

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS SINTETIZADOS POR UNA CEPA SILVESTRE DE  
*Bacillus mycooides* M17-2

BEATRIZ MERCEDES DIAZ JOJOA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2008

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS SINTETIZADOS POR UNA CEPA SILVESTRE DE  
*Bacillus mycooides* M17-2

BEATRIZ MERCEDES DIAZ JOJOA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Química

Asesor

Ph.D. PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2008

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1. Del acuerdo No. 324 de octubre 14 de 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Septiembre de 2008

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Doctor Pablo Fernández, por sus concejos, asesoría y gestión realizada en la financiación de esta investigación.

Profesora Dolly Revelo del Departamento de Biología y al Profesor Jesús Romo del Departamento de Química. Por su colaboración como jurados en el trabajo de Grado.

David Arturo Perdomo por su colaboración en la corrida de muestras por GC.

A todo el personal humano que trabaja en el área de laboratorios de Química, especialmente al Doctor German Chaves y Susana Calpa por todo el apoyo que permitió concluir este trabajo.

A todos los profesores de la Universidad de Nariño que colaboraron de alguna manera en la realización de este proyecto de grado.

## DEDICATORIA

Le agradezco a Dios por regalarme la vida, a mis padres Fidencio Díaz y Fermina Jojoa y a cada uno de mis hermanos por brindarme un hogar lleno de amor, principios y valores. Gracias a ellos hoy puedo culminar mi carrera y dedicarles este trabajo de grado.

También les agradezco a todos mis amigos y compañeros que siempre me han apoyado en todo momento. Especialmente a Gina, Juan Carlos, Gabriela, Daniel, mi grupo de monitoras liderado por Susanita y a todos aquellos que dejaron huella en mi vida durante el transcurso de mi carrera.

Cuando se desea alcanzar las metas sin importar los obstáculos, todo el universo conspira para que esa persona consiga realizar sus sueños.

## RESUMEN

Se optimizó un medio de cultivo para la producción del copolímero poli 3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P(3HB-3HV)) a partir de una cepa silvestre identificada como *Bacillus mycooides* M17-2, para lo cual se evaluaron sustratos derivados de productos agrícolas como harina de papa, haba y quinua y subproductos industriales como suero de leche y melaza. Se utilizó la técnica de cromatografía de gases (CG) para cuantificar el polímero

Se determinó que el medio de cultivo óptimo para el crecimiento y síntesis del (P(3HB-3HV)) en esta cepa fue: hidrolizados de harina de papa y quinua como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, en una relación 10:24. En el medio de cultivo optimizado la bacteria *Bacillus mycooides* M17-2 acumuló 1241 mg.L<sup>-1</sup> del copolímero poli 3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato.

## ABSTRACT

It was optimized a culture medium for the production of copolymer poly-3-hydroxybutyrate co-3-hydroxyvalerate (P (3HB-3HV)) from a wild strain identified as *Bacillus mycoides* M17-2. Substrates derivatives from agricultural products such as potato haba and quinoa flour and industrial byproducts such as serum from milk and molasses were evaluated. It was used techniques gas chromatography (GC) to quantify the polymer. It was determined that the culture medium for optimal growth and synthesis of (P (3HB-3HV)) in this strain was hydrolysates potato flour and quinoa as sources of carbon and nitrogen respectively in a ratio 10:24. In the optimized culture medium, the strain of *Bacillus mycoides* M17-2 accumulated  $1241\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of copolymer poly-3-hydroxybutyrate co-3-hidroxivaleratoque esa persona consiga realizar sus sueños.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	18
1. OBJETIVOS	20
2. MARCO REFERENCIAL	21
2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS	21
2.1.1 Copolimero P(3-HB-co-3-HV)	22
2.2 PRINCIPALES MICROORGANISMOS ESTUDIADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PHAs.	23
2.3 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHA.	24
2.3.1 Métodos cualitativos	24
2.3.2 Métodos cuantitativos	26
2.4 RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS	27
2.5 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA BIOSÍNTESIS DE PHA's.	29
2.5.1 Contenido Nutricional de la Papa, Suero de Leche, Melaza, Haba Y Quinoa.	32
2.5.1.1 Contenido nutricional de la papa	32
2.5.1.2 Contenido nutricional del suero de leche	33
2.5.1.3 Contenido nutricional de la melaza	34
2.5.1.4 Contenido nutricional del Haba	35
2.5.1.5 Contenido nutricional de la Quinoa	36
2.6 TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN.	37
2.7 DEGRADACION DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	39

2.8 APLICACIONES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	40
2.8.1 Medicina y Farmacia	40
2.8.2 Agricultura	41
2.8.3 Otros Usos	42
3. METODOLOGÍA	43
3.1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO	43
3.2 ELABORACION DE UN MEDIO DE CULTIVO DE REFERENCIA PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA.	43
3.2.1 Preparación de preinòculo e inoculo	44
3.2.2 Preparación de fermentación	44
3.3 EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DEL POLÍMERO PARA SU CUANTIFICACIÓN POR GC	45
3.3.1 Extracción del Biopolímero	45
3.3.2 Cuantificación del Biopolímero por Cromatografía de Gases	45
3.3.3 Identificación y cuantificación de los monómeros del polímero	45
3.4 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS COMO FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO.	46
3.4.1 Producción de Hidrolizado de Harina de Papa	46
3.4.2 Producción de Hidrolizado de Harina de Haba y Quinoa	46
3.4.3 Selección de sustratos para la producción de PHA, por <i>Bacillus mycooides</i> M17-2	47
3.4.3.1 Selección de la fuente de carbono	47
3.4.3.2 Selección de la fuente de nitrógeno	48
3.5 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A PARTIR DE LOS SUSTRATOS SELECCIONADOS.	48

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	50
4.1 SINTESIS DE PHA POR <i>Bacillus mycooides</i> M17-2 EN UN MEDIO DE CULTIVO DE REFERENCIA UTILIZANDO SUSTRATOS COMERCIALES.	50
4.2 SELECCION DE SUSTRATOS	52
4.2.1 Selección de fuentes de carbono	52
4.2.2 Selección de fuentes de nitrógeno	56
4.3 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A PARTIR DE LOS SUSTRATOS SELECCIONADOS PARA EL CRECIMIENTO Y SÍNTESIS DE PHA POR <i>Bacillus mycooides</i> M17-2.	60
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES	68
7. BIBLIOGRAFIA	69
8. ANEXOS	77

## LISTA DE TABLAS

	Pàg.
Tabla 1. Principales componentes del grano de haba seco	35
Tabla 2. Concentraciones de sustancias empleadas en el medio de cultivo de acuerdo con los niveles de paso	44
Tabla 3. Matriz codificada. Diseño factorial	44
Tabla 4. Sustratos empleados como fuentes de carbono en el medio de cultivo	47
Tabla 5. Sustratos empleados como fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo	48
Tabla 6. Concentraciones de sustancias empleadas en el medio de cultivo de acuerdo con los niveles de paso	48
Tabla 7. Matriz codificada del diseño factorial	49
Tabla 8. Cantidad de sustratos utilizados en el diseño de máxima pendiente	49
Tabla 9. Matriz codificada del diseño factorial $2^3$ con su variable de respuesta	50
Tabla 10. Análisis de varianza para el copolímero	51
Tabla 11. Efectos estimados para el copolímero	51
Tabla 12. Azúcares totales de los sustratos empleados como sustituyentes de la fuente de carbono	53
Tabla 13. Análisis de varianza para azúcares totales en las fuentes de carbono	53
Tabla 14. Variación de la fuente de carbono para la producción de copolímero	54
Tabla 15. Prueba de rango múltiple de Duncan del nivel de producción de copolímero con diferentes sustratos	54
Tabla 16. Proteína de los sustratos empleados como sustituyentes de la fuente de nitrógeno	57
Tabla 17. Análisis de varianza para nitrógeno total en hidrolizados de haba y quinua	57
Tabla 18. Variación de la fuente de nitrógeno para la producción de copolímero	58
Tabla 19. Prueba de rango múltiple de Duncan	58
Tabla 20. Composición aminoacídica de haba y quinua	59
Tabla 21. Matriz codificada del diseño factorial $2^3$ para el medio óptimo	61
Tabla 22. Análisis de varianza para PHA en el medio optimizado	62
Tabla 23. Efectos estimados para la producción de PHA en el medio optimizado	62
Tabla 24. Cantidad de copolímero en el diseño de máxima pendiente	64
Tabla 25. Relación de producción de PHA con los sustratos empleados en el medio de cultivo	65

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura general de los PHA	22
Figura 2. Estructura del copolímero P(3-HB-co-3-HV)	23
Figura 3. Tinción Sudan negro. <i>Bacillus mycooides</i> M17-2	25
Figura 4. Colonia de <i>Bacillus mycooides</i> M17-2 con rojo Nilo	26
Figura 5. Proceso de polimerización de PHB	28
Figura 6. Biosíntesis del terciopolímero por <i>Bacillus cereus</i> UW85	29
Figura 7. Cultivo de papa	33
Figura 8. Obtención de suero de leche	34
Figura 9. Obtención de la melaza en forma artesanal e industrial	35
Figura 10. Granos y vainas de haba	35
Figura 11. Plantas y semillas de quinua	37
Figura 12. Degradación de envases fabricados con polihidroxialcanoato	39
Figura 13. Medicamentos recubiertos	41
Figura 14. Semillas cubiertas con bolsa de copolímero	41
Figura 15. Envases fabricados con polihidroxialcanoato	42
Figura 16. Proceso de hidrólisis ácida de proteínas	47
Figura 17. Gráfico de Pareto. Efectos de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de PHA`s en <i>B. mycooides</i> M17-2	52
Figura 18. Mecanismo de acción del sistema fosfotransferasa, para el transporte de glucosa	56
Figura 19. Posible ruta metabólica para la síntesis del copolímero P(3-HB-co-3-HV) por <i>B. mycooides</i> M17-2	60
Figura 20. Influencia de las concentraciones de los sustratos en la producción de PH.	61
Figura 21. Grafico de Pareto. Efectos de los sustratos en función de la síntesis de copolímero	63
Figura 22. Zona de respuesta óptima	64

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Cuantificación del copolímero poli(3 hidroxibutirato-co-3-hidroxicvalerato).	77
Anexo B. Curva de calibración obtenida mediante el método de Antrona para la cuantificación de azúcares totales.	77
Anexo C. Cromatograma del copolímero P(3-HB-co-3-HV), utilizado como patrón para la cuantificación de los metil esterres (3-Hidroxibutirato)(3HB) y (3-Hidroxivalerato)(3HV).	78
Anexo D. Cromatograma del experimentos 2 de la matriz codificada, donde se obtuvo la cantidad del copolímero P(3-HB-co-3-HV).Utilizando sustratos comerciales.	78
Anexo E. Cromatograma del copolímero P(3-HB-co-3-HV), cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de papa como fuente de carbono.	79
Anexo F. Cromatogramas del copolímero P(3-HB-co-3-HV), cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de Harina de Quinoa y Haba como fuentes de nitrógeno.	79
Anexo G. Cromatogramas del copolímero P(3-HB-co-3-HV), cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de Harina de Quinoa como fuente de nitrógeno e hidrolizado de harina de papa como fuente de Carbono.	80
Anexo H. Cromatograma del copolímero P(3-HB-co-3-HV) en un medio óptimo, cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de Harina de Quinoa como fuente de nitrógeno e hidrolizado de harina de papa como fuente de Carbono	82

## INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos son poliésteres biodegradables de origen bacteriano con propiedades físicas similares al polipropileno, son resistentes a químicos corrosivos y no son tóxicos, característica de gran importancia para su aplicación en medicina, farmacia y el sector industrial. Sin embargo una de las desventajas que impide sustituir los plásticos sintéticos por los PHAs es su elevado costo en la producción. Por lo cual se han desarrollado estudios para el mejoramiento en fermentación y desarrollo de cepas más eficientes que consuman sustratos más económicos<sup>1</sup>.

Los investigadores se han enfocado especialmente en evaluar la producción de Polihidroxicanoatos en diferentes cepas silvestres aisladas de ambientes naturales<sup>2</sup>. En el presente trabajo de investigación se utilizó la cepa silvestre identificada como *Bacillus mycoides* M17-2 que es una cepa nativa aislada del suelo del departamento de Nariño y productora natural del copolímero poli 3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato.<sup>3</sup> Con esta cepa se evaluaron diferentes tipos de materias primas que son subproductos industriales como suero de leche, melaza y derivados de productos agrícolas como harinas de papa, haba y quinua, a las cuales se les realizó una hidrólisis ácida. Estos sustratos son fuentes importantes de carbono y nitrógeno y pueden sustituir a los sustratos comerciales que tienen un elevado costo como el extracto de levadura, peptona, extracto de harina de sangre, sacarosa y glucosa.

El objetivo principal fue determinar la región óptima donde los factores interaccionaron y proporcionaron el máximo factor de respuesta<sup>4</sup>. Para ello se optimizó el proceso de acumulación de PHA en la cepa silvestre *B. mycoides* M17-2, mediante un diseño factorial 2<sup>3</sup> y máxima pendiente.

Mediante el respectivo análisis de varianza, se encontró que el medio de cultivo donde se produce la mayor cantidad de PHA está compuesto por harina de papa hidrolizada con ácido sulfúrico al 1% en una concentración en el medio de cultivo de 24,5147 g.L<sup>-1</sup> y harina de quinua hidrolizada con ácido clorhídrico 3N, en una concentración en el medio de cultivo de 10,4037 g.L<sup>-1</sup>. En estas condiciones *Bacillus mycoides* M17-2 produjo 1240,17 mg.L<sup>-1</sup>. Cabe resaltar que la cantidad de PHA obtenida en este medio de cultivo fue significativamente mayor a la obtenida

---

<sup>1</sup> LAFFERTY, R, KORSATKO, B. and KORSATKO, W. Microbial Production of Poly-β-hydroxybutyric Acid. 2001. Publishers. New York. p.135-176.

<sup>2</sup> KIM and NAW, Chang. Production of (3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. 1998. Vol.20 p.109-112.

<sup>3</sup> FERNANDEZ, P. Abundancia de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos de Suelos de la Región Andina del Departamento de Nariño y Caracterización de un Aislado Bacteriano FLB2 productor del Copolímero poli(3Hidroxi-butirato-co-3Hidroxi-valerato 95:5). Tesis Doctoral. Universidad de la Habana. Cuba. 2006.

<sup>4</sup> BOX, G., HUNTER, W. G., HUNTER, S., J. (1988). Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, Análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona. Editorial Reverté. p. 675.

por Hidalgo y Zambrano (2005), quienes reportaron que esta cepa produce 8,142 mg.L<sup>-1</sup> de PHA cuando crece en un medio compuesto por glucosa, peptona y fosfato ácido de sodio.

## 1. OBJETIVOS

### GENERAL

Optimizar un medio de cultivo para la producción de polihidroxicanoatos sintetizados por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* M17-2.

### ESPECÍFICOS

Elaborar un medio de cultivo de referencia para la producción de PHA con *Bacillus mycoides* M17-2.

Seleccionar materias primas como fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento y síntesis de PHA por *Bacillus mycoides* M17-2.

Diseñar un medio de cultivo a partir de los sustratos seleccionados para el crecimiento y síntesis de PHA por *Bacillus mycoides* M17-2.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Debido a la alta contaminación ambiental que producen los plásticos sintéticos derivados del petróleo, la atención mundial se ha centrado en el estudio de un tipo de poliésteres denominados Polihidroxicanoatos (PHAs). Estos polímeros son de origen bacteriano, biodegradables y con propiedades similares al polipropileno, además son insolubles en agua y provienen de ácidos alcanoicos que contienen un grupo hidroxilo como grupo funcional, adicionado a un grupo carbonilo<sup>5</sup>.

El PHA es una inclusión de reserva o acumulo de sustancias orgánicas rodeadas de una envoltura limitante de naturaleza proteica que se origina dentro del citoplasma bajo determinadas condiciones de crecimiento. Se forma en algunas bacterias, y para ellas constituye una reserva de fuente de carbono, por ello se les denomina inclusiones orgánicas<sup>6</sup>. Ciertas especies de *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, acumulan bajo condiciones apropiadas de limitación de nutrientes cerca del 80% de su peso seco, con alto promedio del poliéster<sup>7</sup>. Las halobacterias *halobacterium* sintetizan PHAs y cuando requieren de carbono y energía es normalmente despolimerizado a ácido D(-)-hidroxibutírico y se metaboliza a acetoacetato y acetoacetyl CoA<sup>8</sup>.

