



Effect of culture medium composition on the growth and biopolyesters production by the marine bacterium *Saccharophagus degradans*

Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y producción de biopoliésteres por la bacteria marina *Saccharophagus degradans*

Karen V. Enríquez-López¹, Jorge R. Robledo-Ortíz², Orfil González-Reynoso¹, Berenice Clifton-García², Yolanda González-García²

¹Departamento de Ingeniería Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, 44430, Mexico.

²Departamento de Madera Celulosa y Papel, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, 44430, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: yolanda.ggarcia@academicos.udg.mx (Y. González-García).

Article history:

Received: 29 March 2023 / Received in revised form: 5 July 2023 / Accepted: 15 July 2023 / Published online: 1 October 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.4.1>

ABSTRACT

The production of biomass and biopolyesters (polyhydroxyalkanoates) by the marine bacterium *Saccharophagus degradans* from: glucose, starch, glucosamine, and xylose were studied. The effect of yeast extract, trace elements, vitamins, and initial concentration of each carbon source on biomass production was evaluated. The addition of yeast extract, together with trace elements, increased the biomass production by 5-fold, obtaining the maximum values when using an initial substrate concentration of 20 g/L for: starch, 8.61; glucosamine, 7.06; and xylose, 4.47 (g dry cell weight/ L). From glucose at 40 g/L the maximum biomass production was 9.07 g/L. Next, the biopolymer production under nutrient-limiting conditions (by N, P, S and Mg) was investigated, as well as the ability of *S. degradans* to produce copolymers from precursors. The biopolyester produced in all cases was poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). Different accumulation percentages (g PHB/100 g biomass) were achieved depending on the carbon source used: glucose, 27.72; starch, 18.11; glucosamine 3.33; there was not

biopolymer accumulated from xylose. Finally, the PHB produced from each carbohydrate was characterized, presenting molecular weights between 53 and 58 KDa, and fusion temperatures between 164 and 174°C.

Keywords: bioplastic, biopolyester, polyhydroxyalkanoate, polyhydroxybutyrate, *Saccharophagus degradans*, trace elements

RESUMEN

Se estudió la producción de biomasa y biopoliestéres (polihidroxicanoatos) por la bacteria marina *Saccharophagus degradans* a partir de: glucosa, almidón, glucosamina y xilosa. Se evaluó el efecto del extracto de levadura, elementos traza, vitaminas y concentración inicial de cada fuente de carbono sobre la producción de biomasa. La adición de extracto de levadura, en conjunto con los elementos traza, incrementaron 5 veces la concentración de biomasa, obteniéndose los valores máximos a partir de la concentración inicial de sustrato de 20 g/L para: almidón, 8.61; glucosamina, 7.06; y xilosa, 4.47 (g de células secas/L), mientras que para glucosa fue a 40 g/L (9.07 de células secas/L). Posteriormente se investigó la producción del biopolíester en condiciones de limitación nutrimental por N, P, S y Mg, así como la capacidad de *S. degradans* para sintetizar copolímeros a partir de precursores. El polímero producido en todos los casos fue poli(3-hidroxibutirato) (PHB). Se alcanzaron diferentes porcentajes de acumulación (g PHB/ 100 g de biomasa) dependiendo de la fuente de carbono usada: glucosa, 27.72; almidón, 18.11; glucosamina 3.33; a partir de xilosa no se acumuló biopolímero. Finalmente, el PHB producido a partir de cada carbohidrato fue caracterizado, presentando pesos moleculares entre 53 y 58 KDa, temperaturas de fusión entre 164 y 174°C.

Palabras clave: bioplásticos, biopolíester, elementos traza, polihidroxicanoato, polihidroxibutirato, *Saccharophagus degradans*

1. INTRODUCCIÓN

Las diversas propiedades de los polímeros derivados del petróleo, comúnmente llamados plásticos, les han permitido convertirse en productos funcionales en numerosos sectores industriales (Danso *et al.*, 2019). Debido a que poseen tenacidad, flexibilidad (Pérez-Andrés *et al.*), resistencia a la degradación y barrera permeable, se han podido posicionar como los principales materiales para el embalaje de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos (Reichert *et al.*, 2020). Sin embargo, su uso y producción emiten 400 millones de toneladas de gases efecto invernadero por año y se estima que hasta 12.7 millones de toneladas de sus residuos llegan a los mares, mientras que la contaminación a los suelos puede ser hasta 23 veces mayor (Shen *et al.*, 2020; Geyer *et al.*, 2017; Jambeck *et al.*, 2015).

Con el fin de reducir el impacto ambiental ocasionado por la acumulación de plásticos en el ambiente, en los últimos años ha sido de interés la producción de biopolímeros de bases biológicas, que se asemejen en su comportamiento mecánico a los plásticos convencionales, y que sean biodegradables al finalizar su vida útil. Entre estos

biopolímeros destacan los polihidroxicanoatos (PHA's) que son biopoliésteres de ácidos hidroxialcanoicos, siendo el polihidroxibutirato (PHB) (poliéster de ácido hidroxibutírico) el más representativo. Estos biopolímeros son similares a plásticos como el polipropileno y el polietileno, pero se obtienen a partir de microorganismos. Estos, se producen dentro de las células microbianas (principalmente bacterias) cuando en el medio de cultivo existe una cantidad muy limitada de algún nutriente esencial para su crecimiento (N, P, S, Mg, etc.) y una cantidad considerable de fuente de carbono (Kumar *et al.*, 2019). Algunos de los principales retos en la investigación sobre la producción de PHA's es evaluar su biosíntesis a partir de diferentes fuentes de carbono (Koller, *et al.*, 2020). Por lo tanto, el estudio de cepas capaces de asimilar varios carbohidratos es importante, así como identificar otros componentes del medio de cultivo que tengan un efecto favorable en cuanto al crecimiento microbiano y la eficiencia de producción del polímero (Sabapathy *et al.*, 2020). En este sentido, la bacteria marina *Saccharophagus degradans* ha sido estudiada por su capacidad para asimilar una gran variedad de carbohidratos simples y complejos (Kourmentza *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2012), siendo investigados sus sistemas enzimáticos para la degradación de diferentes polisacáridos (Sawant *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha comprobado que esta bacteria produce PHB a partir de sustratos complejos (Alva-Munoz, *et al.*, 2008, González-García *et al.*, 2011), aunque con una baja productividad. Diferentes estrategias, como el cultivo por lote alimentado, utilizando glucosa como fuente de carbono, han podido alcanzar un porcentaje de acumulación de PHB de hasta 52.8% (peso seco), como lo reportado por Sawant *et al.* (2017) y de hasta 19.2% a partir de celulosa microcristalina. Para obtener una producción de polímero más eficiente, es importante no solamente investigar la etapa de acumulación bajo condiciones de limitación nutricional, sino también la etapa de producción de biomasa en condiciones sin limitación. Lo anterior es debido a que, en primer lugar, se requiere obtener una gran cantidad de células, para lo cual es necesario evaluar el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento microbiano.

Con el fin de obtener un mayor entendimiento sobre los requerimientos nutricionales para el crecimiento y producción de PHA's por *S. degradans*, en el presente estudio se evaluó: el efecto de factores de crecimiento y oligoelementos sobre el crecimiento de la bacteria; el uso de diferentes carbohidratos para producir el polímero; su capacidad de sintetizar copolímeros, así como el efecto de la limitación de diferentes nutrientes sobre su acumulación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo y medio de cultivo

La bacteria *Saccharophagus degradans* se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). La cepa, fue activada en 1 mL de medio Marino Difco 2216 e incubada a 30°C por 24 h. Posteriormente, con el fin de tener un stock de la cepa, dicho cultivo se inoculó en 100 mL del mismo medio (en un matraz Erlenmeyer de 500 mL) y se incubó a 30°C y 200 rpm por 24 h. La biomasa microbiana generada se transfirió a microtubos estériles de 2 mL (1 mL de cultivo por microtubo) los cuales fueron centrifugados. Se

descartó el sobrenadante y a la biomasa se le agregó 1 mL de solución estéril de glicerol al 20%. Por último, los microtubos se congelaron a -20°C para su uso posterior.

