

## Evaluación de la capacidad de *Bacillus megaterium* recombinante *BmGD* para la producción de polihidroxibutirato a partir de glicerol residual

Betancur Valentina, Bonilla Sara, Gómez Javier, Yepes María, Mora Amanda

En este estudio se evaluó la producción de polihidroxibutirato (PHB) a partir de glicerol residual de la producción de biodiesel de aceite de palma, utilizando una cepa modificada genéticamente (*Bacillus megaterium BmGD*) para conferirle la capacidad de sobreexpresar la enzima glicerol deshidrogenasa, involucrada en la incorporación de glicerol a la ruta de la síntesis de PHA en *Bacillus megaterium*. La investigación siguió un diseño estadístico para evaluar diferentes condiciones operacionales (temperatura, fuente de carbono y fuente de nitrógeno) en fermentaciones tipo *batch* a escala de laboratorio, utilizando matraces de 100 mL. El bioproceso también se desarrolló a escala banco utilizando biorreactores de 5 L. En los ensayos en matraces se evaluó la producción de polihidroxibutirato (PHB), la producción de biomasa y el consumo de nitrógeno a diferentes concentraciones de glicerol residual (20; 40 y 60 g L<sup>-1</sup>), sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0; 0,4 y 0,8 g L<sup>-1</sup>) y temperaturas (30; 33 y 35°C). La mayor producción de biomasa fue de 3,75 g L<sup>-1</sup> a 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual; 0,8 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y 35°C para un tiempo de fermentación de 33 h. Para la producción de PHB se encontró que los valores óptimos eran 60 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual, 0,8 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a 35°C durante 24 h de fermentación, generando 14,66 ppm de PHB. Para los ensayos tipo banco la producción de PHB representó el 17,3% del peso seco celular, bajo las siguientes condiciones: glicerol residual 20 g L<sup>-1</sup>, 35°C y 24 h.

**Palabras clave:** *Bacillus megaterium*, *Bacillus megaterium BmGD*, glicerol residual, polihidroxibutirato, fermentación.

### INTRODUCCIÓN

Se estima que el 99 % de los plásticos son derivados del petróleo, el gas natural o el carbón, recursos no renovables. De otro lado, anualmente se producen 300 millones de toneladas de residuos plásticos, de las cuáles se recicla un 9 %, el 12 % es incinerado y el 79 % termina en vertederos o en el medio ambiente (United Nations Environment (ONU), Programme, 2018). Esto genera gran preocupación, pues los procesos de degradación son extremadamente lentos y hacen que los plásticos simplemente se conviertan en partículas y fibras microscópicas (Rojo-Nieto y Montoto, 2017). Lo anterior, indica que este material nunca desaparece, solamente se vuelve más pequeño, generando una acumulación, incluso dentro del cuerpo humano. Las basuras y micropartículas de plástico afectan de manera significativa a organismos y ecosistemas marinos, causando muertes por atrapamientos, sofocación o ingestión de este material (Gregory, 2009).

La presencia de residuos plásticos en los ecosistemas tiene graves repercusiones ambientales, económicas y en la salud de los seres vivos. Ante esto, se han propuesto alternativas para hacerle frente a esta problemática, entre estas el uso de biopolímeros biodegradables entre los que se destacan los PHA. Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros biodegradables y biocompatibles que pueden ser sintetizados por diferentes microorganismos presentes en el medio ambiente, como reservas de carbono y energía. Gracias a sus propiedades fisicoquímicas y termomecánicas, estos bioplásticos, podrían reemplazar a los

plásticos derivados del petróleo (Verlinden *et al.*, 2007). En este estudio, se evaluó la producción de un tipo de PHA, el polihidroxibutirato (PHB) sintetizado por la cepa recombinante *Bacillus megaterium BmGD* y se buscó establecer las condiciones de operación (temperatura, concentración de nitrógeno y concentración de glicerol) que maximizarán los rendimientos en la producción de biomasa y PHB.