Cuando se extraen los PHAs de la célula bacteriana, estas moléculas presentan propiedades materiales que son similares a algunos plásticos comunes producidos a partir de reservas fósiles como el petróleo.<sup>9</sup> En los últimos años está quedando patente que los polihidroxibutiratos (PHBs) son un ejemplo de una de las clases mas amplias de Polihidroxicanoatos (PHAs), sin embargo ciertas bacterias pertenecientes a la especie como *Alcaligenes eutrophus*, cuando crecen en glucosa y ácido propionico, produce copolímeros aleatorios de unidades de  $\beta$ -polihidroxibutirato y  $\beta$ -hidroxivalerato.<sup>10</sup>

En los PHAs la variabilidad de la posición del grupo hidroxilo, el sustituyente que conforma el grupo R, la amplia variedad de monómeros diferentes que pueden conformarlos y el grado variable de polimerización, permite obtener diferentes

---

<sup>5</sup>ODA, Y. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi. J. Ferment. Bioeng.1995. V. 3. p. 265-269

<sup>6</sup> LAÑEZ, Enrique. Curso de Microbiología general citoplasma inclusiones citoplasmáticas.1998. p.2-10

<sup>7</sup> ASENJO, J. A. Effect of Single Nutrient limitation on Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Bioeng. 1995. V.5.p.497-502

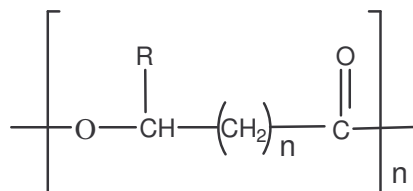
<sup>8</sup> WEINER, R. M. Biopolymers from marine prokariotes; Tibtech.1997.p. 390-394.

<sup>9</sup> NUR, Z. and BELMA, A. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *bacillus subtilis* 25. 2003

<sup>10</sup> HUSMANN, W. Ingeniería Metabólica de poli(3 Hidroxialcanoatos). Proceso de Polimerización de PHB.1999.

polímeros o copolímeros que exhiben propiedades físicas diversas<sup>11,12</sup>. Hasta el momento se han encontrado mas de 90 unidades monoméricas diferentes de PHAs<sup>13</sup>.

Figura 1. Estructura general de los PHAs. Donde n = 4000 - 2000 unidades monoméricas. Fuente: <http://www.ademicjournals.org/AJB>.



Los PHAs bacterianos se componen por cadenas de ácidos grasos R-3-hidróxidos de longitud larga y corta. Los diferentes polihidroxiálcanoatos que se han identificado hasta la fecha, son principalmente poliésteres lineales, constituidos por monómeros, de ácidos grasos 3-hidroxi, que se ligan cabeza a cola. En estos polímeros, los grupos carboxilo se agrupan de un monómero formando una atadura del éster con el grupo del hidroxilo del siguiente monómero. En todos los PHAs que se han caracterizado hasta hora, el átomo de carbono hidroxil-sustituido es de configuración R, excepto en algunos casos especiales, donde no hay ningún quiral. Al mismo tiempo en el carbono 3 se traslada, un grupo alquilo que puede variar de metil a tridecil. Sin embargo, esta cadena lateral alquilo, necesariamente no se satura y puede ser aromático, insaturado, halogenado, epoxi y se han reportado también, monómeros que pueden presentar ramificaciones<sup>14</sup>.

Dependiendo del número de átomos de carbono en la unidad monomérica, se dividen en 2 grupos. Uno de los grupos bacterianos productores de cadenas de longitud corta de PHA es *Alcaligenes eutrophus*, con unidades monoméricas desde 3 a 5 átomos de carbono. Sin embargo, otras bacterias como *Pseudomona oleovorans*, sintetizan cadenas de longitud media con unidades monoméricas de 6 a 14 átomos de carbono<sup>15</sup>.

2.1.1 Copolímero P(3-HB-co-3-HV): Los gránulos de P(3-HB-co-3-HV) son acúmulos de poliéster del ácido β-hidroxibutírico (3-hidroxibutanoico) (3HB) unidos

<sup>11</sup> STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. En biomaterials. Novel materials from biological sources (ed. D. Byrom); Macmillan Publishers and Ltd. And ICI Biological Products Buissnes. 1991.p.125-213

<sup>12</sup> STEINBÜCHEL, A. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalcanoic acid inclusions; Can. J. Microbiol. 1995.p. 94-105

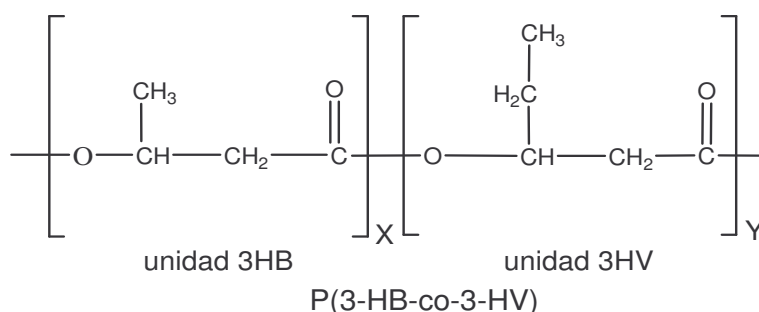
<sup>13</sup> FUKUI, T. y DOI, Y. Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*. J. Bacteriol. 1997. p. 4821-4830

<sup>14</sup> GABBERT, K. STEINBÜCHEL, A. and SCHUBERT. P. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly(b-hydroxybutyric acid)-synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. Arch. Microbiol. 1998. p.101-104.

<sup>15</sup>FUKUI, T. and DOI. Y. Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*; J. Bacteriol. 1997. V. 15. p. 4821-4830

mediante un enlace éster con unidades monomérica de 3-hidroxicaproato (3HV) (Figura 2), rodeados de una envoltura proteica que se produce en ciertas bacterias como reserva osmóticamente inerte de carbono en condiciones de falta de nitrógeno. Además, de la protección osmótica estos gránulos suponen la ventaja de neutralizar un metabolito ácido<sup>16</sup>. En *Bacillus* constituye la fuente de carbono y energía, al inicio de la esporulación, al igual que en *Azotobacter*.

Figura 2. Estructura del Copolímero P(3-HB-co-3-HV). Fuente. <http://www.academicjournals.org/AJB>.



El copolímero de 3PHB-co-3PHV posee propiedades físicas importantes: su bajo punto de fusión (145°C), que le permite ser procesado con una gama más grande de las condiciones de temperatura, impidiendo la degradación térmica. En segundo lugar, tiene un nivel más bajo de la cristalinidad, que lo hace más resistente y más flexible.

Además, los materiales con alto contenido de 3-HV tienden a ser suaves y resistentes mientras que los materiales con contenido bajos de 3-HV son duros y frágiles<sup>17</sup>. Las fracciones de 3-HV en el copolímero de 3-HB-co-3-HV que se extiende de 0 a 30% han sido utilizadas por BIOPOL (multinacional europea que produce embases plásticos). Por otra parte, el alto peso molecular de 3-HB es más útil y deseable para los usos industriales y puede ser reducido durante el proceso de extracción de la biomasa<sup>18, 19</sup>.

## 2.2 PRINCIPALES MICROORGANISMOS ESTUDIADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PHAs.

Actualmente existen alrededor de 300 diferentes especies, que son reconocidas como bacterias polihidroxicaproato positivas. Sin embargo, los reportes presentados en su mayor parte, se refieren a la cepa *Alcaligenes eutrophus*,

<sup>16</sup> MADIGAN, M. and MARTINKO, T. *Brock Biology of Microorganisms*. Princeton Hall, New Jersey.1997

<sup>17</sup> BOOMA, Op.cit, p.4.

<sup>18</sup> BOURQUE, D. and POMERLEAU, D. High-cell-density production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*1995. V. 44.p. 367-376.

<sup>19</sup> LAFFERTY, R. and KORSATKO, W. Microbial Production of Poly-β-hydroxybutyric Acid. In: *Biotechnology*. VCH Publishers. New York. USA.1998. p.135-176.

puesto que fue de las primeras en conocerse como productora del polímero, además fue seleccionada rigurosamente para la producción industrial de PHA. Otras cepas incluso han sido patentadas por su alta producción un ejemplo de esto es la cepa: “Transgénica *Alcaligenes eutrophus*”

En la actualidad se ha utilizado la genética molecular como herramienta para caracterizar los genes responsables de la síntesis del biopolímero en algunas cepas bacterianas productoras de PHA. La cepa mas utilizada para este tipo de estudios es la *Escherichia coli* por su extensivo estudio en cuanto a su metabolismo y a su caracterización<sup>20</sup>.

Algunas bacterias como: *Bacillus cereus*, *Bacillus megateriu*, *Bacillus atearothermophilus*, *Rhodomicrobium vanniellii*, *Rhodopseudomonas acidophila*, *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Rhodopseudomonas globiformis*, *Rhodopseudomonas gelatinosa*, *Salmonella* se han clasificado como polihidroxicanoato positivas, y se han desarrollado estudios relacionados con factores como: concentración de los sustratos utilizados, condiciones limitantes y porcentaje peso a peso en cuanto a la producción del polihidroxicanoato.

## 2.3 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHA.

2.3.1 Métodos cualitativos: Las técnicas de microscopía crioelectrónicas son apropiadas para una descripción confiable de la estructura de los gránulos de polímero, pero los resultados deben ser cuidadosamente interpretados, porque los compuestos que forman parte de los gránulos tienden a alterarse artificialmente durante el congelamiento de la muestra. La microscopía electrónica de alta resolución, ha permitido la visualización directa de los planos del enrejado que forma el copolímero<sup>21</sup>. Preparaciones convencionales de microscopía óptica, electrónica y tratamiento de imágenes fueron utilizadas con el fin de estudiar la estructura del PHB y compuestos relacionados con él, brindando información valiosa referente a los aspectos citológicos del polímero como: dimensión, localización dentro de la célula en varios estadios fisiológicos y condiciones de cultivo.<sup>22</sup>

Para que las inclusiones intracelulares puedan ser observadas en el microscopio, es necesario aplicar una técnica de tinción donde se usan variedad de compuestos orgánicos coloreados para teñir los microorganismos o tejidos a fin de poder observarlos al microscopio. Entre las técnicas de tinción encontramos, la tinción simple que se basa en la coloración de las bacterias o de otros organismos por aplicación de una sola solución de un colorante a una película fijada, o frotis.

---

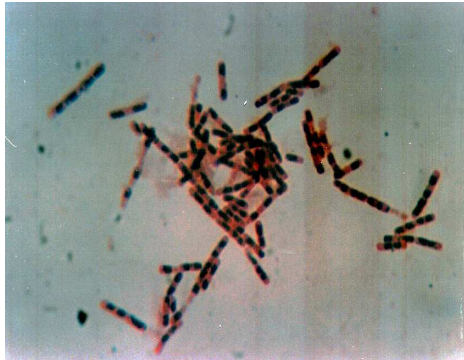
<sup>20</sup> LEE, Production of médium-chain-length polyhidroxialcanoates by high-cell-density cultivation of *pseudomonas patida* under phosphorus limitation.1999.p.466-471

<sup>21</sup> RENNER, G. HAAGE, G. and BRAUNEGG, G.Production of Short-Side-Chain Polyhydroxyalkanoates by Various Bacteria from the rRNA Superfamily III. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* 1996.V.46. p. 268-272.

<sup>22</sup> MAYER, F. Structural aspects of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules, en; Schlegel H. G.; A. Steinbüchel. *Bacterial polyhydroxyalkanoates poly- $\beta$ -hydroxyalcanoic acid.*1992. p. 265-268

La película fijada se inunda con la solución del colorante durante un periodo de tiempo especificado, después del cual se lava la solución con agua y se seca la preparación con papel de filtro. Usualmente las células se tiñen de forma uniforme (Figura 3). Sin embargo, con algunos organismos, y especialmente cuando el colorante es azul de metileno, algunos gránulos del interior de la célula parecen mas intensamente teñidos que el resto de la célula<sup>23</sup>.

Figura 3. *Bacillus mycoides* M17-2, con gránulos de PHA. Tinción sudan negro. Tomada de la documentación del Laboratorio de Biología Molecular. Universidad de Nariño.



Otra de las tinciones es la tinción diferencial, que aplica procedimientos de tinción que ponen de manifiesto diferencias entre células microbianas o entre partes de una célula microbiana. Esta técnica implica la exposición de las células a más de una solución de colorante o de reactivo.

Ciertos colorantes como el azul de Nilo luego de teñir las inclusiones intracelulares permiten observarlas en el microscopio como cuerpos brillantes, o con una fluorescencia de color naranja<sup>24</sup>. El uso del azul de Nilo como colorante histológico, fue propuesto originalmente por Smith, para una diferenciación simultánea de los lípidos ácidos y neutros. Esta doble acción es posible porque el Azul de Nilo comercial (sulfatoaminodietil aminonaftofenoxazona), también contiene pequeñas cantidades de esta forma de la oxazona oxidada.

El Azul de Nilo se encuentra asociado con los ácidos grasos coloreándolos de azul, mientras que el Rojo Nilo lipofílico se disuelve en grasas neutrales, coloreándolas con las tonalidades que van desde el rojo hasta el amarillo<sup>25</sup>. Las tonalidades adquiridas por los gránulos teñidos con el Rojo Nilo, permiten afirmar que este colorante tiene una mayor afinidad por el PHA (Figura 4), que el Sudán

---

<sup>23</sup> BOHÓRQUEZ A. Camilo. Biología Aplicada, McGRAW-HILL, Colombia 1994. p. 134

<sup>24</sup> OSTLE, A. and HOLT, J. Nile blue A as a fluorescent strain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate; Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. p. 238-241

<sup>25</sup> PAGE, W. and TENOVE, J. Quantitation of poly-b- hydroxybutyrate by fluorescence of Bacteria and granules stained with Nile Blue. 1996. p. 215-220

Negro. Además estas partículas son observadas con mucha mayor dificultad, debido a la interferencia de las partículas del colorante<sup>26</sup>.

Figura 4. Colonia de *Bacillus mycoides* M17-2, en medio de cultivo MB suplementado con rojo nilo e irradiado con U.V. Fuente. Documentación Laboratorio de Biología molecular. Universidad de Nariño.



La fluorescencia que manifiestan las inclusiones de PHB en células de *Azotobacter vinelandii* (UWD), luego de ser teñidas con Azul de Nilo, es proporcional con la concentración de PHB. Los resultados manifiestan que el Azul de Nilo puede ser usado en una determinación cuantitativa de PHB en una gran variedad de células<sup>27</sup>. En consecuencia el estado amorfo de los gránulos de PHA es el resultado, de la cinética de cristalización muy lenta de pequeñas partículas<sup>28</sup>.

A través de las técnicas de ácidos nucleicos, mediante la hibridación de colonias (evitando las técnicas que implican un elevado consumo de tiempo y método de tinción altamente inefectivos), es posible determinar la presencia de información genética, para la síntesis de PHA en un medio ambiente, en el cual el polímero no es detectado por métodos tradicionales. De aquí se concluye que esta técnica genética pudiera ser un método opcional para obtener información acerca de la presencia de determinadas sustancias en las comunidades bacterianas, que son rápidamente metabolizadas, en respuesta a cambios ambientales<sup>29</sup>.

2.3.2 Métodos cuantitativos: Para determinar el contenido del polímero en la célula se han utilizado diferentes métodos cuantitativos los cuales a su vez determinan de una forma más exacta y segura la cantidad de PHA producida por las cepas bacterianas, entre los métodos mas utilizados figuran el de purificar la muestra por liofilización y extracción gravimétrica del polímero en solución de

---

<sup>26</sup> OSTLE, Op. Cit., p. 245

<sup>27</sup> PAGE and TENOVE, Op. Cit., p.222

<sup>28</sup> GERNGROSS and MARTIN. Enzyme-catalyzed synthesis of poly [ $\alpha$ -(-)-3-hydroxybutyrate]: Formation of macroscopic granules in vitro. Usa. 1985. V.92. p. 6279-6283

<sup>29</sup> LOPEZ, N., PETTINARI, M. and MENDEZ, B. Detection of reserve polymer synthesis in natural bacterial populations. 1997. p.129-136

cloroformo, aunque este tiene la dificultad de ser muy lento y suele ser específico y cuantitativo. El método permite determinar las propiedades de estos polímeros como son: punto de fusión, peso molecular, termoplaticidad, empleando además la pirolisis para determinar la composición de los elementos formadores de estos materiales<sup>30</sup>.

También encontramos el método clásico que es disolver la célula que contiene el PHB en hipoclorito y determinar la turbidez de la suspensión producida por los gránulos del polímero. Alternativamente el polímero puede ser extraído en solución de cloroformo y determinarlo cuantitativamente por medio de absorbancia. Otro método espectroscópico involucra la hidrólisis y deshidratación del polímero a ácido crotónico mediante ácido sulfúrico y su posterior análisis cuantitativo por luz ultravioleta a 235 nm, pero tiene el inconveniente de que hay interferencia de azúcares (se transforman a furfural, que absorbe la luz a esa longitud de onda)<sup>31</sup>.