Para las posteriores fermentaciones, se diseñó un medio de cultivo mineral con la siguiente composición: NH_4Cl , 5.40 g/L; K_2HPO_4 , 1.40 g/L; Na_2SO_4 , 0.24 g/L; MgCl_2 , 0.12 g/L, solución concentrada de sales, 100 mL/L; y Tris-HCl 1M (pH 7.6), 100 mL/L. La solución concentrada de sales se preparó con los siguientes compuestos (g/L): NaCl, 230; KCl, 7.5; y CaCl_2 , 1.30. Como fuente de carbono se consideró inicialmente glucosa en 5 g/L, y posteriormente se estudiaron otros carbohidratos en diferentes concentraciones, así como la adición de factores de crecimiento y elementos traza, tal como se explica más adelante (secciones 2.2 y 2.3).

En cuanto a las condiciones de cultivo, todos los experimentos realizados en la presente investigación se llevaron a cabo en matraces de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, inoculados con un 10% de inóculo (v/v), y se incubaron a 30°C y 200 rpm.

2.1.1 Preparación del inóculo

Se utilizó un microtubo del stock mencionado previamente para inocular 100 mL del medio de cultivo mineral. El inóculo fue incubado por un periodo de 24 h, y al término de este tiempo se añadió a los cultivos. Para la experimentación con diferentes carbohidratos, el inóculo se desarrolló en la misma fuente de carbono que la del medio correspondiente.

2.2 Efecto de factores de crecimiento y elementos traza sobre la producción de biomasa

Se diseñó un experimento factorial 2^3 con 2 réplicas para evaluar el efecto de suplementar el medio de cultivo con una solución concentrada de vitaminas, solución concentrada de elementos traza, y extracto de levadura, sobre la producción de biomasa, el cual dio lugar a 8 tratamientos tal como se muestra en la tabla 1. La composición de la solución de vitaminas se formuló considerando medios reportados para microorganismos marinos (Harrison & Berges, 2005) (mg/mL): 0.03, cianocobalamina o B12; 2.5, tiamina o B1; 4, riboflavina o B2; 5, piridoxina; 50, niacinamida; y 10, D-Pantenol. Por su parte, la solución de elementos traza consistió de (g/L): H_3BO_3 , 13.7; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8.14; KI, 0.05; NiSO_4 , 0.013; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.008; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.003; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.003; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.009; EDTA, 0.008 (Rodrigues & Calvaho, 2022; Cortés & de Carvalho 2015; Atkinson & Bingham, 1997; Hayasaka & Morita, 1979). De acuerdo al diseño de experimentos, el nivel alto (+) y bajo (-) para cada factor fue: solución concentrada de vitaminas, 0.1 y 0 mL/L; solución concentrada de elementos traza, 1 y 0 mL/L; y extracto de levadura, 0.5 y 0 g/L. Como fuente de carbono se utilizó glucosa en concentración de 5 g/L. Los matraces fueron incubados durante 26 h tomando muestras cada 2 a 4 h para analizar el pH, la biomasa, glucosa y amonio como se describe más adelante (sección 2.7).

Tabla 1. Tratamientos experimentales resultantes de la combinación de factores y niveles del diseño 2³, teniendo como variable de respuesta la producción de biomasa.

Table 1. Experimental combinations of factors and levels from the 2³ design used, with the biomass production as the response variable.

Tratamiento	Vitaminas	Extracto de levadura	Elementos traza
T1	-	-	-
T2	+	-	-
T3	-	+	-
T4	+	+	-
T5	-	-	+
T6	+	-	+
T7	-	+	+
T8	+	+	+

2.3 Efecto de la concentración inicial de la fuente de carbono sobre el crecimiento de *S. degradans*

Se utilizó el medio de cultivo T7 (Tabla 2) ya que fue el que dio lugar a mayor producción de biomasa en el experimento descrito en la sección 2.2. Se evaluó el efecto de la concentración inicial de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de biomasa. Se usaron los siguientes carbohidratos: glucosa (Golden Bell), glucosamina (Fluka), xilosa (Fluka) y almidón (Golden Bell), en concentraciones de 5, 10, 20, y 30 g/L. En el caso de la glucosa, considerando los resultados de producción de biomasa con las primeras 4 concentraciones, se incluyó un tratamiento extra con 40 g/L.

2.4 Producción de biopoliésteres a partir de las diferentes fuentes de carbono

En primera instancia, se investigó la limitación de diferentes nutrientes sobre la acumulación del polímero por *S. degradans* utilizando cultivo en matraces en dos etapas, con glucosa como fuente de carbono. En la primera etapa, la bacteria se cultivó en el medio suplementado con extracto de levadura y elementos traza descrito previamente (T7, Tabla 2), y se incubó durante 24 h (30°C y 200 rpm) para obtener biomasa. Posteriormente, la biomasa de cada matraz fue recuperada mediante centrifugación en botellas cónicas estériles de 250 mL (20 min, 4000 rpm). El sobrenadante fue retirado, y la biomasa de cada botella fue transferida a matraces con el mismo medio de cultivo (T7, tabla 2), pero limitado por alguno de los siguientes nutrientes: Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Magnesio, o por la combinación de todos. Para la limitación individual, cada nutriente por separado se agregó en un 10% con respecto a su concentración original, mientras que los tres restantes se mantenían a la concentración original (medio T7, tabla 2). Para la limitación combinada,

los cuatro nutrientes investigados se añadieron simultáneamente en un 10% con respecto al medio original. Los matraces se incubaron por 48 h, se tomaron muestras cada 6 h y se determinó el porcentaje de acumulación del biopolímero (g polímero/100 g biomasa)(sección 2.6). Posteriormente, se evaluó su producción a partir de las diferentes fuentes de carbono, utilizando el sistema de cultivo en 2 etapas de la siguiente manera: para la etapa de producción de biomasa se usó el medio sin limitación; y en la segunda etapa el medio limitado por la combinación de nutrientes al 10% (con base en el resultado del experimento descrito previamente). La biomasa se recuperó mediante la separación de la fase acuosa con centrifugación a 3500 rpm y posteriormente, se lavó dos veces con agua destilada y se volvió a centrifugar con la misma velocidad que el paso anterior. Por último, se liofilizó a -40 °C durante 24 h.

2.5 Determinación de la capacidad de producir copolímeros mediante adición de precursores

Para evaluar la capacidad de *S. degradans* de producir copolímeros de PHA's, específicamente con unidades de ácido hidróxivalérico (HV) o de 4-hidroxibutirato (4HB), se añadieron los compuestos precursores: ácido valérico, ácido levulínico, y ácido 4-hidroxibutírico en concentraciones de 1 g/L (en la etapa de acumulación del polímero). Se usó glucosa (10 g/L) como fuente de carbono y los cultivos fueron sometidos a las condiciones de incubación mencionadas anteriormente durante 48 h. Por último, se extrajo el polímero y se analizó por cromatografía de gases como se menciona más adelante (sección 2.8).