## **OBJETIVO**

Evaluar el efecto de diferentes combinaciones entre temperatura, concentración de nitrógeno y concentración de glicerol residual sobre los rendimientos en la producción de biomasa y de PHB, del sistema *B. megaterium BmGD*: glicerol residual.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Cepa bacteriana y medios de activación***

Para el desarrollo del presente estudio se empleó la cepa recombinante *B. megaterium BmGD* de la colección del grupo de investigación Producción, estructura y aplicación de biomoléculas (PROBIOM), construida por Gómez *et al.* (Gómez *et al.*, 2019), a partir de una cepa nativa de *B. megaterium* LVN01 (Sánchez *et al.*, 2012). Las células se cultivaron en medio LB para su activación, compuesto por 1 % de bacto-triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 1 % de NaCl. El medio fue suplementado con cloranfenicol a  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $\text{Cm}_5$ ) e incubado a  $37^\circ\text{C}$ .

### ***Producción de PHB***

Se realizaron fermentaciones en matraces de 100 mL con un volumen de trabajo de 10 mL, para la producción del polímero empleando un medio mínimo de sales (MSM) cuya composición fue:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $3,6 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,2 \text{ g L}^{-1}$ , solución de elementos traza (SET)  $1 \text{ mL L}^{-1}$ , y  $\text{Cm}_5$ , suplementados con concentraciones variables de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0, 0,4 y  $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ) y glicerol residual (20, 40, y  $60 \text{ g L}^{-1}$ ). Para la sobreexpresión de la enzima glicerol deshidrogenasa (*BmGD*) se agregó el inductor isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), a una concentración 1 mM. Los cultivos se incubaron en diferentes temperaturas ( $30$ ,  $33$  y  $35^\circ\text{C}$ ), durante tres tiempos diferentes (24, 33, 48 h).

### ***Procedimientos analíticos***

#### ***Determinación de biomasa y extracción de PHB***

La obtención de la biomasa se hizo mediante el método de peso seco de las células (PSC). Para ello, se tomaron muestras de los medios de cultivos a diferentes tiempos de fermentación y se centrifugaron durante 15 min a  $8000 \text{ xg}$  y  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se usó para la cuantificación de nitrógeno. La biomasa se congeló y se liofilizó, para luego determinar el PSC. La extracción de PHB se realizó por el método propuesto por Jacquet *et al.* (Jacquet *et al.*, 2008) con algunas modificaciones. Las mezclas de biomasa:hipoclorito de sodio:cloroformo se agitaron a 300 rpm y  $40^\circ\text{C}$ , durante 3 h, posteriormente se centrifugaron durante 10 min a  $10000 \text{ xg}$  y  $4^\circ\text{C}$ , para separar las dos fases, recuperando y filtrando el cloroformo que contenía el biopolímero.

#### ***Cuantificación de PHB***

La cuantificación se llevó a cabo con el método del ácido crotónico descrito por Law y Slepecky (Law y Slepecky, 1961). La curva de calibración se construyó a partir de soluciones de PHB puro.

### *Cuantificación de nitrógeno amoniacal*

La cuantificación de nitrógeno se realizó según el método de Berthelot (Solórzano, 1969). La cual consiste en la cuantificación por espectrofotometría ( $\lambda = 640$  nm) del colorante azul de indofenol, el cual resulta de la reacción entre el fenol, el hipoclorito de sodio y el amonio, catalizada por el nitroprusiato de sodio. La curva de calibración se construyó usando soluciones de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de concentraciones entre 0,5 – 4,0 ppm.

### *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos durante el desarrollo de los diseños experimentales, fueron analizados utilizando el programa STATGRAPHICS®. Con la ayuda de este programa se realizaron los análisis de varianza (ANOVA) usando un nivel de significancia de  $p < 0,05$  y se graficaron las superficies de respuesta y los efectos principales de las variables evaluadas. Las variables respuestas en estos estudios fueron la producción del biopolímero y la obtención de biomasa.

### **Escalado a reactor de 5L**

Se llevaron a cabo fermentaciones en biorreactor de tanque agitado a una temperatura de 30°C y una agitación de 250 rpm en el MSM descrito anteriormente, con 0,8 g L<sup>-1</sup> de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol residual. Se tomaron muestras cada 3 horas para realizar la curva de crecimiento. La determinación de la biomasa, la producción de PHB y la concentración de nitrógeno amoniacal se realizaron como se describió en las secciones anteriores.