En espectroscopia infrarroja (IR), los espectros son registrados en el rango de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando técnicas como la fase sólida en pastillas de KBr. De igual manera utilizando resonancia magnética nuclear (RMN), las muestras son tratadas con cloroformo analítico, utilizándose tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, a partir del cual se reportan los corrimientos químicos (ppm) a la temperatura de 300  $^{\circ}\text{K}$ , se utilizan para registrar estos corrimientos espectrómetros a la frecuencia de 250 MHz ( $\text{H}^1$ ) y 62.9 MHz ( $\text{C}^{13}$ ) en tubos de 5 mm de diámetro<sup>32</sup>. Este es un método analítico que permite cuantificar el PHB luego de una extracción celular inicial del polímero. En investigaciones recientes, describieron un nuevo método de RMN para la identificación y cuantificación de PHB en su forma polimérica, mostrando que las suspensiones celulares de *A. eutrophus* en las dispersiones de hipoclorito de sodio y cloroformo, conllevan a la disolución y a la migración inmediata del PHB a la fase de cloroformo, evitando una severa degradación del polímero<sup>33</sup>. Otra de las técnicas encontradas es la cromatografía de gases: que se emplea para la separación de sustancias o mezcla de sustancias volátiles. Para cuantificar PHA la técnica mas empleada es la Cromatografía gas-sólido, ya que usando esta técnica, después de una metanolisis ácida directa de las células, se puede determinar la cantidad total de PHB sin tener en cuenta la masa celular y localización del esta en la célula.

---

<sup>30</sup> BASSET, D. Developments in Crystalline, Polymers-2. Elsevier Appl. Science Publishers, London.1988

<sup>31</sup>KARR, I., WATERS and EMERICH, D. Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-inclusions high-pressure liquid chromatography and U. V. Detection; Appl. Environ. Microbiol.1983. p. 1339-1344

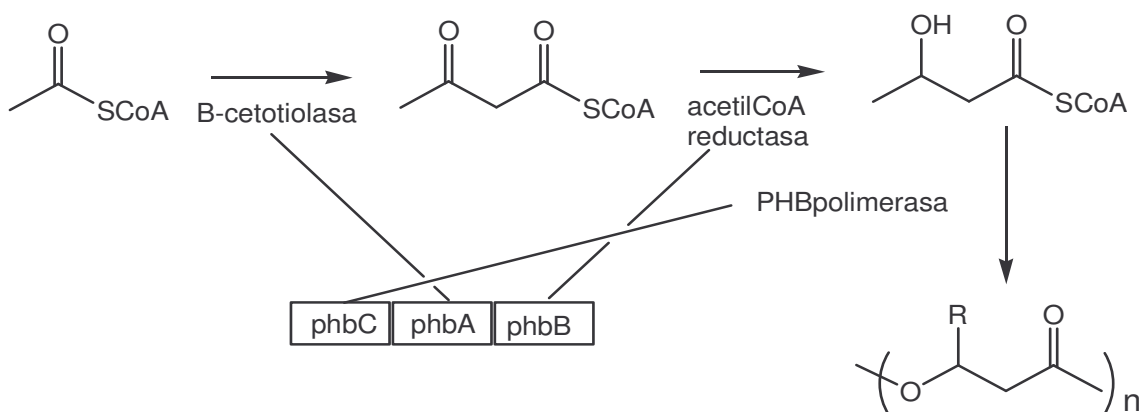
<sup>32</sup>FRISTCHE, K., LENZ, R. and FULLER, C. Bacterial polyester containing branched poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates).1990. V. 12. p. 92-101

<sup>33</sup> JAN, S. H MNR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass; Enzyme Microb. 1996. p.195-201

## 2.4 RUTAS DE BIOSINTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

En la figura 5, podemos observar como ocurre el proceso de polimerización del polihidroxiacetato; una vez formados los monómeros de ácido 3-hidroxiacetato, se empiezan a unir de dos en dos; en donde el extremo nucleófilo (OH), ataca a una molécula de ácido 3-hidroxiacetato por su extremo electrófilo (C = O), el cual es buen grupo saliente; al ser atacado, pierde el fragmento coenzima A (SCoA) y se observa la intervención de una enzima o catalizador, denominado  $\beta$ -cetotiolasa, la cual une los dos extremos, el nucleófilo y el electrófilo, dando lugar al segundo paso de polimerización; el cual consiste en reducir el grupo carbonilo del monómero que atacó a la segunda molécula; esto ocurre gracias a la acción de otra enzima llamada acetilCoA reductasa, de su nombre se entiende, que ataca el grupo ceto; el tercer paso, consiste en utilizar este dímero por su extremo electrófilo con sustituyente CoA, el cual va a ser atacado por un extremo nucleófilo de otro dímero, catalizado por la enzima PHB polimerasa; y a si se seguirá uniendo hasta formar una gran cadena que conformará el polímero poli  $\beta$ -hidroxiacetato.

Figura 5. Proceso de polimerización del PHB. Fuente Ingeniería Metabólica de poli(3 hidroxiacetatos). Hüsmann, W.1999.



Existe un conjunto extenso de información sobre polímeros hidroxiacetáticos (3-HB) desde el año de 1987, acerca del metabolismo, bioquímica, y fisiología, que ha sido enriquecido por estudios genéticos moleculares. Bastantes genes han sido codificados en las enzimas involucradas en la formación de PHB y en la degradación del mismo, así como también han sido clonadas y caracterizadas<sup>34</sup>.

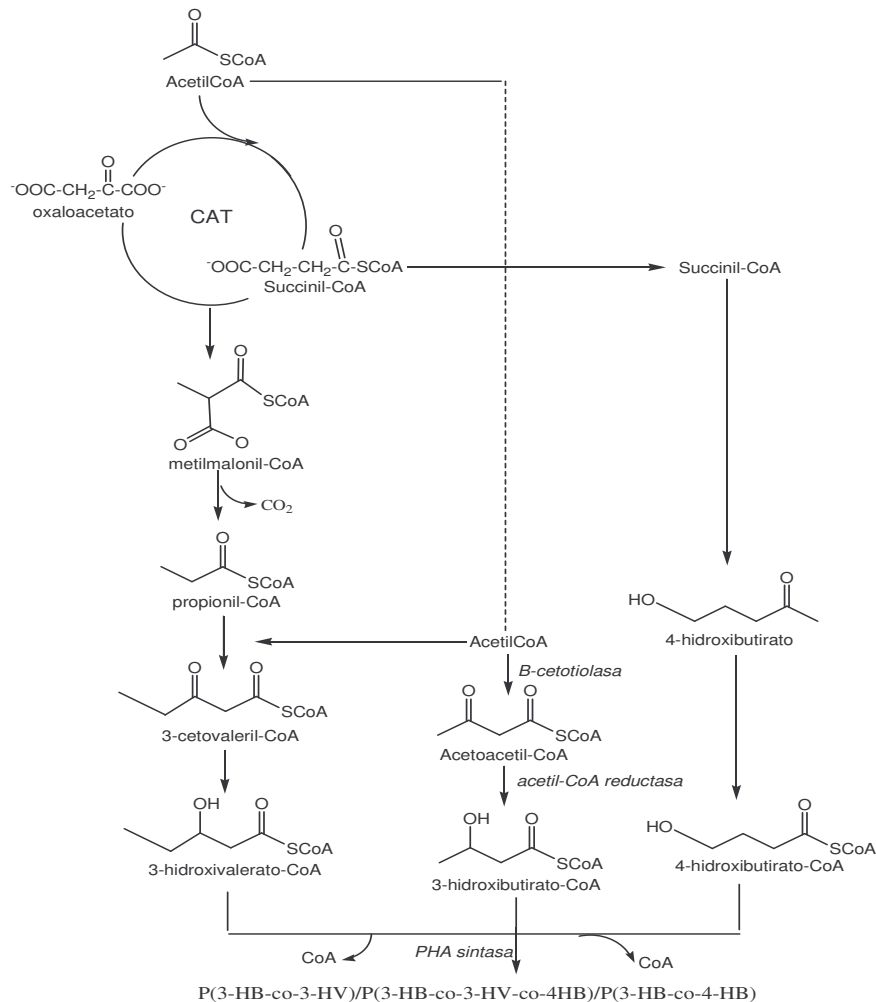
Sabeel P. y colaboradores en el 2007<sup>35</sup> propusieron una ruta biosintética para la producción de polihidroxiacetatos por el género *Bacillus*. La figura 6 muestra esquemáticamente, la biosíntesis del terciopolímero P(3HB-co-3HV)/P(3HB-co-

<sup>34</sup> GEMGROSS, O. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro*. USA. 2000. p. 92.

<sup>35</sup> VALAPPIL, S and BOCCACINI, A. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. Springer Science+Business Media B.V. 2006. 91:1-17.

3HV-co-4HB)/P(3HB-co-4HB), por *Bacillus cereus* UW85 cuando en el medio de cultivo se utilizo como fuente de carbono caprolactona.

Figura 6. Biosíntesis del terciopolímero P(3HB-co-3HV)/P(3HB-co-3HV-co-4HB)/P(3HB-co-4HB), por *Bacillus cereus* UW85.



## 2.5 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA BIOSÍNTESIS DE PHA's.

La síntesis y acumulación de los PHAs es el resultado de la deficiencia o limitación de algunos nutrientes, así como del desbalance nutricional entre las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos, sulfatos, magnesio y potasio en los diferentes medios de cultivo empleados <sup>36</sup>.

El magnesio es esencial para el crecimiento y funcionamiento celular de algunos microorganismos y parece tener los mejores papeles, principalmente en el

<sup>36</sup> STOREY. Syntesis and fabrication of completely absorbable composites for biomaterials; En biomaterials. New York. 1991. p. 123-214.

mantenimiento de la integridad de los ribosomas, como parte de un mecanismo de control para la permeabilidad de membrana celular y como cofactor en varias reacciones enzimáticas.

El fosfato es un componente vital de varias estructuras celulares, incluyendo ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas. Las transformaciones de compuestos fosfatados que están involucradas en la energética celular y la dirección de varios procesos bioquímicos en los microorganismos dependen fuertemente de la presencia de fosfatos<sup>37</sup>. Por otro lado la producción de los PHAs, es función de los ciclos celulares que dependen de la cepa en estudio y del estadio fisiológico de la misma<sup>38</sup>.

Con el objetivo de obtener estos polímeros, a partir de diferentes microorganismos, Mobley en 1994 dividió los sustratos en 2 grupos. Aquellos, que abarcan los -n-alcoholes (metanol, octanol, decanol, etanol), -n-alcanos (hexano, octano, metano, decano, heptano), y -n-alcanoicos (octanoato, hexanoato, heptanoato). La mayoría de los monómeros de los PHAs son incorporados al polímero, sólo si las células son cultivadas con una fuente orgánica cuyo esqueleto carbonado esté relacionado con la estructura del monómero constituyente. Las bacterias incorporan una amplia variedad de 3-hidroxi-alcanoatos, así como 4-hidroxi-butirato y 5-hidroxi-valerato en el poliéster. En *R. eutropha* se han detectado ácidos hidroxi-alcanoicos de 3 a 5 átomos de carbono, mientras que en *Pseudomonas oleovorans*, se han encontrado de 6 a 14, esto refleja la existencia de dos tipos de enzimas PHA sintasa en estos microorganismos, dependientes de sustratos de cadena corta y larga, respectivamente. El otro grupo son los sustratos no relacionados, en el cual se encuentran sustratos como fructosa, glucosa, acetato, lactato, succinato. En estos casos un intermediario central del metabolismo de la célula, que es empleado para la generación de energía o para propósitos anabólicos, debe ser dirigido hacia la biosíntesis de PHA. Estas rutas son muy importantes, pues permiten la síntesis de PHAs complejos a partir de sustratos simples en lugar de sustratos caros o relativamente tóxicos<sup>39</sup>. Por ejemplo, se ha reportado la síntesis de P(3-HB-co-3-HV) a partir del almidón por *Haloferax mediterranea*<sup>40</sup>, de fructosa, glucosa, succinato, acetato y lactato, por *Corynebacterium hydrocaroxydans*<sup>41</sup>; de diferentes fuentes únicas de carbono no relacionadas, por un mutante de

---

<sup>37</sup> ASENJO. Op. Cit., p.480

<sup>38</sup> BYROM, D. Polymers synthesis by microorganisms; technology and economics; Trends. Biotechnol.1990. V.5. p. 246-250

<sup>39</sup> STENINBUCHEL, Op. Cit., p.687

<sup>40</sup> ANDERSON, A. and DAWES, A. Occurrence, metabolism, metabolicrole, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol.1990 .Rev. 54. p 450-472.

<sup>41</sup> Ibid., p.22

*Alcaligenes eutrophus*<sup>42</sup>; y a partir de glucosa, sacarosa, melibiosa, sirope de maíz, melazas de remolacha y caña por *Azotobacter salinestrus*<sup>43</sup>.

En cepas de *E.coli* recombinantes la síntesis de PHB fue promovida considerablemente por la adición simultánea de pequeñas cantidades de extracto de levadura y/o hidrolizado de caseína, junto con licor de remojo de maíz. Aún no se conocen las causas de por que los complejos de diferentes fuentes de nitrógeno, promueven la síntesis de PHB en diferentes cantidades. Aún después de analizar la composición de diferentes fuentes de nitrógeno<sup>44</sup>, *Rhizobium meliloti* M5N1 acumula PHB hasta el 85% de su peso seco celular en un medio rico, que contiene extracto de levadura, suplementado con fructosa y en el cual no se observa fase logarítmica<sup>45</sup>.

Cepas de *Rhizobium meliloti* M5N1, renombradas como *Sinorhizobium meliloti*<sup>46</sup>, aisladas de *Leucerne* sp. (alfalfa), acumulan grandes cantidades de PHB (alrededor del 63 % de biomasa seca), cuando son cultivadas en presencia de fructosa<sup>47</sup>. Esto concuerda con el 81% reportado, con *Alcaligenes eutrophus* cultivada en ácido láctico<sup>48</sup>. La producción de PHB de glucosa por cultivos continuos de *Alcaligenes eutrophus*, es similar a los de *Azotobacter beijerinckii*; también la producción de polisacáridos extracelulares succinoglucanos y xantano por *Agrobacterium radiobacter* y *Xantomonas campestris* respectivamente ocurre durante el crecimiento a un ritmo bajo de dilución, en presencia o exceso de glucosa<sup>49</sup>.

La producción de plásticos biodegradables ha sido limitada en cierta forma por el costo de los sustratos utilizados, este hecho hace incomparable la competencia comercial entre los plásticos biodegradables de PHA y los plásticos sintéticos obtenidos a partir del petróleo, razón que ha dado origen a la búsqueda de soluciones para bajar los costos y contribuir así con la producción industrial. Una de las soluciones es la utilización de sustratos económicos, de fácil adquisición y que cumplan con las mínimas exigencias para el metabolismo de los microorganismos. Entre los sustratos mas usados en fermentación por su alto

---

<sup>42</sup> STENINBUHEL, A. and PIEPER, U. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. p. 1-6.

<sup>43</sup> PAGE, W. Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate- $\beta$ -hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestrus*; Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. p. 88-93

<sup>44</sup> LEE, S. and CHANG, N. Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies; Can. J. Microbiol. 1995. p. 207-215

<sup>45</sup> TAVERNIER, P. Exopolysaccharide and Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* Strains. 1997. p. 21-26.

<sup>46</sup> TAN, Z. Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium thianshanense* and Related Rhizobia. 1997. p. 874-879.

<sup>47</sup> JAN, S. Quantitative <sup>1</sup>HNMR spectroscopy analysis of the poly (3-hydroxyalkanoate) extracted from *Rhizobium meliloti* cells. 1995. V. 92. p. 1793-1796

<sup>48</sup> LINKO, S., VAHERI, H and SEPPAELEAE, J. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources. 1993. Microbiol. Biotechnol. V. 39. p. 11-15.

<sup>49</sup> HENDERSON, R. and JONES, W. Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production for *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture; Microbiology, 1997. V.143. p. 2361-2371.

contenido de carbono y su bajo costo encontramos a los almidones, los cuales hacen parte de una extensa variedad de plantas, como es el caso de la papa, maíz y cereales. También pueden ser utilizados como sustratos subproductos de otras industrias como la melaza, harina de sangre y suero de leche, además se puede utilizar otras semillas como fuentes de nitrógeno por su alto contenido de proteínas, tal es el caso de la quinua y el haba.

Nariño es un departamento agrícola que produce papa, haba, quinua entre otros alimentos de gran importancia en la dieta diaria, también cuenta con industrias lecheras y paneleras motivo por el cual existen diversos subproductos que no son aprovechados y son fuentes importantes de carbono como lo es la melaza y el suero de leche.

### 2.5.1 Contenido Nutricional de la Papa, Suero de Leche, Melaza, Haba Y Quinua.

2.5.1.1 Contenido nutricional de la papa: La papa es un alimento, muy nutritivo que desempeña funciones energéticas debido a su alto contenido en almidón así como funciones reguladoras del organismo por su elevado contenido en vitaminas hidrosolubles, minerales y fibra. Además, tiene un contenido no despreciable de proteínas, presentando éstas un valor biológico relativamente alto dentro de los alimentos de origen vegetal.

Dentro de los componentes nutritivos el que se encuentra en mayoría es el agua que constituye en torno al 80% del total. Le siguen los carbohidratos que constituyen el 16-20% entre los que hay que destacar el grupo de los almidones que son polisacáridos complejos que se absorben como glucosa bajo previa hidrólisis enzimática. La fibra alimentaria representa 1-2% del total de la papa y se encuentra preferiblemente en la cáscara.