2.6 Extracción de polímero

Para la recuperación del polímero, se utilizó una técnica de digestión de la biomasa con hipoclorito de sodio y solubilización simultánea del polímero liberado en cloroformo (Mannina *et al.*, 2020). La biomasa liofilizada (0.1 g) se agregó en una mezcla 1:1 (10 mL) de hipoclorito de sodio al 6 % (v/v) y cloroformo, manteniéndose en agitación vigorosa a 30 °C durante 12 h. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm y 4 °C durante 10 min. De esta manera, se logró la separación de tres fases: superior, hipoclorito de sodio; intermedia, restos celulares; inferior, polímero disuelto en cloroformo. La fase orgánica se recuperó y se añadió por goteo a 10 volúmenes de metanol frío, y esta mezcla se mantuvo a 4°C durante 12 h, lográndose la precipitación del polímero. Finalmente, el biopolímero precipitado se recuperó por centrifugación y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h.

2.7 Cuantificación de los compuestos de interés

2.7.1 Biomasa

Fue estimada mediante la medición de la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro uv-vis, la cual fue relacionada con una curva de calibración de peso celular en base seca generada previamente.

2.7.2 Glucosa, xilosa, almidón y glucosamina

Las muestras de los cultivos fueron centrifugadas a 4000 rpm y 10 °C por 10 min, y se utilizó el sobrenadante para hacer la cuantificación de cada carbohidrato.

El método que se utilizó para la determinación de glucosa, xilosa y almidón, fue la técnica colorimétrica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). En el caso particular del almidón, éste fue previamente hidrolizado usando una solución de HCl 0.1 N a 100 °C por 15 min (Kim & Chang, 1998). Posteriormente, fueron neutralizados con una solución de NaOH, previo a su análisis por la técnica del DNS. Por su parte, la glucosamina se determinó mediante el método colorimétrico de Elson-Morgan (Elson & Morgan, 1933; Belcher *et. al.*, 1954). Se generaron curvas de calibración, por duplicado, para cada carbohidrato utilizando estándares del azúcar correspondiente.

2.7.3 Determinación de amonio

Se utilizó el método del azul de indofenol (Zhou & Boyd, 2016). Todo el material utilizado para el análisis se lavó previamente con una solución de H₂SO₄ 0.1 N, y se preparó una curva patrón de NH₄.

2.7.4 Determinación de ácidos orgánicos

Los ácidos generados como subproductos del proceso de fermentación se cuantificaron por HPLC (Waters, bomba 600 y detector de índice de refracción 2410), y una columna OA-1000 (Alltech) de 300 mm de longitud x 6.5 mm de diámetro interno. La muestra fue preparada centrifugando 1 mL del sobrenadante del medio de fermentación y su posterior filtración (membranas de celulosa de 0.22 µm). El volumen de la muestra inyectada fue de 20 µL, se usó como fase móvil una solución filtrada y desgasificada de H₂SO₄ 0.01 N, con un flujo de 0.6 mL/min. La temperatura del detector y del horno fue de 38 y 50 °C, respectivamente. Se preparó una serie de estándares de ácido acético de 0 a 10 g/L.

2.8 Caracterización del biopolímero

Se utilizó la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para identificar los grupos funcionales característicos de los PHA's. Se colocaron 5 mg del polímero seco sobre el accesorio de reflexión total atenuada (ATR) (FTIR Perkin Elmer Spectrum 100) y se obtuvo el espectro (16 barridos) en un rango de 600 a 4000 cm⁻¹.

El peso molecular se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC) utilizando el HPLC descrito anteriormente, con una columna Styragel (HR1) de 7.8 x 300 mm y detector de índice de refracción (30°C). El volumen de inyección del biopolímero disuelto en cloroformo (1 mg/mL), fue de 20 µL, utilizando tolueno como fase móvil a un flujo de 1 mL/min. Se utilizaron estándares de poliestireno de baja polidispersidad, con peso molecular entre 381 y 578 x 10³ Da. Los resultados fueron procesados con el software Empower Pro (Waters.)

La composición monomérica del polímero, previa metanólisis para obtener metil-ésteres de los correspondientes hidroxiácidos, fue determinada por cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin & Elmer XL) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar para ácidos grasos (CP-Wax 52 CB 25 m x 0.32 mm). El volumen de inyección de muestra fue de 1 μ L y se utilizó nitrógeno ultrapuro como gas acarreador, con un flujo de 20 cm/s. Las temperaturas del inyector y el detector fueron 210 y 220 °C, respectivamente. Para lograr la separación de los ésteres, se mantuvo una isoterma de 50°C durante 1 min y posteriormente se elevó la temperatura con una velocidad de calentamiento de 8 °C/min hasta 160°C, la cual se mantuvo durante 5 min (Lee *et al.*, 1997). Para la curva de calibración se utilizaron metil-ésteres de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) generados por metanólisis de P(3HB-co-3HV) (HB:HV; 60:40). El rango de concentraciones utilizadas fue de 0 a 4 g/L.

Por último, la temperatura de fusión (T_m) del biopolímero se determinó mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) a 10 °C/min de 4 a 200 °C en un equipo DSC (Perkin-Elmer, modelo DSC7).

2.9 Análisis estadísticos

Se utilizó el programa Statgraphics para analizar los datos experimentales mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), y el método LSD de Fisher para determinar las diferencias entre medias.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto de los factores de crecimiento y elementos traza sobre la producción de biomasa

En la tabla 2 se observa que los 8 tratamientos resultantes del diseño de experimentos 2^3 , se dividieron en dos grupos: el primero conformado por los tratamientos de T1 a T4 que mostró una producción de biomasa y $Y_{x/s}$ bajos, con valores menores a 0.5 g/L y 0.3 g/g respectivamente; y el segundo grupo (T5 a T8), que superó los 2 g/L de biomasa y presentó rendimientos más altos. En los tratamientos del primer grupo no se consumió la glucosa ni el amonio disponible en el medio, mientras que, los del segundo grupo, tuvieron un consumo eficiente de dichos nutrientes, el crecimiento de *S. degradans* fue más rápido y se produjo más biomasa (Fig. 1). El análisis de varianza de los resultados, indicó que los factores que tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de *S. degradans* fueron el extracto de levadura y los elementos traza, siendo estos últimos los de mayor impacto ya que, en los tratamientos en los que se añadieron se incrementó la producción de biomasa hasta 6.87 veces más que en los tratamientos que carecían de estos (T1 a T4). Por su parte, el extracto de levadura mejora la producción de biomasa al añadirse en conjunto con los elementos traza.

Tabla 2. Efecto de adición de vitaminas, extracto de levadura y elementos traza, sobre la producción de biomasa (X_{max}) por *S. degradans* y el rendimiento de biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) de acuerdo con el diseño experimental 2^3 con dos réplicas (Tabla 1).

Table 2. Effect of vitamins, yeast extract and trace elements on biomass production (X_{max}) by *S. degradans*, and the biomass/substrate yield ($Y_{x/s}$) according to the experimental design 2^3 with two replicates (Table 1).

Tratamiento	X_{max} (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)
T1	0.22 ± 0.09 ^a	0.19 ± 0.02 ^a
T2	0.20 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.03 ^a
T3	0.42 ± 0.11 ^a	0.30 ± 0.03 ^a
T4	0.47 ± 0.06 ^a	0.32 ± 0.05 ^a
T5	2.13 ± 0.22 ^b	0.49 ± 0.10 ^b
T6	2.16 ± 0.34 ^b	0.51 ± 0.08 ^b
T7	2.34 ± 0.29 ^b	0.51 ± 0.08 ^b
T8	2.32 ± 0.43 ^b	0.51 ± 0.09 ^b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

3.2 Efecto de la concentración inicial de fuente de carbono sobre la producción de biomasa

Al utilizar glucosamina y almidón como fuente de carbono, se alcanzó la mayor producción de biomasa y velocidad de crecimiento con la concentración inicial de 20 g/L (Figs 2A, 2B y 2C), mientras que con glucosa fue a los 40 g/L. Sin embargo, al utilizar concentraciones iniciales de sustrato por encima de 20 g/L, la velocidad de crecimiento y el rendimiento ($Y_{x/s}$) disminuyeron, aun cuando había cantidades suficientes de fuente de carbono y nitrógeno. Por su parte, la producción de biomasa no fue proporcional al incremento de la concentración inicial de fuente de carbono. También se observó que a esas concentraciones se produjo ácido acético como subproducto.

