kyriakides, and D. A. Kyriakidis, "Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8.," *Process Biochem*, vol. 44, pp. 847–853, 2009.
- [111] J. Moncada, J. J. Jaramillo, J. C. Higueta, C. Younes, and C. A. Cardona, "Production of Bioethanol Using *Chlorella vulgaris* Cake : A Technoeconomic and Environmental Assessment in the Colombian Context," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, pp. 16786–16794, 2013.
- [112] J. A. Quintero, M. I. Montoya, O. J. Sánchez, O. H. Giraldo, and C. A. Cardona, "Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case," *Energy*, vol. 33, no. 3, pp. 385–399, Mar. 2008.
- [113] J. J. Jaramillo, J. M. Naranjo, and C. A. Cardona, "Growth and Oil Extraction from *Chlorella vulgaris* : A Techno- Economic and Environmental Assessment," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, pp. 10503–10508, 2012.
- [114] P. Linstrom and W. Mallard, "National Institute of Standards and Technology," 2015. [Online]. Available: <http://webbook.nist.gov>. [Accessed: 01-Jan-2015].
- [115] J. Marrero and R. Gani, "Group-contribution based estimation of pure component properties," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 184, pp. 183–208, 2001.
- [116] R. J. Wooley and V. Pustche, "Development of an ASPEN PLUS physical property database for biofuels components," *Rep. NREL/MP-425-20685*, p. 38, 1996.
- [117] EPA, "Chemical Process Simulation for Waste Reduction: WAR Algorithm," *WAR Algorithm*, 2011. [Online]. Available: [http://www.epa.gov/nrmrl/std/war/sim\\_war.htm](http://www.epa.gov/nrmrl/std/war/sim_war.htm). [Accessed: 01-Mar-2015].

- [118] E. Suali and R. Sarbatly, "Conversion of microalgae to biofuel," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, no. 6, pp. 4316–4342, 2012.
- [119] Asocaña, "Balance Azucarero Colombiano 2000-2015," *Sector Azucarero Colombiano*, 2015. [Online]. Available: <http://www.asocana.org/modules/documentos/5528.aspx>. [Accessed: 29-May-2015].
- [120] Fedepalma, "Evolución histórica anual de Aceite de Palma extraído en Colombia (Toneladas)," *Estadísticas*, 2015. [Online]. Available: <http://sispaweb.fedepalma.org/sitepages/produccion.aspx>. [Accessed: 29-May-2015].
- [121] Alibaba, "PHB prices," *Prices*, 2015. [Online]. Available: [http://www.alibaba.com/product-detail/PHB-polyhydroxyalkanoate\\_953549345.html](http://www.alibaba.com/product-detail/PHB-polyhydroxyalkanoate_953549345.html). [Accessed: 01-Mar-2015].
- [122] ICIS, "Indicative Chemical Prices A-Z," 2015. [Online]. Available: <http://www.icis.com/chemicals/channel-info-chemicals-a-z/>. [Accessed: 03-Jan-2015].
- [123] FedeBiocombustibles, "Indicadores," *Reporte de indicadores económicos*, 2015. [Online]. Available: <http://www.fedebiocombustibles.com/>. [Accessed: 01-Apr-2015].
- [124] Fedepalma, "Precios de Referencia," *Reporte de precios Fondo de fomento palmero*, 2015. [Online]. Available: <http://web.fedepalma.org/precios-de-referencia-del-fondo-de-fomento-palmero>. [Accessed: 01-Mar-2015].