La concentración de azúcares sencillos es baja (0,10,7%) siendo los más importantes la glucosa, fructosa y sacarosa. Es importante controlar la concentración de azúcares de la papa con objeto de prevenir las reacciones de pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard. Este tipo de reacciones indeseables puede aparecer cuando se alcanzan concentraciones del 2% de azúcares reductores. La cantidad de azúcares de la papa está afectada por tres tipos de reacciones: Para ello es fundamental controlar la temperatura de almacenamiento. Si se reducen las temperaturas de almacenamiento para evitar la germinación por debajo de 10°C se reducen las velocidades de las reacciones de forma desigual generándose tubérculos dulces y con una mala textura. Si se mantienen las temperaturas entre 15 – 20°C se produce disminución del contenido de azúcares.

Las proteínas son el nutriente más abundante después de los carbohidratos constituyendo el 2% del total, presentándose mayoritariamente en el cortex (zona inmediatamente debajo de la cáscara) y la médula (zona central). Destacan las albúminas (49%) y globulinas (26%) como las fracciones proteicas más abundantes seguidas de prolaminas (4,3%) y glutelinas (8,3%). Así mismo destaca

la presencia de gran cantidad de enzimas y aminoácidos libres cuyas concentraciones dependen de la forma de cultivo y almacenamiento. Los lípidos no tienen importancia desde un punto de vista cuantitativo (0,1%) y se encuentran mayoritariamente en la cáscara. Existe gran cantidad de vitaminas hidrosolubles tales como la vitamina C y algunas del complejo B. También la papa es rica en minerales, los cuales constituyen el 1% del total de la papa, destacando el potasio como elemento mayoritario.

En lo que se refiere a los componentes no nutritivos resaltan los pigmentos que son carotenoides responsables del color de la papa de color y las clorofilas que se pueden hacer patentes en el caso de papas expuestas al sol. Además existen ácidos orgánicos tales como cítrico, oxálico, fumárico y málico que además de regular la acidez de la savia de la papa, contribuyen al aroma y sabor. Existen algunos glicósidos tóxicos siendo el más importante la solanina constituida por el alcaloide solanidina que se encuentra unido a sendas moléculas de glucosa, galactosa y ramnosa. La concentración en condiciones normales es de 50-100 mg/100g, pero cuando las papas se exponen al sol se pueden alcanzar concentraciones tóxicas (=200 mg/100g). La solanina se concentra en la cáscara y brotes y también en el córtex de la papa por lo tanto, un pelado generoso es una alternativa interesante para prevenir la intoxicación aunque, como contrapartida, se eliminan una parte importante de los nutrientes y fibra. Además, el calentamiento que se realiza durante los diferentes procesos culinarios hidroliza parcialmente estos alcaloides inactivando su acción tóxica<sup>50</sup>.

Figura 7. Cultivos de papa



Cultivos de papa Variedad Capiro  
Departamento de Nariño

2.5.1.2 Contenido nutricional del suero de leche: El suero de leche contiene hidratos de carbono en forma de lactosa o azúcar de leche. La lactosa es un disacárido compuesto de una molécula de glucosa y una molécula de galactosa. Cien gramos de suero de leche líquido contienen 4.7 g de azúcar de leche.

La lactosa es el componente principal del suero de leche y la que le confiere sus propiedades más importantes. Dado que el azúcar de leche como disacárido es

<sup>50</sup> <http://www.alimentacion-sana.com.ar/Informaciones/Chef/papas%20y%20patatas.htm>

fácilmente asimilable por el organismo, la lactosa constituye una buena fuente de energía. La investigación moderna ha demostrado que existen dos tipos de ácido láctico : ácido D(-)- láctico y ácido L(+)- láctico es mas fisiológico por que el organismo posee la enzima necesaria para su catabolismo. De igual manera el organismo transforma la lactosa en ácido L(+)- láctico.

El ácido láctico contenido en el suero de leche fresco se compone exclusivamente del tipo de L(+)-es decir de ácido láctico fisiológico, sin embargo después de cada hora que pasa pierde calidad y se transforma en ácido D(-)- láctico<sup>51</sup>.

Figura 8. Obtención de suero de leche.



2.5.1.3 Contenido nutricional de la melaza: La melaza es un líquido denso y negrozco constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la mayor parte de los azúcares de caña por cristalización y centrifugación. Los azúcares representan del orden del 80% de su contenido en materia seca. Su contenido energético es apreciable en todas las especies. La melaza tiene un valor nutritivo por contener sacarosa ( 32%) y oligosacáridos (rafinosa) y ácidos orgánicos (málico, oxálico, láctico, acotínico y cítrico). Esta tiene un contenido en proteína bruta del 4%. La fracción nitrogenada es totalmente soluble, estando constituida en un 50% por aminoácidos (principalmente aspártico y glutámico) y en un 50% por nitrógeno no proteico. La proporción de aminoácidos esenciales es muy baja. La melaza es particularmente rica en betaína, un compuesto nitrogenado donador de grupos metilo en diversas reacciones metabólicas.

Las melazas presentan altos contenidos en cenizas. Las de caña son ricas en calcio, cloro, magnesio y en potasio. Los principales factores limitantes son el efecto laxante en monogástricos, por su desequilibrio electrolítico y la presencia de carbohidratos no asimilables. Por otra parte, a dosis altas suponen un deterioro del gránulo y además, tiene un manejo dificultoso por su elevada viscosidad, requiriendo el uso de tecnología apropiada para su adición. Su manejo puede facilitarse por la adición de agua. En este caso, no debe almacenarse durante períodos prolongados para evitar el crecimiento bacteriano.

<sup>51</sup> WIKIPEDIA, La enciclopedia libre. Disponible en internet [http://es.wikipedia.org/wiki/Suero\\_de\\_leche](http://es.wikipedia.org/wiki/Suero_de_leche)

Cuando la humedad es la habitual este problema no ocurre por la elevada presión osmótica de estos productos<sup>52</sup>.

Figura 9. Obtención de la melaza en forma artesanal e industrial.



2.5.1.4 Contenido nutricional del Haba: El grano de haba contiene una importante cantidad de aminoácidos esenciales, como cistina, metionina, lisina, leucina, triptófano, entre otros, que son de gran importancia para la alimentación humana<sup>53</sup>.

Tabla 1. Principales componentes del grano de haba seco.

COMPOSICIÓN POR 100g	
COMPONENTE	CANTIDAD
Agua	77,4 %
Carbohidratos	14,3 g
Proteínas	6,9 g
Lípidos	0,5 g
Calcio	35 mg
Fósforo	85 mg
Fierro	3,2 mg
Potasio	- mg
Sodio	- mg
Vitamina A (valor)	- UI
Tiamina	0,17 mg
Riboflavina	0,02 mg
Niacina	1,3 mg
Acido ascórbico	6,4 mg
Valor energético	72 cal

Schmidt – Hebbel et al,1992

<sup>52</sup> WIKIPEDIA, La enciclopedia libre. Disponible en internet □ <http://es.wikipedia.org/wiki/Melaza> □

<sup>53</sup> [http://www.puc.cl/sw\\_educ/hort0498/HTML/p192.html](http://www.puc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p192.html)

Figura 10. Granos y vainas de Haba



2.5.1.5 Contenido nutricional de la Quinua: La quinua es una semilla pequeña de tamaño. Este grano es autóctono de los Andes y forma parte de la dieta habitual de los Incas. Tiene un color amarillo sin brillo pero unas especies varían de casi blanco a rosa naranja o de rojo a púrpura y negro. La quinua no es propiamente un cereal, más bien un pseudo-cereal aunque forme granos o semillas, es una planta anual de hojas anchas perteneciente a la familia de las quenopodiáceas, a la que también pertenecen la remolacha, las espinacas y las acelgas. Además de las semillas, también se aprovechan las hojas cocidas como verdura fresca y crece de tres a seis pies de alto.

Las semillas están cubiertas de saponinas (sustancias resinosas) que son amargas y que forman una solución jabonosa en el agua. Algunos tipos de granos de trigo podrían acercarse a la riqueza de proteínas de la quinua, pero cereales tales como la cebada, el maíz y el arroz generalmente tienen menos de la mitad de sus proteínas. Además la quinua, tiene un buen balance de aminoácidos a partir de los cuales se generan las proteínas.

Estas semillas tiene una cantidad apreciable de proteínas (superando a muchos cereales conocidos); sin embargo su verdadero valor nutritivo radica en la calidad de sus proteínas, es decir en la combinación de una mayor proporción de aminoácidos esenciales para la alimentación humana. Es excepcionalmente rica en lisina, un aminoácido no muy abundante en el reino vegetal. Contiene todos los aminoácidos esenciales, particularmente arginina e histidina. En resumen. la quinua posee la mayor proporción y mejores proteínas respecto del resto de cereales, es rica en Ácidos grasos y minerales (es una fuente de vitamina E y de varias vitaminas del grupo B).

Los aminoácidos que la constituyen son: la leucina, isoleucina, metionina, fenilamina, treonina, triptófano y valina. La concentración de lisina en la proteína de la quinua es casi el doble en relación a otros cereales y gramíneas y además de las vitaminas del complejo B, contiene vitamina C, E, tiamina, riboflavina y posee un alto contenido de minerales, tales como fósforo, potasio, magnesio y calcio entre otros. Personas que por circunstancias propias se ven obligadas a consumir poca leche y productos lácteos, tiene en la quinua un sustituto ideal para el abastecimiento de calcio. Además no tiene colesterol, no forma grasas en el organismo, debido a que la presencia de ácidos ólicos no saturados es prácticamente nulo.

Teniendo en cuenta los componentes nutritivos de estos alimentos y subproductos de otras industrias, se determino que pueden ser incorporados como sustratos realizándoles una hidrólisis ácida para que sean sustratos asimilables por los microorganismos, siendo esta una alternativa para la producción industrial de PHA<sup>54</sup>.

Figura 11. Plantas y semillas de Quinua



## 2.6 TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN.

Hoy por hoy, la atención mundial se centra en el estudio de un tipo de poliésteres tales como el Polihidroxialcanoato (PHA) ,el Polilactato (PLA) y el Policaprolactano (PCL) , que son absolutamente biodegradables. Mucha de la investigación mundial se ha enfocado en torno al PHA. Este es un polímero biodegradable obtenido por procesos naturales en ciertos microorganismos cuando estos experimentan ciertas condiciones ambientales.

Muchos grupos de investigación buscan sustituir los sustratos originales por otros que resulten más económicos. Tal es el caso de una compañía brasileña que inicio a producir el biopolímero PHB a partir de azúcar de remolacha, las instalaciones de la planta fermentadora pretendían producir 50 kg/año y posteriormente en una planta ampliada 300 T por año. Este grupo de investigación brasileño considera que puede haber un consumo de 2.5 kg de sacarosa por 1 kg de polímero producido<sup>55</sup>.

La producción de PHB se ha logrado usando una variedad de técnicas de cultivo, principalmente fed-batch, de lo cual se obtienen en el biorreactor concentraciones muy altas de células y PHB. La comercialización de PHB como termoplástico producido biológicamente tiene que sustentarse primero, en la producción de niveles adecuados de PHB y también en la habilidad de los procesos sintéticos de incorporar otros ácidos en el polímero para la producción "in situ" de heteropolímeros<sup>56</sup>.

---

<sup>54</sup> <http://www.prodiversitas.bioetica.org/quinua.htm>

<sup>55</sup> NOTHENBERG, M. Bactéria produz resina biodegradavel de açúcar. Plástico moderno. 1997. p.28-37

<sup>56</sup> ASENJO, Op. Cit., p.470.

De igual manera se han encontrado otros reportes de una producción muy eficiente de PHB en *E. coli* XI1-Blue, a través de un cultivo fed-batch estable (aproximadamente 89 g.L<sup>-1</sup> en 42h), conteniendo una elevada dosis de genes para la producción de PHB a altas concentraciones en *E. coli*. El inconveniente radica en que las cepas de *E. coli* recombinantes pierden rápidamente los plásmidos durante la síntesis de PHB, por lo que es necesario usar plásmidos estables<sup>57</sup>. La producción industrial de PHB y los copolímeros se lleva a cabo en un sistema de alimentación en batch, en un fermentador aeróbico de 20000 L de capacidad, que toma alrededor de tres días. Los organismos se introducen en un medio alimenticio de glucosa como fuente de carbono y energía. Al inocular en la etapa de fermentación, el medio contiene, una cantidad calculada de glucosa y fosfato basada en los requerimientos conocidos del organismo, para permitir la producción de una cantidad dada de biomasa y exceso de otros nutrientes. Cuando en el cultivo en desarrollo el fosfato se agota en el medio, este será el punto limitante para comenzar a almacenar polímero. El peso seco de biomasa alcanzado es de 100g.L<sup>-1</sup>.

La policaprolactona (PCL) es también un plástico biodegradable sintetizado químicamente por la polimerización de  $\epsilon$ -caprolactona (6-hexanolide). La PCL es producida a un costo más bajo que los PHA, pero se funde a 60°C. A partir de que el PHB y PCL poseen esta propiedad física diferente es posible cambiar las propiedades físicas de los plásticos biodegradables, a través de una simple combinación del PHB con el PCL, en determinadas proporciones para conocer la variación de la demanda en el mercado<sup>58</sup>

En 1995 una planta de E.E.U.U preveía reducir los costos de PHB a \$ 7por Kilo y planeaban construir una planta de 1000 T anuales, donde el biopolímero no debería de costar más de \$ 3 el kilogramo. Mientas que las empresas brasileñas pretenden construir las unidades de producción junto a las fábricas de azúcares y alcohol; como consecuencia las nuevas instalaciones aprovecharían utilidades como vapor de agua y los gastos en combustible serían virtualmente nulos al usar el bagazo<sup>59</sup>. En Billingham, en Inglaterra, "Imperial Chemical Industries" (ICI) esta produciendo PHA y comercializando el material como polímero para envases bajo la marca Biopol, que utiliza la bacteria *Alcaligenes eutrophus*: ICI obtiene rendimientos superiores al 80% de peso seco de un copolímero poli- $\beta$ hidroxibutirato/poli- $\beta$ -hidroxivalerato (PHB/PHV)<sup>60</sup>. La empresa británica ICI tiene patentados procesos industriales para fabricar PHA donde casi el 90% de las unidades son polihidroxivalerato (PHV), que es un polímetro flexible y comerciable<sup>61</sup>.

---

<sup>57</sup> LEE, Op. Cit., p. 450

<sup>58</sup> ODA, Op. Cit., p.250

<sup>59</sup> NOTHENBERG, Op. Cit., p. 34.

<sup>60</sup> KRANZ, R., GABBERT, M y MADIGAN, T. Positive Selection Systems for Discovery of Novel Polyester. Biosynthesis Genes Based on Fatty Acid Detoxification. (1997). V. 63. p. 3010-3013

<sup>61</sup> KARR, Op. Cit., p. 1337

La producción de PHA de ICI se suele realizar a una escala relativamente pequeña, El costo actual de una botella de PHB/PHV es varias veces mas elevado que el de una botella de plástico sintético. Sin embargo, la expansión de la planta a una capacidad 20 veces superior colocaría el costo del PHA sobre una base competitiva con los plásticos derivados del petróleo, especialmente en los mercados de consumidores preocupados por los problemas ambientales<sup>62</sup>.

## 2.7 DEGRADACION DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

Aunque muchos microorganismos están involucrados en la degradación de plásticos biodegradables en medios ambientes naturales, los hongos parecen jugar un papel muy importante partiendo del hecho de que los polisacáridos de base PHA son generalmente degradados bajo condiciones ambientales, en las cuales los hongos son los microorganismos dominantes (Ej. abono, rellenos municipales, invernaderos, etc.)<sup>63</sup>. En la figura 13 se observa la degradación de un envase fabricado con PHA. La biodegradabilidad se realza, por que a diferencia del polipropileno (sintético), el PHB procariótico no flota, sino que se hunde y va al fondo, formando parte del sedimento, donde es degradado aproximadamente en un mes, en vez de un año que podría tomarse, de haber permanecido en la superficie, siendo el resto de las condiciones iguales<sup>64</sup>.

Figura 12. Degradación de envases fabricados con polihidroxicanoatos. Fuente. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Photograph courtesy of Dieter Jendrossek, Georg-August. Universita, Gottingen, Germany.



Descubrimientos reciente de las degradaciones bacterianas aeróbicas y anaeróbicas de poliésteres sintéticos sugieren, que la evolución natural de enzimas despolimerizadoras quizás puede ser posible a partir de hidrolasas existentes en un tiempo razonable, siempre que los monómeros sean fuentes de energía adecuada para una amplia variedad de microbios.

<sup>62</sup> STOREY, Op. Cit., p.126

<sup>63</sup> ODA, Op. Cit., p.274.

<sup>64</sup> WEINER, R. Biopolymers from marine prokariotes; Tibtech.1997. V.15. p. 390-394.