Por otro lado, la producción de biomasa de *S. degradans* a partir de xilosa (Fig. 2D), presentó resultados diferentes. En primer lugar, utilizando esta fuente de carbono el tiempo de cultivo fue más largo, con un total de 75 h, ya que tan solo la fase *lag* duró más de 24 h. Una vez superado este tiempo, se incrementó la producción de biomasa proporcionalmente al incrementar concentraciones iniciales de sustrato de 5 a 10 g/L, con rendimientos similares. Sin embargo, al utilizar la concentración inicial por encima de tan solo 10 g/L, tanto el rendimiento, como la velocidad de crecimiento disminuyeron,

y la producción de biomasa se detuvo. Otra diferencia fue que, utilizando esta fuente de carbono, la producción de ácido acético (a todas las concentraciones iniciales) estuvo muy por debajo que con los sustratos anteriores.

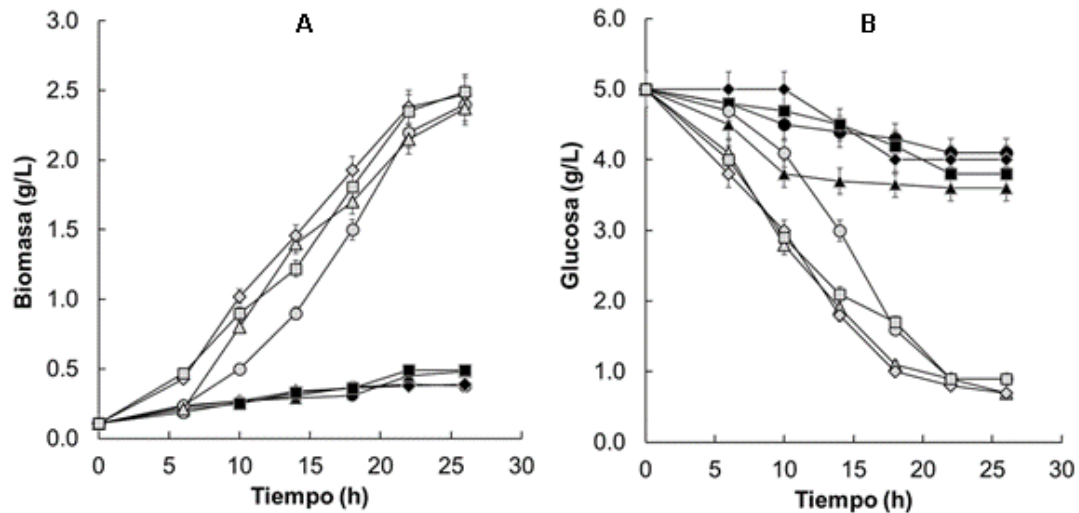


Fig. 1. Producción de biomasa (A) y consumo de glucosa (B) por *S. degradans* en medios de cultivo (Tabla 1) con diferente contenido de vitaminas, elementos traza y extracto de levadura: T1 (■), T2 (●), T3 (▲), T4 (◆), T5 (◐), T6 (▲), T7 (◆), y T8 (■). Las barras de error son las desviaciones estándar (DE).

Fig. 1. Biomass production (a) and glucose consumption (b) by *S. degradans* growing in culture media (Table 1) with different vitamins, trace elements and yeast extract content: T1 (■), T2 (●), T3 (▲), T4 (◆), T5 (◐), T6 (▲), T7 (◆), y T8 (■). Error bars are standard deviations (SD).

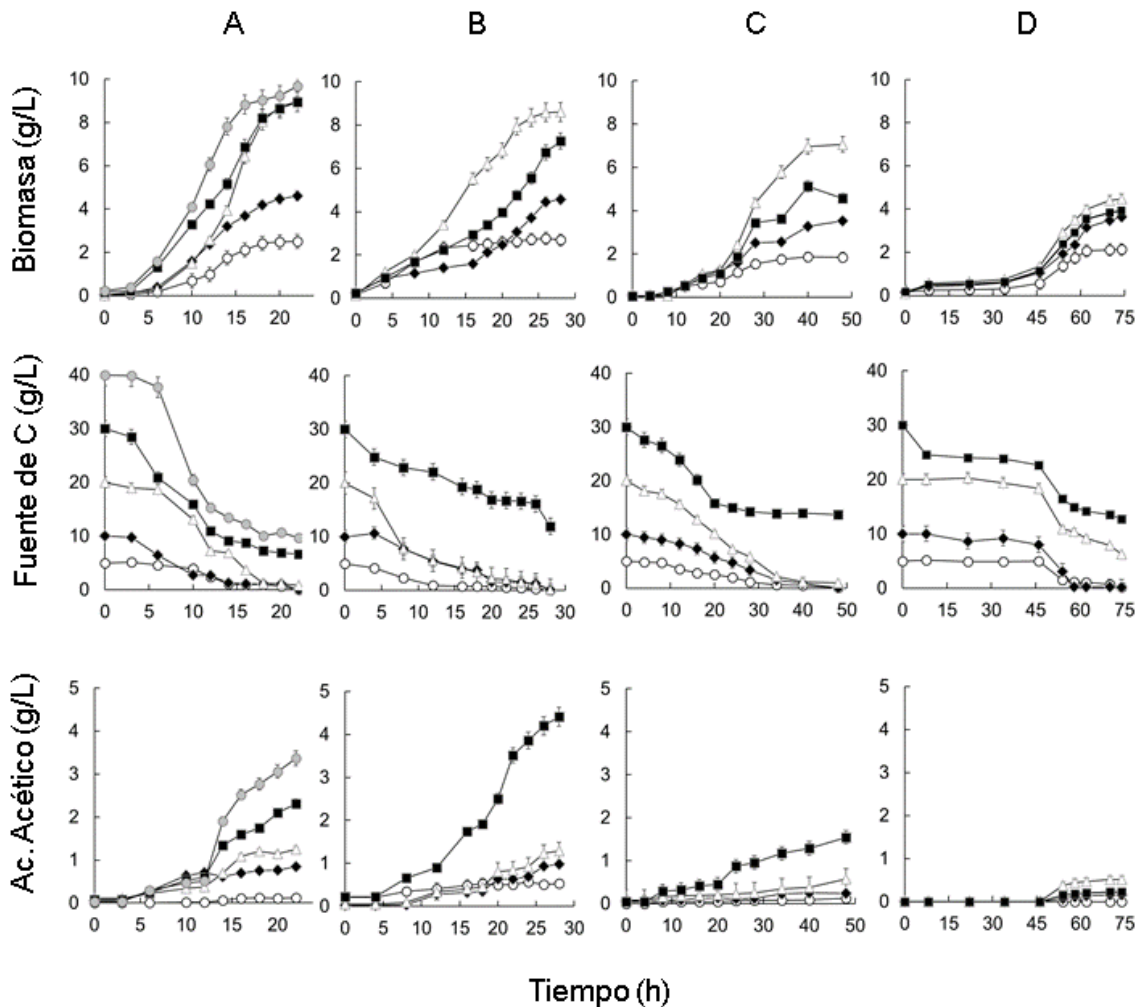


Fig. 2. Producción de biomasa y ácido acético, y consumo de sustrato a partir de glucosa (A), almidón (B), glucosamina (C) y xilosa (D) a diferentes concentraciones iniciales (g/L): 5 (○), 10 (◆), 20 (△), 30 (■) y 40 (●).