## **RESULTADOS**

### ***Determinación de biomasa***

La máxima producción de biomasa fue de 3,75 g L<sup>-1</sup>, a las 33 h de fermentación, con una temperatura de 35°C, en un medio de cultivo con 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol y 0,8 g L<sup>-1</sup> de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### ***Cuantificación de PHB***

La máxima producción de PHB fue de 14,66 ppm, a las 24 h de fermentación, con una temperatura de 35°C, en un medio de cultivo con 60 g L<sup>-1</sup> de glicerol y 0,8 g L<sup>-1</sup> de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### ***Cuantificación de nitrógeno amoniacal***

En todos los ensayos se obtuvieron concentraciones finales de nitrógeno amoniacal cercanas a cero, independientemente de la concentración de nitrógeno inicial en el medio.

### **Escalado a reactor de 5L**

Se observó una etapa de crecimiento exponencial del microorganismo entre las 20 y 33 h. La máxima producción de biomasa fue de 3,3 g L<sup>-1</sup>, a las 33 h. El tiempo óptimo para la producción del polímero fue a las 24 h, con 0,57 g L<sup>-1</sup> de PHB.

## **DISCUSIÓN**

El glicerol residual es un sustrato favorable para el crecimiento del microorganismo y la producción de PHB (Gómez *et al.*, 2016); Sin embargo, como puede observarse en el estudio, cuando se encuentra en altas concentraciones puede generar un efecto inhibitorio para la producción de biomasa.

La producción de PHB en el sistema *BmGD*:glicerol residual no fue tan alta como se esperaba, obteniendo 14,66 ppm de PHB con un rendimiento de 1,21%; cuando

se han reportado hasta 3,06 g L<sup>-1</sup> para la producción de biomasa en *B. megaterium* nativo (Gómez *et al.*, 2016) con un rendimiento de hasta el 86,69%.

En el estudio se usó (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como única fuente de nitrógeno, para la fermentación. La cantidad de biomasa obtenida permite confirmar que, a diferencia de la cepa parental de *B. megaterium*, la cepa recombinante no requiere extracto de levadura para su crecimiento, lo que tiene un impacto positivo en los costos del proceso, representando una ventaja para la producción industrial de PHB.

En todos los análisis realizados, se evidencia un consumo casi total del nitrógeno después de 24 h, por lo que es pertinente realizar otros estudios con el fin de verificar que la fuente de nitrógeno ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) no sea un limitante o inhibitorio para el crecimiento de la cepa y la producción de PHB.

## CONCLUSIONES

El sistema *B. megaterium* BmGD:glicerol residual puede llegar a ser una buena alternativa frente al sistema de la especie nativa, al tener la ventaja de no depender del extracto de levadura para el crecimiento de la biomasa.

Al desarrollar el diseño experimental para evaluar las concentraciones de glicerol y nitrógeno, la temperatura y el tiempo de proceso, requeridos para una producción óptima de PHB, se obtuvo como mejores condiciones operacionales: 60 g L<sup>-1</sup> de glicerol y 0.8 g L<sup>-1</sup> de nitrógeno y 33 h de fermentación a 35°C.

## REFERENCIAS

- Gómez Cardozo, J. R., Mora Martínez, A. L., Yepes Pérez, M., y Correa Londoño, G. A. (2016). Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *International Journal of Polymer Science*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6541718>
- Gómez, J., Velasco, R., Del Cerro, C., y De la Mata, I. (2019). Engineering of *Bacillus megaterium* for improving PHA production from glycerol. *Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 27(3), 64–72
- Gregory, M. R., 2009. Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 2013–2025.
- Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S., y Wang, S. S. 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* 39(1): 15–27.
- Law, J. H., & Slepecky, R. a. (1961). Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82(1), 33–36.
- United Nations Environment Programme. (2018). Septiembre 15, 2019, de United Nations. Sitio web: <https://www.unenvironment.org/interactive/beat-plastic-pollution/es/>
- Sánchez, S. A., Marín, M. A., Mora, A. L., y Yepes, M. del S. (2012). Identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in soils contaminated with fique wastes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(2), 89–100.
- Solórzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural seawaters by the phenol-hypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 799–801
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335>.