Muchos microorganismos son capaces de degradar el PHB existente en el medio ambiente para lo cual secretan PHB despolimerasas. Los genes de estas enzimas son clonados y secuenciados. *Alcaligenes faecalis* T1 es una bacteria degradadora de PHB que secreta una hidrolasa oligomérica ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico (hidrolasa oligomérica 3HB), además de PHB despolimerasas, aunque el papel fisiológico de esta hidrolasa aún no está muy claro.

Las despolimerasas purificadas a partir de estas bacterias, muestran relativamente baja actividad de hidrólisis del dímero D-(-)-3-hidroxi-butirato comparado con su actividad PHB despolimerizadora. Es posible que estas bacterias secreten PHB hidrolasa oligomérica, además de PHB despolimerasas, para compensar la relativamente baja actividad de hidrólisis de la PHB despolimerasa por el dímero<sup>65</sup>.

En conclusión la biodegradación se inicia cuando las condiciones de los medios tales como temperatura, humedad y pH son las apropiadas. La biodegradabilidad puede ser parcial o total, la primera es una alteración de la estructura química y la segunda termina con la producción de gas carbónico en condiciones aeróbicas y metano en condiciones anaeróbicas; además hay producción de agua y sales minerales. En algunos casos pueden quedar fragmentos resistentes a la degradación<sup>66</sup>.

Los pasos generales que sigue la degradación de PHA's ya sea total o parcial son los siguientes:

1. La degradación comienza con la actuación de una enzima proteolítica que desorganiza la envoltura lipoproteína de los gránulos.
2. Los gránulos así "activados" sufren ahora la acción de una despolimerasa que va degenerando el dímero de hidroxibutírico.
3. La actuación de una dimerasa específica, generada por el mismo  $\beta$ -hidroxibutirato a partir de los ésteres diméricos, termina el proceso de despolimerización<sup>67</sup>.

## 2.8 APLICACIONES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

Los posibles usos de PHA's bacteriano están conectados directamente con sus características tales como degradación biológica, características termoplásticas, características piezoeléctricas, y de despolimerización de PHB con el ácido monomérico de D(-)-3-hidroxi-butírico. Los usos de PHA's bacteriano se han concentrado principalmente en las siguientes áreas: medicina, farmacia, con fines

---

<sup>65</sup> ZHANG, K., SHIRAKI y SATIO, T. Purification of an Extracellular D-(-)- 3-Hydroxybutyrate oligomer hidrolase from *Pseudomonas* sp.1997.

<sup>66</sup> ALBERTSSON and KARLSSON, S. Degradable Polymers for the Future. 1995. p. 113-125

<sup>67</sup> LAÑEZ, Op. Cit., p.2-10.

agrícolas, y para otros fines industriales <sup>68,69</sup>. El desarrollo más avanzado de PHA's bacteriano está en el campo médico, especialmente en usos farmacéuticos, aunque tiene un potencial considerable al utilizarlos en productos de consumo.

2.8.1 Medicina y Farmacia: El PHB es importante en esta área debido a que el ácido D(-)-3-hidroxibutírico, es un compuesto metabólico intermedio común, en todos los organismos superiores<sup>70</sup>. Por lo tanto, es posible la biocompatibilidad con los tejidos animales y el (3HB) puede ser implantado en tejidos, sin temor a producir algún compuesto que sea tóxico y afecte el organismo. Algunos usos de PHA's bacteriano aplicados a la medicina y a la farmacia incluyen: portador biodegradable para la dosificación a largo plazo de drogas dentro del cuerpo, para pernos quirúrgicos, suturas, esponjas, para la preparación de heridas, como reemplazos para placas del hueso, reemplazos del vaso sanguíneo, estímulo del crecimiento y como curativo del hueso por las características piezoeléctricas. La ventaja de usar los plásticos biodegradables durante la implantación es que será biodegradada, es decir, la necesidad del retiro quirúrgico no es necesaria<sup>71,72</sup>.

Figura 13. Medicamentos recubiertos con polihidroxialcanoatos.



2.8.2 Agricultura: Por ser los copolímeros polienos que se biodegradan en el suelo, su uso es muy prometedor en la agricultura, ya que pueden ser utilizados como portador biodegradable para la dosificación a largo plazo de insecticidas, los herbicidas, o los fertilizantes, los envases de la planta de semillero y las envolturas plásticas que protegen las semillas en crecimiento, además son una matriz biodegradable para el lanzamiento de la droga en veterinaria y tubería para la irrigación de la cosecha<sup>73</sup>.

<sup>68</sup> LENZ, R. y KIMB, W. Functionalized poly(3-hydroxyalkanoates) produced for bacteria; Novel. Biodegradable. Microbial. Biopolymer.1990. p. 23-25

<sup>69</sup> LINDSAY, K. "Truly degradable resins are now truly commercial". Modern Plastics. 1992. p. 69-62-64

<sup>70</sup> LINKO, S., VAHERI, H. y SEPPAELEAE, J. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources; Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993). V.39(1). p. 11-15.

<sup>71</sup> ROSE, A. Microbiología Química. Introducción a la fisiología Microbiana. Segunda Edición española. ed. Alhambra, Madrid, España. 1997.

<sup>72</sup> SAN ROMAN, J. y GUILLEN, P. Biomateriales poliméricos compuestos para aplicaciones quirúrgicas: material para cirugía ortopédica y remodelación ósea; Rev. de Plásticos Modernos. (1992) V.438. p. 674-688.

<sup>73</sup> ROCHE. Dig System and Dig Application Manual. Editado Roche. 2003.

Figura 14. Semillas cubiertas con bolsas de Polihidroxialcanoatos.



2.8.3 Otros Usos: El homopolímero de PHB y copolímero de PHB-PHV tienen algunas características como: fuerza extensible y flexibilidad, similares al polietileno y poliestireno. Algunos autores, divulgaron que los PHAs se pueden utilizar en diferentes procesos, además que al ser este moldeado y mezclado con el polímero sintético, puede obtenerse un heteropolímero<sup>74</sup>. También, las adiciones pequeñas de PHA mejoran la característica de algunos polímeros convencionales, por ejemplo la adición de una cantidad pequeña de PHA reduce la viscosidad del derretimiento del acrilonitrilo.

Figura 15. Envases fabricados con polihidroxialcanoatos



Una característica particular de las películas de PHB que permite ser utilizado para el acondicionamiento de los alimentos es la difusibilidad relativamente baja del oxígeno. Los plásticos producidos de PHA's se han divulgado para ser biodegradados en los ambientes aerobios y anaerobios. En resumen, los usos posibles de PHA's para los diferentes productos, incluyen las películas de empaquetado, bolsos, envases, artículos de uso diario en las familias tales como maquinillas de afeitar, los utensilios, los pañales, y los productos femeninos<sup>75</sup>.

Otra de las aplicaciones consiste en que se puede utilizar directamente en máquinas de transformadores para la aplicación de corrientes, de forma tal que disminuiría su costo de producción, dejando la purificación si fuera necesario a

<sup>74</sup> LAGEWEER, R. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*, effect of substrates on formation and composition of poly-R-3hydroxyalkanoates; *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V.54 p. 2924-2932.

<sup>75</sup> LEAF, T. *Sacharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. *Microbiology*. 1996. V. 142. p. 1180-1196

cargo del comprador<sup>76</sup>. Actualmente existe una línea de frascos de champú fabricados con el copolímero P(HB-co-HV), y ha sido empleado como fuente de carbono en la desnitrificación del agua potable<sup>77</sup>.

---

<sup>76</sup> NOTHENBERG, Op. Cit., p. 39

<sup>77</sup> BIEHLER, M. A first practical use of specially constructed starter cultures in a new biotechnological nitrate elimination process for drinking water with degradable biopolymers as adhesion material; En DECHEMA Biotechnology Conferences. 1998. 3(B). p.997-1002 (Biehler, 1989; Storey, 1991; Nothenberg, 1995; Biedermann et. al., 1997).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO

Para el desarrollo de este proyecto se empleó una cepa bacteriana silvestre identificada como *Bacillus mycooides* M17-2. Este aislamiento microbiano hace parte del Banco de Cepas del Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Departamento de Biología de la Universidad de Nariño y fue seleccionada porque que es productora natural de copolímero poli-(3-Hidroxi-butirato-co-3-Hidroxi-valerato 95:5)<sup>78</sup>.

La bacteria se preservó en perlas de porcelana y se activó en 50ml medio de cultivo líquido compuesto por: 15 g.L<sup>-1</sup> Sacarosa (Merck); 5 g.L<sup>-1</sup> peptona (Oxoid) y 1 g.L<sup>-1</sup> Fosfato ácido de sodio (Carlo Erba). El pH se ajustó a 6.5 con NaOH saturado. Una vez esterilizado el medio de cultivo, las bacterias fueron incubadas a 30°C con agitación constante de 100 rpm durante 24 horas. Transcurrido este tiempo y utilizando una asa estéril se realizaron siembras por agotamiento de la bacteria *B. mycooides* M17-2 en medio de cultivo sólido Agar Nutritivo (Oxoid). Los cultivos se llevaron a una incubadora a 30°C durante 24 horas<sup>79</sup>.

#### 3.2 ELABORACION DE UN MEDIO DE CULTIVO DE REFERENCIA PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA.

Como no existe un medio de cultivo de referencia que soporte tanto el crecimiento como la síntesis de PHA en *Bacillus mycooides* M17-2, es necesario elaborarlo a partir de sustratos suministrados por casas comerciales, el cual se utilizará de comparación con el medio de cultivo diseñado a partir de sustratos obtenidos de las industrias nariñenses.

Para encontrar la concentración óptima de los sustratos, se utilizó un diseño factorial exploratorio 2<sup>3</sup> con tres factores de respuesta y dos niveles por factor. Los factores fueron: Sacarosa (Merck), peptona (Oxoid) y fosfato ácido de sodio (Carlo Erba). Para cada factor se incluyó un nivel central en el cual las concentraciones de los factores se ubican en una zona intermedia a puntos extremos (+1, -1) según lo indica la tabla 2<sup>80-81</sup>. Con tamaños de paso de 5g/L para sacarosa, 2,5g/L para peptona y 0,5g/L para fosfato ácido de sodio. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y esterilizado por autoclave, el pH fue ajustado a 6,5 con NaOH saturado.

---

<sup>78</sup> FERNANDEZ, P. Op. Cit

<sup>79</sup> STOREY, Op. Cit., p. 218

<sup>80</sup> CHISTI, Y. and MOO-YOUNG, M. Bioprocess intensification through bioreactor engineering. Trans Inst Chem. Eng. 1996.

<sup>81</sup> CHISTI, Y. Fermentation. Basic considerations .In: Robinson R, Batt C, Patel P, editors. Encyclopedia of food microbiology. London academic Press. 1999.

Tabla 2. Concentraciones de sustancias empleadas en el medio de cultivo de acuerdo con los niveles de paso.

VARIABLE	Tamaño de Paso	NIVEL		
		0	1	-1
SACAROSA	5g/L	15g/L	20g/L	10g/L
PEPTONA	2,5g/L	5g/L	7,5g/L	2,5g/L
FOSFATO ACIDO DE SODIO	0,5g/L	1g/L	1,5g/L	0,5g/L

En la tabla 3 se presenta la matriz codificada del diseño experimental factorial, en la cual se ubican los diferentes experimentos y como variable de respuesta la producción de PHA en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Tabla 3. Matriz codificada. Diseño Factorial.

	Factores a Evaluar			Variable de respuesta
	PEPTONA	SACAROSA	FOSFATO	PHA mg/l
1	-1	-1	-1	
2	1	-1	-1	
3	-1	1	-1	
4	1	1	-1	
5	-1	-1	1	
6	1	-1	1	
7	-1	1	1	
8	1	1	1	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	0	0	0	
12	0	0	0	
13	0	0	0	

3.2.1 Preparación de preinòculo e inòculo: Con una aza de argolla se tomó una colonia de las conservadas en caja petri y se la llevó a un erlenmeyer que contenía 100ml de medio de cultivo “sacarosa  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , peptona  $5 \text{ g.L}^{-1}$  y fosfato ácido de sodio  $1 \text{ g.L}^{-1}$  y pH 6,5, luego se incubo a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas con agitación constante de 100rpm.

3.2.2 Preparación de fermentación: Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó el 10% del inòculo a 60ml de los medios de cultivo preparados mediante las concentraciones establecidas en la tabla 3. Las concentraciones bacterianas de cada uno de estos, fueron ajustadas a una densidad óptica 0.02 Absorbancia mediante un espectrofotómetro *Perkin-Elmer Lambda 11*. Los medios de cultivo

fueron realizados en erlenmeyers de 150ml e incubados a 30 °C en un agitador rotatorio (100 rpm) durante 24h.

### 3.3 EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DEL POLÍMERO PARA SU CUANTIFICACIÓN POR GC

La extracción y cuantificación de PHA se realizó mediante el método de Saruul<sup>82</sup> y estandarizada en el Grupo de Investigación de procesos biotecnológicos de la Universidad de Nariño (BIOMA)<sup>83</sup>.

3.3.1 Extracción del Biopolímero: Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó 50ml de medio de cultivo a 5000 rpm durante 5 min y tras varios lavados con agua destilada, los botones celulares obtenidos se resuspendieron con 1 ml de hipoclorito de sodio con 5% de cloro libre, EDTA 10mM y se sometieron a 70<sup>0</sup>C durante 2 horas. Luego se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto y se lavó varias veces con agua destilada. El sedimento recuperado se resuspendió en 1mL de acetona, se centrifugó desechando el sobrenadante y luego se agregó 1mL de metanol, repitiendo el proceso de centrifugación para finalmente secar el biopolímero obtenido a 50<sup>0</sup>C por 20 horas<sup>84-85</sup>.

3.3.2 Cuantificación del Biopolímero por Cromatografía de Gases: Para este análisis fue necesario esterificar el polímero obtenido en sus respectivos metil ésteres de ácido graso ( FAME's), para lo cual se adicionó 1mL de cloroformo (grado analítico) y 1mL de agente derivatizante metanol: ácido sulfúrico (15% v/v)<sup>86-87</sup>. Finalmente se eliminó la fase acuosa y luego se adicionó sulfato de Sodio anhidro para deshidratar completamente la muestra. Posteriormente se extrajo 0.4µl de fase orgánica y se inyectó en un cromatógrafo de gases<sup>88</sup> (*Shimadzu* 17A) con un detector de ionización en llama (FID) y una columna MDN-5 (30m x 0.25mm d.i, 0.25µm de espesor); con helio como gas de arrastre a una presión de 144Kpa, velocidad lineal de 40cm/seg, flujo interno 1mL/min, razón split 24 y un flujo total de 52 ml/min; temperatura del horno 60°C (2min) @ 6°C/min hasta 90°C (1min).

3.3.3 Identificación y cuantificación de los monómeros del polímero: La cuantificación se realizó con base en los factores de respuesta (Rf) obtenidos para cada metil éster del patrón de copolímero P(3-HB-co-3-HV) a partir de su curva de

---

<sup>82</sup> SARUUL, P., SRIENC, F. Production of a biodegradable plastic polymer poly-β-hydroxybutyrate in transgenic alfalfa. *Crop.Science*. 2002. p. 919-927.

<sup>83</sup> FERNANDEZ, P. Op. Cit

<sup>84</sup> KUNIKO, M. NAKAMURA, Y. And DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. En: *Polymer Commun*. 1988. Vol.29 p.174-176.

<sup>85</sup> YU, Jian and SI, Y. Dynamic Study and Modeling of the Formation of Polyhydroxyalkanoates Combined with Treatment of High Strength Wastewater. 2000. p. 3-4.

<sup>86</sup> PHILLIP, R. Formation of Short Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid β-Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol.3 No.1 p.208-213

<sup>87</sup> LAW, K. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge. 2001. p. 7-12

<sup>88</sup> Ibid.,p.5

calibración (Anexo A). El cálculo de las concentraciones de 3HB y 3HV en mg/L se realizó por medio de la ecuación 1<sup>89</sup>.

$$C_x = \frac{A_x}{R_{fx}} * \frac{V_f}{V_o}$$

C<sub>x</sub> : concentración del compuesto de interés

A<sub>x</sub> : área cromatográfica del compuesto de interés

R<sub>fx</sub> : factor de respuesta del compuesto de referencia

V<sub>f</sub> : volumen final del extracto

V<sub>o</sub> : volumen de suspensión bacteriana

(Ecuación 1)

### 3.4 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS COMO FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO.

3.4.1 Producción de Hidrolizado de Harina de Papa: Para la producción del hidrolizado se utilizó papa variedad capiro. Se pesó 500 gramos de papa sin cáscara y se sometió a 50<sup>0</sup>C durante 24 horas para determinar humedad y peso seco. La muestra se homogenizó en un molino industrial, posteriormente se tamizó en un tamiz número 30 de 0,508mm de diámetro. Se tomaron 3 muestras de 10g por triplicado y se realizó la hidrólisis de las muestras teniendo en cuenta una relación de harina de papa: Acido 1:3. Las concentraciones de ácido utilizadas fueron 1%, 3% y 5% recomendadas en la literatura para hidrolizar almidón con ácido sulfúrico<sup>90,91</sup>. Posteriormente la harina de papa y ácido se agitó durante dos horas en plancha de agitación a 30<sup>0</sup>C. Luego las muestras fueron llevadas a 100<sup>0</sup>C en reflujo durante 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar y se neutralizó con hidróxido de sodio y posteriormente se cuantificó azúcares totales presentes en el hidrolizado por el método de Antrona<sup>92</sup>.