Fig. 2. Biomass and acetic production, and substrate consumption from glucose (A), starch (B), glucosamine (C), and xylose (D) at different initial concentrations (g/L): 5 (○), 10 (□), 20 (△), 30 (■), and 40 (●).

Con respecto a la fuente de carbono, se puede observar en la tabla 3, que las que dieron lugar a mayor producción de biomasa (X_{max}) y rendimientos ($Y_{x/s}$) fueron la glucosa y el almidón (9.07 y 8.61 g/L), seguidos por glucosamina (7.06 g/L) y, finalmente, la xilosa como la fuente de carbono con la que se obtuvo un menor crecimiento, con un máximo de 4.47 g/L de biomasa. En cuanto a la velocidad de crecimiento, la más alta se presentó al utilizar glucosa como fuente de carbono. Respecto al tiempo de cultivo requerido para alcanzar la máxima concentración de biomasa, la glucosa y el almidón presentaron los

más cortos (22 a 26 h), mientras que para el cultivo con glucosamina este tiempo fue casi el doble, y para xilosa el triple.

Tabla 3. Máxima producción de biomasa de *S. degradans* (X_{max}), mayor rendimiento de biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$) y máxima velocidad de crecimiento (μ_{max}) a partir de diferente concentración de sustrato inicial (S_0), para cada fuente de carbono.

Table 3. Maximum biomass production of *S. degradans* (X_{max}), highest biomass/substrate yield ($Y_{X/S}$) and maximum growth rate (μ_{max}) from different initial substrate concentration (S_0), for each carbon source.

Fuente de carbono	S_0 (g/L)	X_{max} (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	μ_{max} (h ⁻¹)
Glucosa	5	2.51 ± 0.43 ^a	0.42 ± 0.08 ^a	0.19 ± 0.05 ^a
	10	4.60 ± 0.51 ^b	0.45 ± 0.11 ^a	0.21 ± 0.03 ^a
	20	8.95 ± 0.72 ^c	0.46 ± 0.09 ^a	0.26 ± 0.05 ^a
	30	8.94 ± 0.48 ^c	0.35 ± 0.12 ^b	0.14 ± 0.03 ^b
	40	9.07 ± 0.49 ^c	0.31 ± 0.07 ^b	0.15 ± 0.02 ^b
Almidón	5	2.77 ± 0.37 ^a	0.50 ± 0.11 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
	10	4.56 ± 0.81 ^b	0.43 ± 0.19 ^a	0.09 ± 0.01 ^a
	20	8.61 ± 0.44 ^c	0.42 ± 0.14 ^a	0.11 ± 0.02 ^a
	30	7.26 ± 0.38 ^d	0.38 ± 0.09 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
Glucosamina	5	1.87 ± 0.26 ^a	0.39 ± 0.12 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
	10	3.53 ± 0.47 ^b	0.35 ± 0.09 ^a	0.09 ± 0.02 ^a
	20	7.06 ± 0.62 ^c	0.32 ± 0.17 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
	30	5.12 ± 0.32 ^d	0.30 ± 0.15 ^a	0.07 ± 0.01 ^a
Xilosa	5	2.13 ± 0.34 ^a	0.35 ± 0.16 ^a	0.06 ± 0.02 ^a
	10	3.64 ± 0.48 ^b	0.34 ± 0.13 ^a	0.07 ± 0.01 ^a
	20	4.47 ± 0.53 ^b	0.27 ± 0.11 ^b	0.09 ± 0.01 ^a
	30	3.92 ± 0.28 ^b	0.23 ± 0.11 ^b	0.06 ± 0.01 ^a

Los datos indican los promedios y las desviaciones estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas para cada grupo ($P < 0.05$).

Data represents averages and standard deviations. Different letters show statistical significant differences for each group ($P < 0.05$).

3.3 Producción de PHA's a partir de las diferentes fuentes de carbono con limitación por diferentes nutrientes

En primer lugar, se determinó el nutriente (N, P, Mg y S), cuya limitación (de manera individual o combinada) durante la etapa de acumulación, daba lugar al mayor porcentaje de acumulación del polímero (g polímero/100 g de biomasa). Se observó que al limitarse de manera combinada o por fósforo se alcanzaba un porcentaje de acumulación más alto (26-28.73%) (Fig. 3).

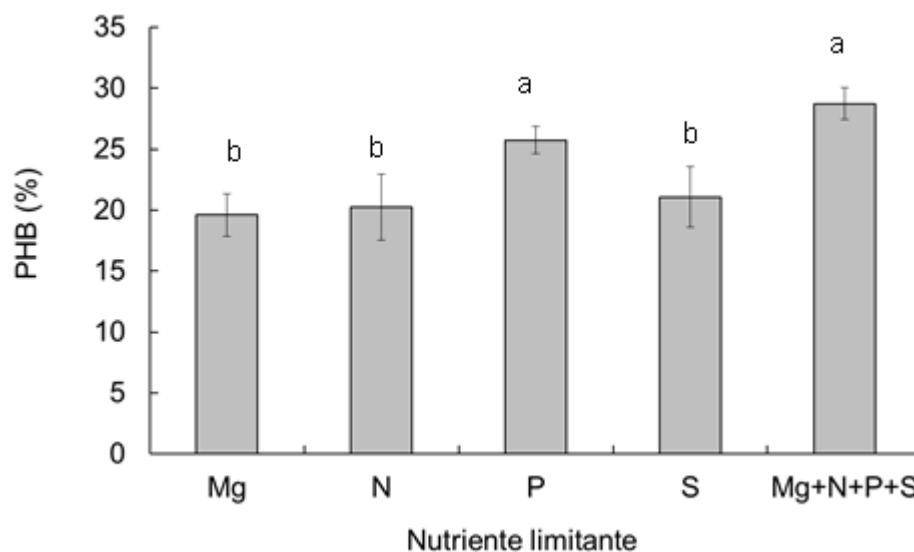


Fig. 3. Porcentajes de acumulación de biopolímero según el nutriente limitante. Las barras indican los promedios y las desviaciones estándar. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas para cada grupo ($P < 0.05$).

Fig. 3. Biopolymer accumulation percentage according to the limiting nutrient. Bars represent averages and standard deviations. Different letters show statistical significant differences for each group ($P < 0.05$).

Respecto a la fuente de carbono con la que se obtuvo mayor producción de polímero (al aplicar la limitación combinada de nutrientes durante la etapa de acumulación), fue la glucosa (3.46 g/L), que también presentó el mayor porcentaje de acumulación (27.72), seguido por el almidón con valores ligeramente más bajos, tal como se muestra en la tabla 4. Por otro lado, a partir de glucosamina se obtuvieron valores de producción del polímero muy bajos (menos de 1 g/L), mientras que con xilosa no se detectó la acumulación de este.

Tabla 4. Máxima concentración de biomasa (X_{max}), acumulación de PHB, y rendimiento de biomasa/ sustrato ($Y_{X/S}$) a partir de las diferentes fuentes de carbono.

Table 4. Maximum biomass concentration (X_{max}), PHB accumulation, and biomass/substrate yield ($Y_{X/S}$) from the different carbon sources.