3.4.2 Producción de Hidrolizado de Harina de Haba y Quinua: Para producir estos hidrolizados se utilizó grano maduro de haba y quinua comercializado en la región, una vez seleccionada la materia prima se descorticó en el caso del haba y se secó a 50<sup>0</sup>C por 24 horas para determinar humedad y peso seco, posteriormente se molieron 500g de muestra para obtener un tamaño de partícula fino. De la harina obtenida se tomo 0.5g para la determinación de proteína por el método Kjeldahl<sup>93</sup>.

Para la hidrólisis de la harina de haba y quinua se utilizó ácido clorhídrico 3N, 5N y 7N en relación 1:3 harina, ácido. La mezcla se llevo a agitación continua por 2 horas a 30<sup>0</sup>C y posteriormente se aumento la temperatura hasta 100<sup>0</sup>C en reflujo

<sup>89</sup>CROMATOGRAFIA DE GASES. Education.Quantitation. Methods in GC. Alltech Associates.1998

<sup>90</sup> BELLO, Luis, Isolation and partial Characterization of banana starches. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999 Vol.47.p. 854-856.

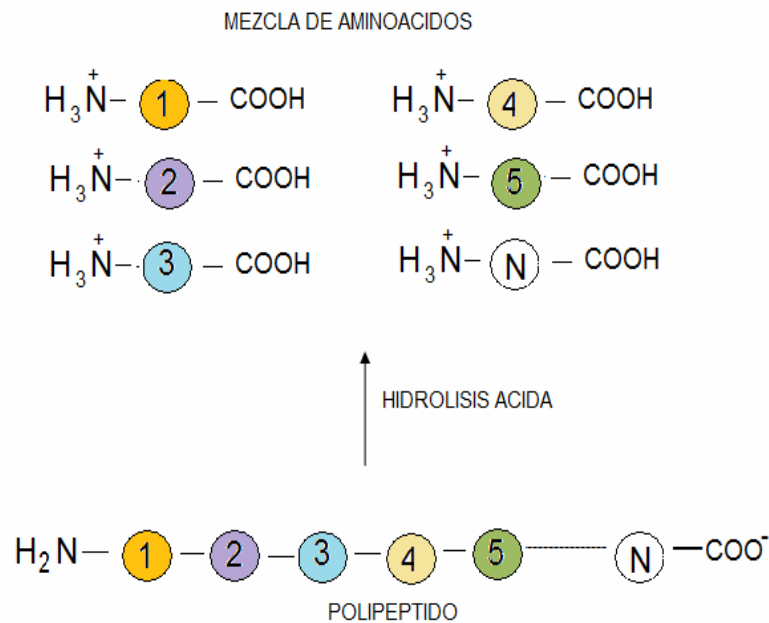
<sup>91</sup> HYAVARINER, A. And DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química, Hidrólisis con Ácidos en Almidones, España: Hispano Americana.1962. Tomo I. p. 153.

<sup>92</sup> AOAC, Official Methods of Analysis, 16 ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington. 1995.

<sup>93</sup> CLESCERI, L., GREENBERG, A., TRUSELL, R. Metodos Normalizados, Edición Díaz de Santos, S.A. 1992. p. 4-163.

por 15 horas.<sup>94</sup> Pasado este tiempo se neutralizó con hidróxido de sodio. Los hidrolizados proteicos resultantes se caracterizaron mediante el análisis del contenido en proteínas por el método Kjeldahl.<sup>95,96</sup> Esquemáticamente el proceso de hidrólisis se lo observa en la Figura 17.

Figura 16. Proceso de hidrólisis ácida de proteínas.



### 3.4.3 Selección de sustratos para la producción de PHA, por *Bacillus mycoides* M17-2.

3.4.3.1 Selección de la fuente de carbono: Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, de 5 tratamientos y 3 replicas por cada tratamiento, donde el erlenmeyer es considerado como unidad experimental. El medio de cultivo empleado tuvo la misma composición que el medio de cultivo de referencia descrito en el epígrafe 3.2, pero se vario la fuente de carbono por melaza, hidrolizados de harina de papa y suero de leche a una concentración de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Los medios de cultivo fueron incubados a  $30^\circ\text{C}$  con agitación constante de 100rpm durante 24 horas. En la tabla 4, se hace una relación de los sustratos empleados en los medios de cultivo.

<sup>94</sup> RAYMOND E. KIRK. Enciclopedia de tecnología química, Editorial hispanoamericana. Mexico 1962. Tomo IX. p. 229-233.

<sup>95</sup> BOUCHEZ, P. y AZZI, D. Biotechnology: Use of hydrolytic enzymes in preprocessing of feedstuffs. In Nutritional Strategies and Aquaculture waste, C.B. Cowey and C.Y. Cho. 1991. p. 91-101.

<sup>96</sup> STOREY, Op. Cit., p. 123-214.

Tabla 4. Sustratos empleados como fuentes de carbono en el medio de cultivo

FUENTE	CANTIDAD g.L <sup>-1</sup>	SUSTRATOS EMPLEADOS				
CARBONO	10	SUERO DE LECHE	MELAZA	HIDROLIZADO DE PAPA H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	HIDROLIZADO DE PAPA H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3%	HIDROLIZADO DE PAPA H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%
NITRÓGENO	7,5	PEPTONA				
FOSFORO	0,5	FOSFATO ACIDO DE SODIO				

3.4.3.2 Selección de la fuente de nitrógeno: Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, de 6 tratamientos y 3 replicas por cada tratamiento, donde el erlenmeyer es considerado como unidad experimental. El medio de cultivo empleado tuvo la misma composición que el medio de cultivo de referencia descrito en el epígrafe 3.2, pero en este caso se varió la fuente de nitrógeno por hidrolizados de harina de quinua e hidrolizados de harina de haba, a una concentración de 7,5 g.L<sup>-1</sup>. Los medios de cultivo fueron incubados a 30<sup>0</sup>C con agitación constante de 100rpm durante 24 horas. En la tabla 5, se hace una relación de los sustratos empleados en los medios de cultivo.

Tabla 5. Sustratos empleados como fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo

FUENTE	CANTIDAD g.L <sup>-1</sup>	SUSTRATOS EMPLEADOS					
NITRÓGENO	7,5	Hidrolizado de Quinua HCl 3N	Hidrolizado de Quinua HCl 5N	Hidrolizado de Quinua HCl 7N	Hidrolizado de Haba HCl 3N	Hidrolizado de Haba HCl 5N	Hidrolizado de Haba HCl 7N
CARBONO	10	SACAROSA					
FOSFORO	0,5	FOSFATO ACIDO DE SODIO					

La extracción y cuantificación por GC de polímero se la realizó mediante el método de Saruul, estandarizado por Fernandez.

### 3.5 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A PARTIR DE LOS SUSTRATOS SELECCIONADOS.

Para encontrar las concentraciones óptimas de las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas, se hizo una fase exploratoria donde se utilizó un diseño factorial exploratorio 2<sup>3</sup> con tres factores y dos niveles por factor. Entre los factores se destacan, hidrolizado de papa tratado con ácido sulfúrico al 1%, hidrolizado de quinua tratado con ácido clorhídrico 3N y fosfato ácido de sodio (Carlo Erba). Además, para cada factor se incluyó un nivel central en el cual las concentraciones de los factores se ubican en un zona intermedia a puntos extremos (+1, -1) según lo indica la tabla 6. Los tamaños de paso utilizados fueron de 3g para hidrolizado de papa, 3g para hidrolizado de quinua y 0,2 g para fosfato ácido de sodio. Cada tratamiento fue realizado por triplicado, el pH fue ajustado a 6,5 con NaOH saturado. En la tabla 7 se presenta la matriz codificada del diseño experimental factorial, en la cual se ubican los diferentes experimentos y como variable de respuesta la producción de PHA en mg.L<sup>-1</sup>.

Tabla 6. Concentraciones de sustancias empleadas en el medio de cultivo de acuerdo con los niveles de paso.

VARIABLE	Tamaño de Paso	NIVEL		
		0	1	-1
Hidrolizado de papa tratado con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	3g/L	10g/L	13g/L	7g/L
Hidrolizado de quinua tratado con HCl 3N	3g/L	7,5g/L	10,5g/L	4,5g/L
Fosfato ácido de sodio	0,2g/L	0,5g/L	0,7g/L	0,3g/L

Los medios de cultivo se prepararon tal como se indica en el epígrafe 3.2, utilizando las concentraciones establecidas en la matriz codificada del diseño factorial tabla 7, los medios de cultivo se incubaron a 30<sup>0</sup>C con agitación constante de 100rpm durante 24 horas. La extracción y cuantificación de PHA se realizó por el método estandarizado por Saruul.

Tabla 7. Matriz codificada. Diseño factorial.

<i>Factores a Evaluar</i>				<i>Variable de respuesta</i>
	<i>Harina de quinua hidrolizada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%</i>	<i>Harina de papa hidrolizada con HCl 3N</i>	<i>Fosfato ácido de sodio</i>	<i>PHA mg.L<sup>-1</sup></i>
1	-1	-1	-1	
2	1	-1	-1	
3	-1	1	-1	
4	1	1	-1	
5	-1	-1	1	
6	1	-1	1	
7	-1	1	1	
8	1	1	1	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	0	0	0	
12	0	0	0	
13	0	0	0	

Una vez realizada la fase exploratoria se planteó una segunda fase utilizando un diseño de máxima pendiente con el fin de encontrar la región óptima de producción. Para esto se tuvo en cuenta la ecuación de la forma  $Y = A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_4 + \dots + A_nX_n$  a partir de la cual se encontraron las concentraciones de los sustratos que se utilizaron en este experimento como se indica en la tabla 8.

Tabla 8. Cantidad de sustratos utilizados en el diseño de máxima pendiente.

Experimento	Hidrolizado de quinua g.L <sup>-1</sup>	Hidrolizado de papa g.L <sup>-1</sup>	Fosfato acido de sodio g.L <sup>-1</sup>
0	10	9,9338	0,3
1	10,1933	12,0744	0,1067
2	10,316	14,9485	-0,4082
3	13,3802	19,0308	-1,1211
4	10,4037	24,5147	-1,9419
5	10,3995	31,4712	-2,822

#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

##### 4.1 SINTESIS DE PHA POR *Bacillus mycooides* M17-2 EN UN MEDIO DE CULTIVO DE REFERENCIA UTILIZANDO SUSTRATOS COMERCIALES.

En la primera fase de este experimento se aplicó un diseño factorial exploratorio  $2^3$ , con tres replicas por cada tratamiento, para encontrar las concentraciones de sustratos más influyentes en la producción de PHA. Los metilésteres constituyentes del copolímero se cuantificaron por cromatografía de gases obteniendo los resultados presentados en la tabla 9. El cromatograma del P(3-HB-co-3-HV) utilizado como patrón de referencia y el cromatograma más representativo del diseño experimental se encuentra en el Anexo C.

Tabla 9. Matriz codificada del diseño factorial  $2^3$  utilizado para la producción de polímero con la cepa *Bacillus mycooides* M17-2. La variable de respuesta es la concentración de PHA en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Factores Evaluados				Concentración en $\text{mg.L}^{-1}$ de PHA
Muestra	Peptona	Sacarosa	Fosfato	
1	-1	-1	-1	$1,96 \pm 0,05$
2	1	-1	-1	$63,04 \pm 0,06$
3	-1	1	-1	$14,47 \pm 0,06$
4	1	1	-1	$35,47 \pm 0,05$
5	-1	-1	1	$8,57 \pm 0,05$
6	1	-1	1	$45,36 \pm 0,06$
7	-1	1	1	$30,88 \pm 0,04$
8	1	1	1	$4,3 \pm 0,05$
9	0	0	0	$4,73 \pm 0,04$
10	0	0	0	$17,94 \pm 0,05$
11	0	0	0	$8,99 \pm 0,05$
12	0	0	0	$8,71 \pm 0,04$
13	0	0	0	$16,17 \pm 0,05$

Con base en los valores obtenidos en el diseño factorial, se obtuvo una ecuación polinomial (ecuación 2) que representa la relación entre la variable dependiente: PHA y las variables independientes: peptona, sacarosa y fosfato ácido de sodio.

$$\text{PHA} = 19,74 + 11,04 \cdot \text{PEPTONA} - 3,60 \cdot \text{SACAROSA} - 2,98 \cdot \text{FOSFORO}$$

(Ecuación 2)

Con los datos obtenidos a partir del diseño experimental, se realizó un análisis de varianza simple, con el fin de determinar diferencias en los tratamientos. El análisis determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de confianza del 95% (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de la Varianza para PHA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A: PEPTONA	975,185	1	975,185	7,25	0,0359
B: SACAROSA	104,213	1	104,213	0,77	0,4126
C: FOSFORO	71,3654	1	71,3654	0,53	0,4938
AB	1198,69	1	1198,69	8,91	0,0245
AC	649,909	1	649,909	4,83	0,0703
BC	4,0698	1	4,0698	0,03	0,8676
Error Total	807,131	6	134,522		
Total (corr.)	3810,56	12			

El análisis de varianza muestra 2 efectos con  $p \leq 0,05$ , con un 95% de nivel de confianza, así los efectos mas significativos son, un solo efecto principal, peptona y una interacción de primer orden peptona; sacarosa. Cabe destacar que estos efectos son opuestos tal como se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Efectos estimados para PHA

Promedio	=	19,7442 +/- 3,21681
A: PEPTONA	=	22,0815 +/- 8,20128
B: SACAROSA	=	-7,2185 +/- 8,20128
C: FOSFORO	=	-5,9735 +/- 8,20128
AB: PEPTONA - SACAROSA	=	-24,4815 +/- 8,20128
AC: PEPTONA - FOSFORO	=	-18,0265 +/- 8,20128
BC: SACAROSA - FOSFORO	=	-1,4265 +/- 8,20128

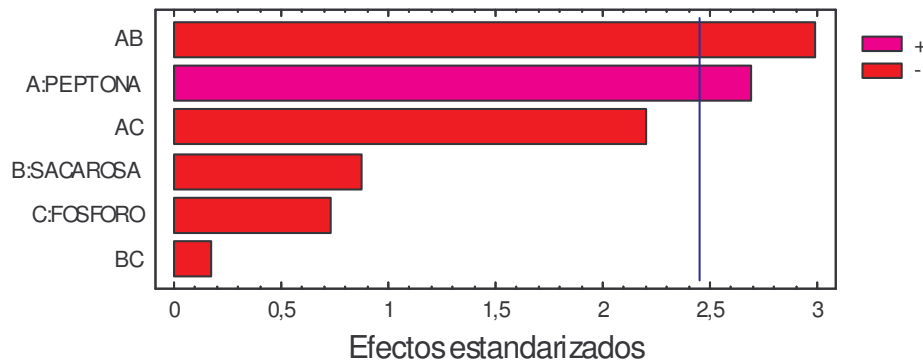
De acuerdo a la grafica 18 se establece que cuando *B. mycooides* crece en un medio que contiene peptona se incrementa la síntesis de PHA. Este efecto se produce debido a que este sustrato promueve el crecimiento microbiano y en *B. mycooides* M17-2 la síntesis del polímero se encuentra asociada al crecimiento, por lo tanto a mayor producción de biomasa, mayor producción de PHA<sup>97</sup>. Sin embargo se produce un efecto negativo en la síntesis de PHA en la interacción sacarosa - peptona. Es decir, altas concentraciones de sacarosa y peptona inhiben la producción de PHA. Esto se da posiblemente por que las altas concentraciones de sacarosa afectan en forma negativa la velocidad de transporte del nutriente a través de la membrana. Cabe señalar que el transporte de nutrientes se realiza por moléculas acarreadoras asociadas a la membrana celular, estas moléculas trabajan bajo el modelo de las enzimas Michaelianas<sup>98</sup>. Es decir que a concentraciones altas de sustratos disminuye la velocidad de transporte y por tanto se produce baja concentración de fuente de carbono a nivel intracelular, por lo tanto ya no hay flujo de carbono disponible para la síntesis de PHA<sup>99</sup>.

<sup>97</sup> LEE, S. and CHANG, H., High cell density cultivation of *Escherichia coli* Using sucrose as a carbon source. Biotechnol.1993.V.15. p. 971-974

<sup>98</sup> MADIGAN, M. and MARTINKO, Brock Biology of Microorganisms. Princeton Hall, New Jersey.1997. 10<sup>a</sup> edition, p. 70-72

<sup>99</sup> LEE, S. and CHANG, H. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. 1994.V.2.p.169-176

Figura 17. Gráfico de Pareto. Efectos de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de PHAs en *B. mycoides* M17-2.



En el experimento 2 se obtuvieron las mayores concentraciones de las unidades monoméricas del copolímero que corresponden a  $63,04 \text{ mg.L}^{-1}$ , los cuales se encuentran en una relación 95:5 de los monómeros 3HB y 3HV respectivamente. Este valor es significativamente superior a los reportados por Hidalgo y Zambrano (2005)<sup>100</sup>, quienes manifestaron que en un medio de cultivo enriquecido con glucosa como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno *Bacillus mycoides* M17-2 produce  $8,4 \text{ mg.L}^{-1}$  de copolímero, por otro lado los datos reportados en este trabajo se asemejan con los reportados por Horii (2002)<sup>101</sup> quien manifiesta que *Bacillus megaterium* 12 produce hasta  $54 \text{ mg.L}^{-1}$  de PHB en un medio suplementado con sacarosa y peptona.

Las concentraciones de los sustratos encontradas en el medio de cultivo estándar para la producción de PHA se utilizaron como criterio para comparar la síntesis de este polímero utilizando sustratos complejos producidos en la región de Nariño. Para establecer las concentraciones de los sustratos de la región en el medio de cultivo estándar, se realizó una cuantificación de azúcares totales en las fuentes de carbono y nitrógeno total en los sustratos a utilizar como fuentes de nitrógeno.

## 4.2 SELECCION DE SUSTRATOS

4.2.1 Selección de fuentes de carbono. En la región nariñense las variedades de papa mas cultivadas son la *Parda pastusa* y *Diacol capiro*, sin embargo para el desarrollo de este experimento la variedad utilizada es *Diacol capiro* debido a que el rango reportado bibliográficamente de almidón sobre peso seco se encuentra entre el 60 y 80%, sin embargo este porcentaje puede variar considerablemente debido a ciertos factores como: tipo de suelo, fertilización, tipo de riego y

<sup>100</sup> HIDALGO, H. y ZAMBRANO, J. Aislamiento de bacterias nativas productoras de polihidroxicanoatos PHA's presentes en suelos de la región andina del departamento de Nariño. Universidad de Nariño. 2005.

<sup>101</sup> HORII, K., KANEKO, M., TANJI, Y., XING, X., UNNU, H. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. Appl. Microbiol And Biotechnol. V. 59. p. 211-216. 2002

condiciones climáticas<sup>102</sup>. El porcentaje de humedad de las muestras recolectadas es del 79,5% y su peso seco del 20,5%, estos valores son de gran importancia, puesto que en este experimento se trabaja sobre la muestra seca. Luego de haber hidrolizado cada una de las muestras, se determinó la cantidad de azúcares totales de los sustratos analizados los cuales se aprecian en la tabla 12.

Tabla 12. Azúcares totales de los sustratos empleados como sustituyentes de la fuente de carbono.

Muestra	Azúcares totales g/100g de muestra según método de Antrona				
	Hidrolizado de papa con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	Hidrolizado de papa con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3%	Hidrolizado de papa con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	Suero de Leche	Melaza
Media	47,92	38,32	32,15	5,43	44,15
δ	0,045	0,055	0,05	0,060	0,05

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede establecer que existe una relación inversa entre la concentración de azúcares liberados a partir de harina de papa tratada con ácido sulfúrico concentrado y entre harina de papa hidrolizada con ácido sulfúrico de concentración baja. Esto se debe a que cuando se hidroliza la molécula de almidón se forma como producto intermedio glucosa mas almidón no hidrolizado, posteriormente las moléculas excedentes de ácido sulfúrico hidrolizan las moléculas de glucosa destruyéndolas completamente hasta formar un residuo carbonado<sup>103</sup>. Es importante tener en cuenta que a menor concentración del ácido se utiliza menor cantidad de neutralizante, siendo económicamente muy benéfico para el proceso. En cuanto a la eficiencia de producción de azúcares fermentables trabajando con un ácido al 1% se obtuvo un rendimiento del 47,92%, con el ácido al 3% se obtuvo un rendimiento del 38,32% y con el ácido al 5% el rendimiento fue del 32,15%.

Luego de analizar estadísticamente los azúcares totales tal como se indica en la tabla 14, se encontró que existen diferencias significativas en los tratamientos con un nivel de confianza del 95%. El hidrolizado de papa tratado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%, es el tratamiento que mayor cantidad de azúcares totales presenta. Sin embargo la siguiente etapa del experimento se realizó con todos los sustratos para comparar si existen diferencias significativas en cuanto a la producción de PHA, al suplementar los medios de cultivo con cada uno de ellos.

Tabla13. Análisis de Varianza para Azucares Totales en las Fuentes de Carbono

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3403,65	4	850,911	309047,74	0,0000
Intra grupos	0,0275333	10	0,00275333		
Total (Corr.)	3403,67	14			

<sup>102</sup> MORENO, D. calidad de la papa para usos industriales. Santa Fe de Bogotá CORPOICA, 2001. p. 1

<sup>103</sup> ALEMANY, Lamana. y FONT, Sebarroja. Prácticas de bioquímica. España: Alambra 1983. p.32-212

Para establecer las concentraciones de hidrolizados de papa, suero de leche y melaza en cada medio de cultivo, se utilizó como referente la concentración de sacarosa encontrada en el medio de cultivo estándar descrito en el epígrafe 3.2. Para ello, se utilizó en el medio de cultivo 7.5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de Fosfato ácido de Sodio y 10 g.L<sup>-1</sup> de fuente de carbono que varió para cada diseño: hidrolizados de papa, melaza y suero de leche.

La producción de PHA en mg.L<sup>-1</sup> se aprecia en la tabla 15. En el análisis de varianza se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ya que el p-valor es inferior a 0,05, con el 95% de nivel de confianza.

Tabla 14. Variación de la fuente de carbono para la producción de PHA

Muestra	Obtención de PHA en mg.L <sup>-1</sup> con Variación de Fuentes de Carbono					
	Hidrolizado de Papa con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	Hidrolizado de Papa con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3%	Hidrolizado de Papa con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	Suero de leche	Melaza	Sacarosa
Media	57,51	45,46	18,82	0,34	2,11	61,72
δ	0,73	0,79	0,94	0,013	0,38	0,49

Posteriormente se analizaron estadísticamente los datos con el fin de comprobar cuales de los sustratos en estudio sobresalen dentro del parámetro establecido. Para ello se aplicó la prueba Duncan de comparación de medias con un nivel de confianza del 95%. Los resultados se indican en la tabla 16.

Tabla 15. Prueba de rango múltiple de Duncan del nivel de producción de PHA con diferentes sustratos.

Método: 95% LSD			Homogeneidad en los sustratos en la producción de PHA
Sustrato	Replica	Media	
Suero de leche	3	0,344037	X
Melaza	3	2,11749	X
Papa H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	3	18,8215	X
Papa H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3%	3	45,4681	X
Papa H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	3	57,511	X

Este análisis permite comparar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Los resultados indican que la mejor fuente de carbono para reemplazar la sacarosa utilizada en el medio estándar es la harina de papa hidrolizada con ácido sulfúrico al 1%.

Sin embargo de acuerdo con los resultados descritos en la tabla 15 se puede observar que la producción de PHA en todos los tratamientos es menor en relación con el medio estándar, es decir la bacteria *Bacillus mycoides* M17-2, produce más polímero en el medio estándar debido a que este medio se encuentra enriquecido con sacarosa como fuente de carbono y la sacarosa es un

dímero fácil de degradar por este microorganismo.<sup>104</sup> Por otro lado cuando se suplemento el medio de cultivo con hidrolizado de papa tratado con ácido sulfúrico al 1% se obtuvo mayor producción de PHA que con otras fuentes. Esto se debe probablemente a que el hidrolizado de papa contiene glucosa libre fácilmente catabolizado por la bacteria. Por esta razón, el exceso de carbono es utilizado en la síntesis de PHA.

En los tratamientos donde se hidrolizó la harina de papa con ácido sulfúrico 3% y 5% además de la D-glucosa, posiblemente se formaron los dímeros  $\alpha$ -1,4- (maltosa) o  $\alpha$ -1,6- (isomaltosa), debido al rompimiento catalítico de las unidades de anhidroglucopiranosas, siendo estos dímeros de difícil absorción para la bacteria<sup>105</sup>. En la melaza comercial la producción de PHA fue menor comparada con el medio estándar. Este resultado se debe a que la melaza comercial es suplementada con urea al 5%, por tanto el medio de cultivo no presenta desbalance en la relación carbono: nitrógeno. Cabe señalar que la síntesis de PHA se produce cuando esta relación es superior a 10:1.

De igual manera uno de los factores que puede haber influido en la síntesis de PHA cuando el medio de cultivo se suplementó con suero de leche son los acarreadores de membrana selectivos (Figura 18). A diferencia del transporte por difusión simple, el transporte mediado por acarreadores muestra un efecto de saturación. Otra de las características importantes de este tipo de transporte es la naturaleza altamente específica de este proceso. Además la célula regula la síntesis de proteínas de transporte de tal modo que el equipamiento específico de transportadores presentes en la membrana está en función de los nutrientes que están en el medio y de su concentración. En nuestro caso el nutriente fue lactosa y la concentración fue de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Debido a que la intención de esta investigación no fue evaluar la concentración óptima de lactosa se desconoce si la cantidad suministrada de este nutriente fue la adecuada para el nivel de proteínas acarreadoras de membrana<sup>106</sup>.

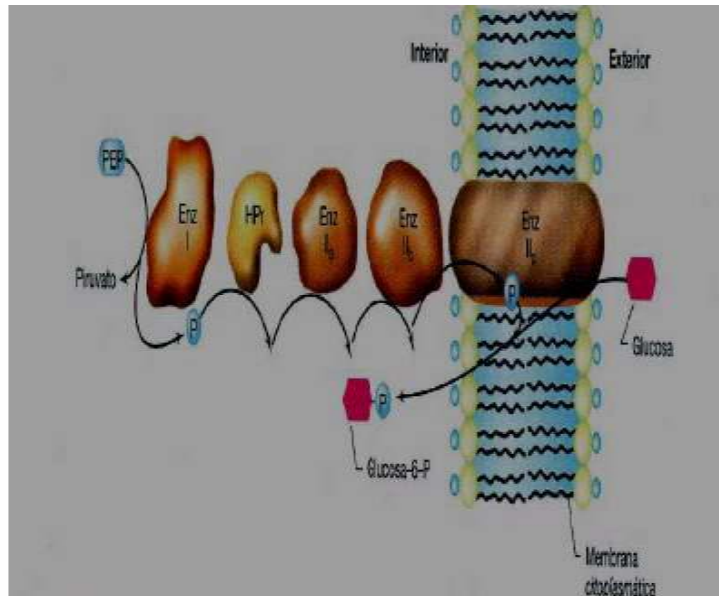
---

<sup>104</sup> NUR, Z. ASLIM, B. BEYATH, Y. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12.

<sup>105</sup> NELSON, J. Rapid determination of starch: An index to maturity in starchy vegetables. En: Journal of industrial and engineering chemistry. 1963. Vol. 15. No.3

<sup>106</sup> MADIGAN, M. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Prentice Hall.p. 70-73

Figura 18. Mecanismo de acción del sistema fosfotransferasa, para el transporte de glucosa. La transferencia secuencial de fosfato tiene lugar desde el fosfoenolpiruvato hasta la enzima IIc, que es automáticamente la responsable del transporte del azúcar.



4.2.2 Selección de fuentes de nitrógeno: El haba y la Quinoa son productos agrícolas cultivados en la región nariñense. Sin embargo por el escaso desarrollo tecnológico e investigativo de la región su único fin es la comercialización sin ningún tipo de transformación. En el caso del uso biotecnológico de estos nutrientes sirvió como fuente de nitrógeno en el crecimiento bacteriano, pero fue necesario transformar las proteínas hasta aminoácidos libres mediante una hidrólisis ácida.

A las muestras de haba y quinoa se les determinó el porcentaje de humedad y peso seco, ya que la hidrólisis ácida se la realizó sobre muestra seca. En el caso del haba se encontró un porcentaje de humedad del 71.7% con un peso seco del 28.3%. El porcentaje de humedad de la quinoa fue del 15% siendo su peso seco del 85%. Una vez terminada la hidrólisis se cuantificó por el método Kjeldahl la proteína inicial y la proteína hidrolizada de haba y quinoa a partir de 100g de muestra. En la tabla 17 se observa que todos los hidrolizados presentan menor concentración de nitrógeno, en comparación con la muestra sin hidrolizar. Este resultado se debe a la degradación de ciertos aminoácidos como el triptófano y desprendimiento de  $\text{NH}_3$  de los grupos R de la glutamina y asparagina durante la hidrólisis ácida<sup>107</sup>.

<sup>107</sup> LEHNINGER, A. Bioquímica. Editorial pueblo y educación, Ciudad de la habana. 1982. p. 73-96

Tabla 16. Proteína de los sustratos empleados como sustituyentes de la fuente de nitrógeno.

Muestras	g de proteína Harina de Haba / 100 g de muestra				g de proteína Harina de Quinoa / 100g de muestra			
	Proteína sin hidrolizar	Hidrolizado con HCl 3N	Hidrolizado con HCl 5N	Hidrolizado con HCl 7N	Proteína sin hidrolizar	Hidrolizado con HCl 3N	Hidrolizado con HCl 5N	Hidrolizado con HCl 7N
Media	8,59	6,25	4,86	3,5	11,40	8,67	7,55	6,52
$\bar{\sigma}$	0,025	0,06	0,052	0,01	0,045092	0,03	0,04583	0,055

Luego de analizar estadísticamente la cantidad de nitrógeno total de los hidrolizados tal como se indica en la tabla 18, se encontró que existen diferencias significativas en los tratamientos puesto que el p-valor es inferior a 0,05 con un nivel de confianza del 95%. El hidrolizado de quinua tratado con ácido clorhídrico de concentración 3N presentó la mayor cantidad de nitrógeno total cuantificado por Kjeldahl. Sin embargo, todos los hidrolizados fueron utilizados para suplementar los medios de cultivo como fuente de nitrógeno.

Tabla 17. Análisis de varianza para nitrógeno total en hidrolizados de Haba y Quinoa

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	51,3364	5	10,2673	4800,28	0,0000
Intra grupos	0,0256667	12	0,00213889		
Total (Corr.)	51,362	17			

Debido a la descomposición de ciertos aminoácidos durante la hidrólisis, se forman sustancias negras o pardas que reciben el nombre de huminas. La cantidad de humina formada también depende de la preparación proteínica de la muestra, si ésta se encuentra con alta concentración de sustancias hidrocarbonadas la cantidad de nitrógeno en forma de humina es grande y por tanto el aporte de este nutriente al desarrollo microbiano es deficiente.

Para establecer las concentraciones de los hidrolizados de haba y quinua en los medios de cultivo se utilizó como referente la concentración de peptona utilizada en el medio de cultivo estándar para lo cual se usó  $7.5 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrógeno con los hidrolizados de haba y quinua. Los  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa se conservaron al igual que los  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  de fosfato ácido de sodio.

La producción de PHA en  $\text{mg.L}^{-1}$  se observa en la tabla 19, el análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas en los tratamientos con un 95% de confiabilidad.

Tabla 18. Variación de la fuente de nitrógeno para la producción de PHA

Muestra	Obtención de PHA en mg.L <sup>-1</sup> con Variación de Fuentes de Nitrógeno						
	Hidrolizado de Quinua HCl 3N	Hidrolizado de Quinua HCl 5N	Hidrolizado de Quinua HCl 7N	Hidrolizado de Haba HCl 3N	Hidrolizado de Haba HCl 5N	Hidrolizado de Haba HCl 7N	Testigo
Media	236,55	135,54	38,14	115,45	51,55	54,41	51,83
Σ	0,28	0,22	0,24	0,16	0,23	0,18	0,24

Posteriormente se analizaron estadísticamente los datos con el fin de comprobar cuales de los sustratos en estudio sobresalen dentro del parámetro establecido. Se aplicó la prueba de Duncan con un nivel de confianza del 95%. Los resultados se indican en la tabla 20.

Tabla 19. Prueba de rango múltiple de Duncan que permite inferir el mayor nivel de producción de PHA con diferentes sustratos.

Método: 95% LSD				Homogeneidad en los sustratos para la producción de PHA
Sustrato	Replica	Media		
Quinua HCl 7N	3	38,59		X
Haba HCl 5N	3	50,89		X
Haba HCl 7N	3	57,73		X
Haba HCl 3N	3	109,57		X
Quinua HCl 5N	3	137,87		X
Quinua HCl 3N	3	238,04		X

Este análisis aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Los resultados indican que la mejor fuente de nitrógeno para remplazar la peptona utilizada en el medio estándar es la harina de quinua hidrolizada con ácido clorhídrico de concentración 3N.

En la tabla 19, se observa que la cantidad de polímero en cada uno de los tratamientos es significativamente diferente, sin embargo con los hidrolizados de quinua tratados con diferentes concentraciones de HCl (3N y 5N) la producción de polímero es mayor que con los hidrolizados de haba. Este resultado puede ser ocasionado por la diferencia en composición y cantidad de aminoácidos en el haba y la quinua.

Tabla 20. Composición aminoácídica de Haba y Quinoa<sup>108</sup>.