	Glucosa	Almidón	Glucosamina	Xilosa
PHB (%)	27.72 ± 1.12	18.11 ± 0.96	3.33 ± 0.39	0.00 ± 0.00
PHB (g/L)	3.46 ± 0.27	2.04 ± 0.14	0.64 ± 0.11	0.00 ± 0.00
X_{max} (g/L)	12.49 ± 0.87	11.41 ± 0.62	9.08 ± 0.38	6.95 ± 0.49
$Y_{X/S}$ (g/g)	0.32 ± 0.08	0.32 ± 0.07	0.29 ± 0.06	0.32 ± 0.04
μ_{max} (h ⁻¹)	0.21 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01

3.4 Caracterización del polímero

El tipo de PHA's obtenido a partir de glucosa, almidón y glucosamina fue el homopolímero de ácido 3-Hidroxibutírico, es decir PHB, y presentaron pesos moleculares muy similares entre sí: 54,288 (± 623.67), 57,068 (± 1,423.19) y 53,413 (± 890.38) Da, respectivamente. De la misma manera, la temperatura de fusión no presentó diferencias significativas respecto a la fuente de carbono a partir de la cual se sintetizó el polímero (°C): glucosa, 165.61 ± 5.54; almidón, 174.31 ± 8.18; glucosamina, 164.66 ± 6.93.

3.3 Capacidad de *S. degradans* para producir copolímeros a partir de precursores

En la tabla 5 se muestran los resultados del efecto de la adición de precursores de ácido 3-hidroxivalérico (ácido valérico, ácido levulínico) y ácido 4-hidroxibutírico, sobre la biosíntesis de copolímeros por esta bacteria, observándose que el polímero producido por *S. degradans* en todos los casos fue PHB (Tabla 5). Por otro lado, la adición de los precursores no tuvo efecto negativo sobre la producción de biomasa, acumulación del polímero ni en los rendimientos ($P > 0.05$).

Tabla 5. Efecto del uso de precursores sobre la concentración máxima de biomasa (X_{max}), la acumulación del PHB, el rendimiento de biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$) y el rendimiento de producto/sustrato ($Y_{P/S}$).

Table 5. Effect of the use of precursor on the maximum biomass concentration (X_{max}), the PHB accumulation, the biomass/substrate yield ($Y_{X/S}$) and the product/ substrate yield ($Y_{P/S}$).

Precursor	X_{max} (g/L)	PHB (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)
Control	10.72±0.54	26.28±3.48	0.42 ±0.07	0.38 ±0.08
Ácido 4- hidróxibutírico	10.17±1.02	26.45 ±7.97	0.33 ±0.08	0.38 ±0.14
Ácido levulínico	10.07 ±0.67	28.24 ±7.55	0.31 ±0.07	0.43 ±0.09
Ácido valérico	10.31±1.11	26.94 ±7.86	0.32 ±0.03	0.33 ±0.05

4. DISCUSIONES

De acuerdo con los resultados, los elementos traza y el extracto de levadura (en las concentraciones descritas previamente), favorecieron de manera significativa la producción de biomasa de *S. degradans*. Por su parte, el uso de vitaminas del grupo B no tuvo un efecto significativo. Este comportamiento coincide con lo observado para otras bacterias marinas, las cuales suelen requerir elementos como calcio, hierro, estroncio, manganeso, zinc, molibdeno, cobalto, cobre, níquel y, algunas veces boro, para sus funciones metabólicas (Robbins *et al.*, 2016). El hierro es un cofactor esencial para muchos sistemas enzimáticos de oxidación-reducción, se encuentra en la ferredoxina y citocromos, e interviene en procesos de regulación metabólica; el molibdeno tiene un rol esencial en el metabolismo del nitrógeno; el cobre está presente en algunos de los componentes de la cadena respiratoria; y los demás que se mencionaron son cofactores de muchas enzimas responsables del metabolismo primario y secundario (Stanbury *et al.*, 1999). La falta de estos elementos incrementa la duración de la fase *lag* y puede tener un efecto negativo sobre la velocidad de crecimiento y los rendimientos (Shuler & Kargi, 2001), lo cual concuerda con los resultados que se obtuvieron.

En cuanto a los demás componentes del medio de cultivo, el sodio, cloro, potasio y calcio son indispensables para el crecimiento de microorganismos halófilos, como es el caso de *S. degradans* (Tesueng & Lam, 2010). También se sabe que el calcio es un cofactor

para muchas enzimas bacterianas y es un componente importante de la membrana celular (Kathuria & Martiny, 2011).

Con respecto a la fuente de carbono para la producción de estos biopolímeros, ésta puede llegar a representar entre 30 y 40% del precio final de los PHA's, por lo tanto, el uso de residuos para este propósito puede reducir significativamente el costo de producción (Novelli *et al.*, 2021). Algunos de estos residuos son la celulosa (aserrín, bagazos, papel etc.), hemicelulosa (bagazos, cáscaras de frutos), almidón (residuos de frutas, cereales) y quitina (cáscara de camarón, cangrejo), pero que para poder ser aprovechados eficientemente por bacterias productoras de PHA's, requieren ser hidrolizados previamente a sus principales monómeros: glucosa, xilosa, y glucosamina (Surendran *et al.*, 2020; Favaro *et al.*, 2019; Tsang *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2016). Por lo anterior, la capacidad de *S. degradans* para aprovechar directamente el almidón soluble (sin hidrolizar) para producir PHB fue uno de los resultados más destacados. En el caso de la quitina y sus derivados de hidrólisis (N-acetilglucosamina y glucosamina), su uso como sustrato para la producción de PHA's ha sido escasamente estudiado, a pesar de que su potencial es alto siendo el polisacárido más abundante del planeta después de la celulosa. Hasta ahora se ha encontrado que la bacteria *Ralstonia eutropha H16* es capaz de acumular hasta 54% de PHB utilizando N-acetilglucosamina (Gurav *et al.*, 2018). Este resultado es bastante superior a la concentración de biopolímero obtenido en el presente estudio con *S. degradans*, aunque en este estudio se utilizó glucosamina y en su ambiente natural la bacteria tiene más disponible como fuente de carbono la quitina y la N-acetilglucosamina. Además, se observó que, a partir de glucosamina, el consumo de nitrógeno del medio de cultivo disminuyó, esto debido a que la bacteria posiblemente utilizó el disponible en la glucosamina tal como ya ha sido mencionado anteriormente (Moye *et al.*, 2014). Por otra parte, al incrementar la concentración de glucosa en el rango de 5 a 20 g/L, se observó que la producción de biomasa aumentó presentando rendimientos cercanos a 0.45 y velocidades de crecimiento similares (Tabla 3). Sin embargo, cuando la concentración de sustrato se usó en 30 y 40 g/L, la producción de biomasa incrementó en menos de 1 g/L, por lo que los rendimientos a estas concentraciones fueron significativamente menores ($p < 0.05$). Lo mismo se observó con las velocidades de crecimiento las cuales disminuyeron al incrementar la concentración inicial de sustrato, este fenómeno ha sido explicado previamente por varios autores (Muloiwa *et al.*, 2020, Rincón-Santamaría *et al.*, 2019). En el caso de almidón, glucosamina y xilosa, al incrementar la concentración de sustrato inicial a 30 g/L, la biomasa disminuyó ligeramente en relación a la obtenida con la concentración del carbohidrato a 20 g/L.

Esta disminución en la producción de biomasa, pudo ser debida a la formación de ácido acético como subproducto. La producción de ácidos orgánicos en *S. degradans* fue mencionada por Andrykovithc & Marx (1988) en el estudio de aislamiento y pruebas bioquímicas para caracterización inicial de esta bacteria. Esta información se confirmó en el presente trabajo (Fig. 2), ya que se identificó al ácido acético como subproducto de la fermentación. Este compuesto puede resultar tóxico, afectando la fisiología de muchos microorganismos incluso en concentraciones tan bajas como 0.5 g/L (Kato *et al.*, 2022). Existen varios reportes para diferentes bacterias en los que se produce ácido acético debido a una desviación del flujo de carbono, ya sea por condiciones de oxigenación

inadecuadas o por el exceso de fuente de carbono. Cuando el crecimiento celular es rápido y con fuente de carbono en exceso, el consumo de oxígeno del cultivo se incrementa y se generan subproductos, en un proceso llamado metabolismo de sobreflujo (overflow metabolism) (Li *et al.*, 2022). La xilosa por su parte, no fue consumida eficientemente, se obtuvo menos biomasa y sin producir cantidades significativas de ácido acético. Además, presentó una fase *lag* muy larga, lo cual podría ser explicado a nivel de transporte de este monosacárido por *S. degradans*. Howard *et al.* (2003) reportaron que es factible que esta bacteria cuente un sistema específico tipo PTS (fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa), es probable que tanto el sistema de transporte como las enzimas para el catabolismo de xilosa requieren ser inducidas (Domingues *et al.*, 2021), y por eso el largo tiempo de cultivo. Aunque no se encontró que el microorganismo fuera capaz de producir PHB a partir de xilosa, resultó de interés comprobar que puede utilizar esta fuente de carbono para crecer, ya que la mayoría de los residuos lignocelulósicos contienen xilosa y es deseable que esta pentosa sea también asimilada en conjunto con la glucosa para el aprovechamiento integral de los hidrolizados, para producción de biomasa o PHA's, o ambos. Por lo tanto, debido a que este microorganismo es capaz de metabolizar ambos azúcares, tiene potencial para ser cultivado a partir de hidrolizados de residuos como bagazo, malezas, aserrín, cáscaras de fruta, entre otros.

Por otro lado, su capacidad de asimilar glucosamina podría aprovecharse para cultivarla en hidrolizados de quitina de cáscaras de crustáceos, lo cual sería importante investigar. Y debido a su capacidad de consumir almidón se podrían utilizar residuos agroalimentarios con alto contenido de este compuesto como el agua de cocimiento del maíz, del procesamiento de harinas, entre otras.

Por lo tanto, para obtener una mayor producción de biomasa de *S. degradans*, es necesario continuar la investigación de sistemas de cultivo por lote alimentado, la cual es la principal estrategia de cultivo utilizada para producir PHA's (Anjum *et al.*, 2016), así como el uso de biorreactores para evaluar el efecto de otros factores importantes, como el oxígeno.

En cuanto a la producción de biopoliésteres, *S. degradans* acumuló PHB a partir de fuentes de carbono simples (glucosa y glucosamina) y complejas (almidón), bajo condiciones nutrimentales limitadas por la combinación de N, P, S y Mg. La limitación por cada uno de estos nutrientes tiene un mecanismo específico que favorece la síntesis del polímero, por ejemplo, cuando la fuente de nitrógeno es el factor limitante, el NADPH no puede ser empleado para coadyuvar en síntesis de reducción (por ejemplo, aminoácidos, proteínas); entonces se inhibe la citrato sintetasa y en consecuencia el ciclo TCA. Como consecuencia, el acetyl-CoA queda disponible para la enzima 3-cetotiolasa y el flujo de carbón se dirige hacia la síntesis del polímero (Babel & Steinbüchel, 2001). Por lo tanto, la limitación combinada de nutrientes pudo activar varios mecanismos de acumulación. Sin embargo, no se detectó la producción de biopolímero a partir de xilosa, lo cual es común ya que han sido reportadas pocas bacterias son capaces de crecer y producir el polímero a partir de este azúcar (Clifton *et al.*, 2020). En cuanto al porcentaje de acumulación de polímero alcanzado en este

estudio, está dentro del rango de muchas cepas nativas cultivadas bajo condiciones sin optimizar como en este caso (Clifton *et al.*, 2020). Por lo tanto, sería de importancia seguir investigando el efecto de diferentes factores nutricionales y ambientales, así como estrategias de cultivo para optimizar la acumulación de PHB.

Por otro lado, la bacteria no fue capaz de producir los copolímeros de P(3HB-co-3HV) ni P(3HB-co-4HB) utilizando como precursores ácidos valérico, levulínico, e 4-hidroxibutírico. Sin embargo, resulta interesante seguir investigándolo utilizando diferentes estrategias de adición de los precursores, usar otros precursores, e incluso mezclas de ellos.

Con respecto a las características del PHB sintetizado a partir de los diferentes sustratos, el peso molecular es una característica inherente para cada cepa y diversos factores influyen en esta. Algunos estudios han sugerido su relación con la concentración y actividad de la enzima PHA sintetasa. También existen hipótesis que sostienen que la temperatura a la cual se incubaba el microorganismo puede incidir sobre el peso molecular (Matsumoto, 2019; Tsuge, 2016). Así mismo, las diferentes técnicas de extracción de PHA's tienen un papel importante en el peso molecular final del biopolímero ya que se ha demostrado que resulta menor si se ha utilizado hipoclorito en lugar de solventes (Mannina *et al.*, 2020), tal como resultó en el presente estudio donde se utilizó la digestión diferencial por mezcla hipoclorito:cloroformo, lo cual podría explicar la razón por la que se obtuvo un PHB considerado de peso molecular bajo.

En conclusión, la composición del medio del cultivo tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de la bacteria *S. degradans*, específicamente los elementos traza así como el tipo y concentración inicial de fuente de carbono. Para obtener mayor producción de biomasa será importante diseñar una estrategia de cultivo por lote alimentado utilizando un biorreactor, y considerar, para la etapa de acumulación del polímero, limitar la alimentación de nitrógeno, fósforo, azufre y magnesio. La acumulación de polímero por este microorganismo es sustancial, sin embargo, podrían investigarse otros factores con el fin de incrementar la producción. Finalmente, será de interés investigar el uso de residuos como hidrolizados de residuos lignocelulósicos y de cáscaras de crustáceos, así como desperdicios y efluentes que contengan almidón, como una fuente de azúcares de bajo costo para este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de doctorado 798930, y la beca de postdoctorado 384845.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alva Munoz L. E. & Riley M. R. 2008. Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*. *Biotechnology and Bioengineering*. 100(5): 882-888. <https://doi.org/10.1002/bit.21854>.
- Andrykovitch G. & Marx I. 1988. Isolation of a new polysaccharide-digesting bacterium from a salt marsh. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(4): 1061-1062. <https://doi.org/10.1128/aem.54.4.1061-1062>.
- Anjum A., Zuber M., Zia K. M., Noreen A., Anjum M. N. & Tabasum S. 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89(1): 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Atkinson M. J. & Bingman C. 1997. Elemental composition of commercial seasalts. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences*. 8(2): 39-43.
- Babel W. & Steinbüchel A. 2001. Biopolyesters. Special issue of *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 342
- Belcher R., Nutten A. J. & Sambrook C. M. 1954. The determination of glucosamine. *Analyst*. 79(937): 201-208. <https://doi.org/10.1039/AN9547900201>
- Clifton-García B., González-Reynoso O., Robledo-Ortiz J. R., Villafaña-Rojas J. & González-García Y. 2020. Forest soil bacteria able to produce homo and copolymers of polyhydroxyalkanoates from several pure and waste carbon sources. *Letters in Applied Microbiology*. 70(4): 300-309. <https://doi.org/10.1111/lam.13272>
- Cortes M. A. L. & de Carvalho C. C. 2015. Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. *Biochemical Engineering Journal*. 94(1): 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.017>
- Danso D., Chow J. & Streit, W. R. 2019. Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(19): e01095-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>
- Domingues R., Bondar M., Palolo I., Queirós O., de Almeida C. D. & Cesário, M. T. 2021. Xylose metabolism in bacteria—opportunities and challenges towards efficient lignocellulosic biomass-based biorefineries. *Applied Sciences*. 11(17): 8112. <https://doi.org/10.3390/app11178112>
- Du C., Sabirova J., Soetaert W. & Ki Carol Lin S. 2012. Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current Chemical Biology*. 6(1): 14-25. <https://doi.org/10.2174/187231312799984394>
- Elson L. A. & Morgan W. T. J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochemical Journal*. 27(6): 1824. <https://doi.org/10.1042/bj0271824>

- Favaro L., Basaglia M. & Casella S. 2019. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 13(1): 208-227. <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>
- Geyer R., Jambeck J. R. & Law K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3(7): e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gurav R., Bhatia S. K., Moon Y. M., Choi T. R., Jung H. R., Yang S. Y., ... & Yang, Y. H. 2019. One-pot exploitation of chitin biomass for simultaneous production of electricity, n-acetylglucosamine and polyhydroxyalkanoates in microbial fuel cell using novel marine bacterium *Arenibacter palladensis* YHY2. *Journal of Cleaner Production*. 209(1): 324-332. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.252>
- Harrison P. J. & Berges J. A. 2005. Marine culture media. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. London, UK. pp. 21-34.
- Hayasaka S. S. & Morita R. Y. 1979. Na⁺, K⁺, and nonspecific solute requirements for induction and function of galactose active transport in an Antarctic psychrophilic marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 37(6): 1166-1172. <https://doi.org/10.1128/aem.37.6.1166-1172.19>
- Howard M. B., Ekborg N. A., Taylor L. E., Weiner R. M. & Hutcheson S. W. 2003. Genomic analysis and initial characterization of the chitinolytic system of *Microbulbifer degradans* strain 2-40. *Journal of Bacteriology*. 185(11): 3352-3360. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3352-3360.2003>
- Jambeck J. R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T. R., Perryman M., Andrady A., ... & Law K. L. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*. 347(6223): 768-771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Jiang G., Hill D. J., Kowalczyk M., Johnston B., Adamus G., Irorere V. & Radecka I. 2016. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(7): 1157. <https://doi.org/10.3390/ijms17071157>
- Kathuria S. & Martiny A. C. 2011. Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* and other ocean bacteria. *Environmental Microbiology*. 13(1): 74-83. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02310.x>
- Kato J., Gotoh T. & Nakashimada Y. 2022. Removal of Acetic Acid from Bacterial Culture Media by Adsorption onto a Two-Component Composite Polymer Gel. *Gels*. 8(3): 154. <https://doi.org/10.3390/gels8030154>
- Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K. & Woo S. I. 1994. Production of poly 3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*. 43(9): 892-898. <https://doi.org/10.1002/bit.260430908>
- Koller M. 2020. *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates: Kinetics, Bioengineering, and Industrial Aspects*. CRC Press. pp. 20

- Kourmentza C., Plácido J., Venetsaneas N., Burniol-Figols A., Varrone C., Gavala H. N. & Reis M. A. 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*. 4(2): 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Kumar S. 2019. Recent developments of biobased plasticizers and their effect on mechanical and thermal properties of poly (vinyl chloride): a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 58(27): 11659-11672. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b02080>
- Lee J. H., Hong J. & Lim H. C. 1997. Experimental optimization of fed-batch culture for poly- β -hydroxybutyric acid production. *Biotechnology and Bioengineering*. 56(6): 697-705. [https://doi.org/10.1002/SICI\)1097-0290\(19971220\)56:6<697::AID-BIT13>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/SICI)1097-0290(19971220)56:6<697::AID-BIT13>3.0.CO;2-5)
- Li Z., Nees M., Bettenbrock K. & Rinas U. 2022. Is energy excess the initial trigger of carbon overflow metabolism? Transcriptional network response of carbon-limited *Escherichia coli* to transient carbon excess. *Microbial Cell Factories*. 21(1): 1-19.
- Mannina G., Presti D., Montiel-Jarillo G., Carrera J. & Suárez-Ojeda M. E. 2020. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*. 297(1): 122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478c>
- Matsumoto K. I. & Kageyama Y. 2019. Increased production and molecular weight of artificial polyhydroxyalkanoate poly (2-hydroxybutyrate) above the glass transition temperature threshold. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7(1): 177. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00177>
- Miller G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Journal of Analytical Chemistry*. 31(1): 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moye Z. D., Burne R. A. & Zeng L. 2014. Uptake and metabolism of N-acetylglucosamine and glucosamine by *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(16): 5053-5067. <https://doi.org/10.1128/AEM.00820-14>
- Muloiwa M., Nyende-Byakika S., & Dinka M. 2020. Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering*. 33(1): 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>
- Novelli L. D. D., Sayavedra S. M., & Rene E. R. 2021. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresource Technology*. 331(1): 124985. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124985>.
- Pérez-Andres L., Díaz-Godínez R., Luna-Suárez S., & Sánchez C. 2017. Characteristics and uses of phthalates. *Mexican Journal of Biotechnology*. 145-154. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.145>

- Reichert C. L., Bugnicourt E., Coltelli M. B., Cinelli P., Lazzeri A., Canesi I., ... & Schmid M. 2020. Bio-based packaging: Materials, modifications, industrial applications and sustainability. *Polymers*. 12(7): 1558. <https://doi.org/10.3390/polym12071558>
- Rincón Santamaría A., Cuellar Gil J. A., Valencia Gil L. F. & Sanchez Toro O. J. 2019. Kinetics of gluconacetobacter diazotrophicus growth using cane molasses and sucrose: assessment of kinetic models. *Acta Biologica Colombiana*. 24(1): 38-57.
- Robbins L. J., Lalonde S. V., Planavsky N. J., Partin C. A., Reinhard C. T., Kendall B., ... & Konhauser K. O. 2016. Trace elements at the intersection of marine biological and geochemical evolution. *Earth-Science Reviews*. 163(1): 323-348.
- Rodrigues C. J. & de Carvalho C. C. 2022. Cultivating marine bacteria under laboratory conditions: Overcoming the “unculturable” dogma. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 1476. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13782>
- Sabapathy P. C., Devaraj S., Meixner K., Anburajan P., Kathirvel P., Ravikumar Y., ... & Qi X. 2020. Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production—A review. *Bioresource Technology*. 306(1): 123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
- Sawant S. S., Tran T. K., Salunke B. K. & Kim B. S. 2017. Potential of *Saccharophagus degradans* for production of polyhydroxyalkanoates using cellulose. *Process Biochemistry*. 57(1): 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.016>
- Shen M., Huang W., Chen M., Song B., Zeng G. & Zhang Y. 2020. (Micro) plastic crisis: un-ignorable contribution to global greenhouse gas emissions and climate change. *Journal of Cleaner Production*. 254(1): 120138. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120138>
- Shuler M. L. & Kargi F. 2002. Cell nutrients. In: *Bioprocess Engineering: Basic Concepts: REV.* pp. 46
- Stanbury K. B. & Starr R. M. 1999. Applications of Geographic Information Systems (GIS) to habitat assessment and marine resource management. *Oceanologica Acta*. 22(6): 699-703. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(00\)88960-4](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(00)88960-4)
- Surendran A., Lakshmanan M., Chee J. Y., Sulaiman A. M., Thuoc D. V. & Sudesh K. 2020. Can polyhydroxyalkanoates be produced efficiently from waste plant and animal oils?. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8(1): 169. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00169>
- Tsang Y. F., Kumar V., Samadar P., Yang Y., Lee J., Ok Y. S., ... & Jeon, Y. J. 2019. Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*. 127(1): 625-644. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.076>
- Tsueng G. & Lam K. S. 2010. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marine actinomycete *Salinispora*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86(5): 1525-1534.

Tsuge T. 2016. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal*. 48(11): 1051-1057. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.78>

Zhou L. & Boyd C. E. 2016. Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture. *Aquaculture*. 450(1): 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.022>