Contenido de aminoácidos en g por 100g de proteína		
Aminoácido	Haba	Quinoa
Fenilalanina (Phe)	4,30	3,85
Metionina (Met)	0,70	1,98
Leucina (Leu)	7,10	6,50
Isoleucina (Ile)	4,00	6,91
Valina (Val)	4,40	3,05
Lisina (Lys)	6,50	6,91
Treonina (Thr)	3,40	4,50
Tirosina (Tyr)	3,20	0,00
Cisteína (Cys)	0,80	0,00
Triptófano (Trp)	0,00	1,28
Arginina (Arg)	0,00	7,11
Histidina (His)	0,00	2,85

Como se puede observar en la tabla 21, la cantidad de aminoácidos cetogénicos y glucogénicos del haba y la quinua varía, es decir que la quinua tiene mayor cantidad de aminoácidos a mayores concentraciones y puede ser la razón para que la cantidad de PHA aumente al suplementar el medio de cultivo con hidrolizado de quinua. Además los aminoácidos se pueden transportar por medio de un sistema compuesto por varias proteínas acarreadoras de membranas desde el exterior hasta el interior de la célula<sup>109</sup>.

Los aminoácidos cetogénicos se degradan hasta acetyl-CoA y por tanto son capaces de formar cuerpos cetónicos. Solo la leucina y la lisina son puramente cetogénicas. La Isoleucina, fenilalanina, triptófano y tirosina son cetogénicos y glucogénicos a la vez, es decir su catabolismo produce en parte acetyl-CoA y acetoacetyl-CoA y en parte precursores de glucosa. El catabolismo de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo converge a producir productos como: piruvato, acetyl-CoA, acetoacetyl-CoA,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y oxaloacetato. Estos productos dependiendo del estado energético de la célula, pueden oxidarse para generar energía, de esta manera el carbono presente en el medio de cultivo se degrada por medio de glucólisis hasta Acetyl-CoA. La cual, entra al ciclo de Krebs, pero también sigue la vía para la síntesis del copolímero P(3-HB-co-3-HV). De igual manera, ciertos aminoácidos como leucina, lisina y triptófano que producen acetoacetyl-CoA están contribuyendo directamente a la formación de polímero puesto que este compuesto es un intermediario en la síntesis de PHB. En el siguiente esquema se plantea la posible ruta metabólica que sigue *Bacillus mycoides M17-2*<sup>110,111</sup>.

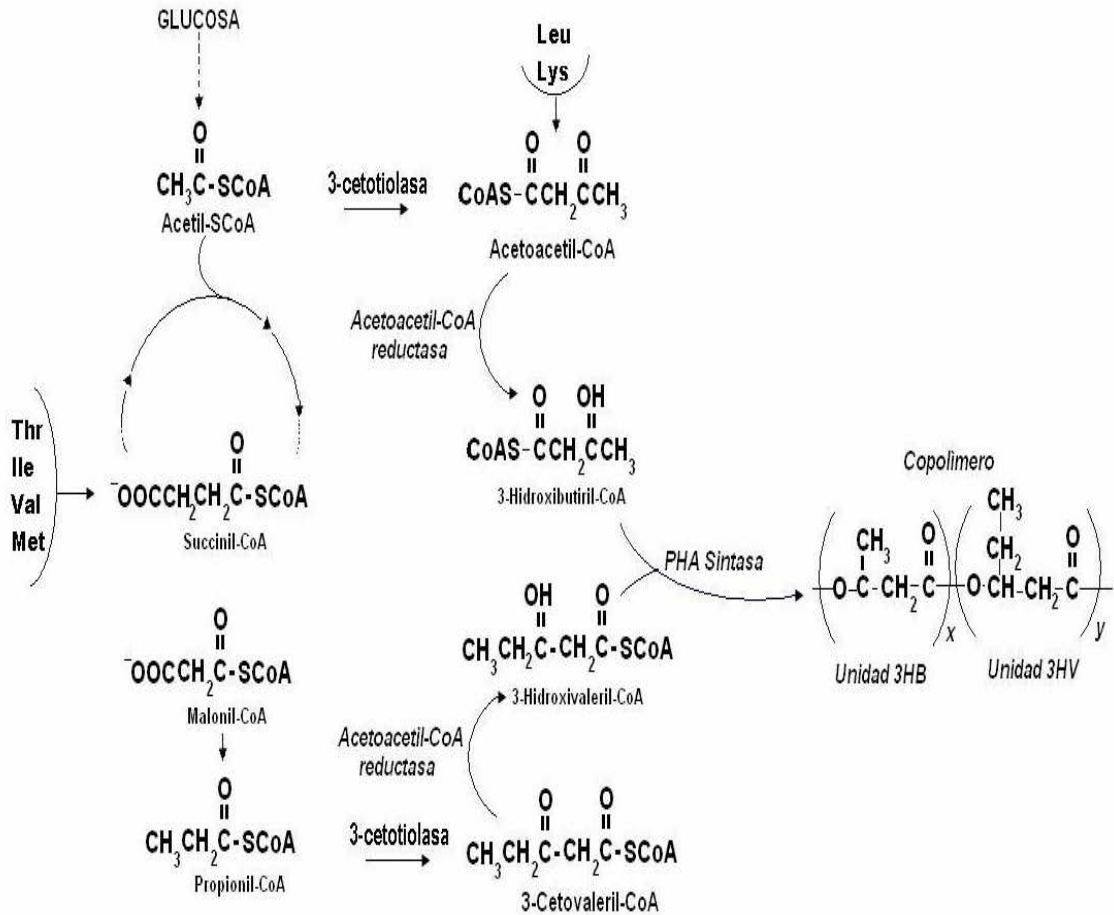
<sup>108</sup> <http://www.agrobolivia.gov.bo>

<sup>109</sup> MADIGAN, Op. Cit., p. 73

<sup>110</sup> BARBOSA, M. Producción de polímeros biodegradables usando *R. eutropha*. Tesis Ingeniería Química. Bogotá. Universidad nacional de Colombia. 2002

<sup>111</sup> BENYON, Sarah. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Harcourt brace. Madrid, España. 1998. p.19,91-95

Figura 19. Posible ruta metabólica para la síntesis del copolímero P(3-HB-co-3-HV) por *Bacillus mycoides* M1-2. Cuando la fuente de nitrógeno es hidrolizado de haba y quinua.



#### 4.3 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A PARTIR DE LOS SUSTRATOS SELECCIONADOS PARA EL CRECIMIENTO Y SÍNTESIS DE PHA POR *Bacillus mycoides* M17-2.

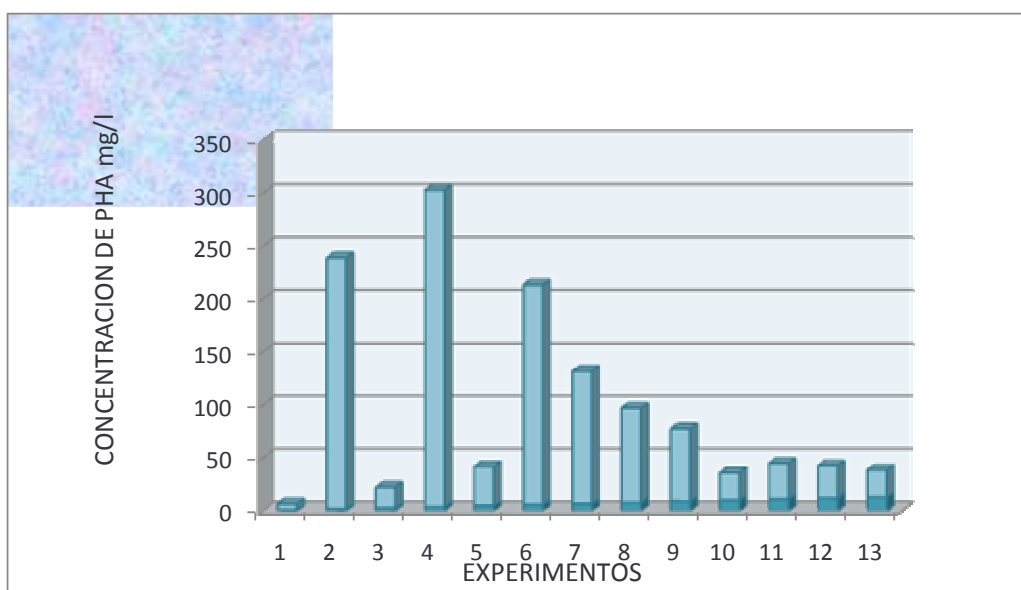
Para optimizar el medio de cultivo se seleccionó harina de papa hidrolizada con ácido sulfúrico al 1% y harina de quinua hidrolizada con ácido clorhídrico 3N. Utilizando estos sustratos, se aplicó un diseño factorial exploratorio 2<sup>3</sup> para encontrar las concentraciones más influyentes de cada sustrato que afectan la producción de PHA. En la tabla 21 se muestra la matriz codificada del diseño factorial con los resultados obtenidos.

Tabla 21. Matriz codificada del diseño factorial  $2^3$  utilizado para la producción de polímero con la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 donde la variable de respuesta es la concentración promedio  $\pm \delta$  de PHA en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

<i>Factores a Evaluar</i>			<i>Concentración <math>\text{mg.L}^{-1}</math> de polímero</i>
<i>HIDROLIZADO DE QUINUA</i>	<i>HIDROLIZADO DE PAPA</i>	<i>FOSFATO</i>	<i>PHA</i>
-1	-1	-1	5,58 $\pm$ 0,05
1	-1	-1	236,61 $\pm$ 0,06
-1	1	-1	19,5 $\pm$ 0,07
1	1	-1	298,8 $\pm$ 0,06
-1	-1	1	36,69 $\pm$ 0,03
1	-1	1	207,24 $\pm$ 0,05
-1	1	1	124,65 $\pm$ 0,06
1	1	1	89,02 $\pm$ 0,07
0	0	0	68,31 $\pm$ 0,03
0	0	0	25,96 $\pm$ 0,05
0	0	0	33,84 $\pm$ 0,06
0	0	0	30,66 $\pm$ 0,02
0	0	0	25,57 $\pm$ 0,06

La figura 22 representa por medio de un sistema de barras los 13 tratamientos del diseño factorial  $2^3$ . En esta gráfica se aprecia que la mayor respuesta de PHA en  $\text{mg.L}^{-1}$  se obtuvo en el tratamiento cuatro, compuesto por 13  $\text{g.L}^{-1}$  de hidrolizado de harina de papa, 10,5  $\text{g.L}^{-1}$  de hidrolizado de harina de quinua y 0,3  $\text{g.L}^{-1}$  de fosfato ácido de sodio.

Figura. 20. Influencia de las concentraciones de los sustratos en la producción de PHA



Con base en los valores obtenidos en el diseño factorial  $2^3$  para los 13 tratamientos, se obtuvo la ecuación 3. Que representa la relación entre la variable dependiente PHA y las variables independientes: hidrolizado de harina de papa, hidrolizado de harina de quinua y fosfato ácido de sodio.

$$\text{PHA mg/l} = 100,2 + 93,1 \cdot \text{Quinua} + 18,2 \cdot \text{Papa} - 0,36 \cdot \text{Fósforo}$$

(Ecuación 3)

Los resultados obtenidos en las mediciones cromatográficas para los metil ésteres 3HB y 3HV presentan una alta reproducibilidad y confiabilidad en la cuantificación del co-polímero, dado que los tiempos de retención de las muestras coincidían con los tiempos de retención del patrón de copolímero P(3HB-co-3HV). El análisis de varianza para el diseño factorial  $2^3$  se indica en la tabla 22.

Tabla 22. Análisis de la Varianza para PHA en el medio optimizado

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Quinua	69431,8	1	69431,8	11,31	0,01
B:Papa	2660,12	1	2660,12	0,43	0,53
C:Fosforo	1,06	1	1,06	0,00	0,98
AB	418,67	1	418,67	0,07	0,80
AC	9483,95	1	9483,95	1,54	0,26
BC	5,12	1	5,12	0,00	0,97
Error Total	36831,0	6	6138,5		
Total (corr.)	118832,0	12			

El análisis de varianza muestra un efecto con p-valor inferior a 0,05, con un 95% de nivel de confianza, así la variable con mejor respuesta fue quinua siendo el tratamiento que maximiza la respuesta de  $\text{mg.L}^{-1}$  de polímero. En la tabla 23 se indican los efectos que causan cada una de las variables independientes hidrolizado de quinua, hidrolizado de papa y fosfato ácido de sodio en la producción de PHA.

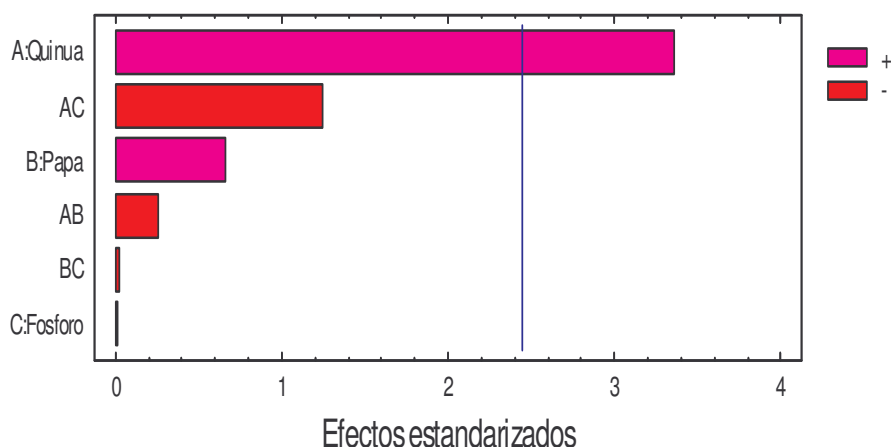
Tabla 23. Efectos estimados para la producción de PHA en el medio optimizado.

Promedio	= 100,20	+/- 21,73
A: Quinua	= 186,32	+/- 55,40
B: Papa	= 36,47	+/- 55,40
C: Fósforo	= -0,73	+/- 55,40
AB: Quinua - Papa	= -14,46	+/- 55,40
AC: Quinua - Fósforo	= -68,86	+/- 55,40
BC: Papa - Fósforo	= -1,6	+/- 55,40

Con los resultados, obtenidos se puede afirmar que en esta investigación, el hidrolizado de quinua utilizado como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo incrementa la síntesis de PHA (figura 23). Por otro lado, el hidrolizado de papa utilizado como fuente de carbono posee un efecto positivo, pero no incrementa la

síntesis de polímero como se percibe en el tratamiento cuatro. El incremento de la síntesis de PHA, se produce debido a que el desbalance carbono: nitrógeno se encuentra en la relación adecuada. Lo contrario ocurre con el fósforo ya que su influencia es negativa con respecto a la producción del polímero.

Figura 21. Gráfico de Pareto. Efectos de los sustratos en función de la síntesis de PHA en *B. mycooides* M17-2.



Debido a que los medios de cultivo se encuentran suplementados con hidrolizado de quinua e hidrolizado de papa como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente, este proceso puede ser explicado mediante la posible ruta metabólica planteada en la figura 21.

Los 298,8 mg.L<sup>-1</sup> de copolímero obtenidos en el tratamiento cuatro, son de gran importancia ya que se observa que la cantidad de PHA se incrementa en cada una de las fases de este experimento. Sin determinar las cantidades óptimas de los sustratos comerciales con los que se suplementaba el medio de cultivo, la bacteria produjo 8,142 mg.L<sup>-1</sup> de P(3HBco3HV) según lo reporta Hidalgo y Zambrano (2005)<sup>112</sup>. Cuando se encontró las cantidades óptimas de sustratos comerciales en la primera fase del experimento, la cantidad de los constituyentes del co-polímero fue de 63,04 mg.L<sup>-1</sup> de co-polímero y suplementando el medio de cultivo con sustratos de la región la cantidad de PHA se incrementó notablemente, esto se observa claramente en el diagrama de Pareto ( figura 23) donde cualquier incremento de quinua produce un aumento de PHA, entonces es probable incrementar la cantidad de copolímero al plantear un diseño de máxima pendiente utilizando la ecuación 4, que explica el comportamiento de la variable de respuesta frente a los sustratos.

$$\text{PHA mg/l} = 100,2 + 93,1 \cdot \text{Quinoa} + 18,2 \cdot \text{Papa} - 0,36 \cdot \text{Fósforo} - 7,23 \cdot \text{Quinoa} \cdot \text{Papa} - 34,43 \cdot \text{Quinoa} \cdot \text{Fósforo} - 0,8 \cdot \text{Papa} \cdot \text{Fósforo}$$

(Ecuación 4)

<sup>112</sup> HIDALGO, H. y ZAMBRANO, J. Op., Cit. p. 111

El modelo matemático descrito en la ecuación 4 fue simplificado al remover el fósforo y las interacciones AB, AC, BC que no son estadísticamente significativas en la producción de PHA, obteniendo la ecuación 5.

$$\text{PHA mg/l} = 100,2 + 93,1 \cdot \text{Quinua} + 18,2 \cdot \text{Papa}$$

(Ecuación 5)

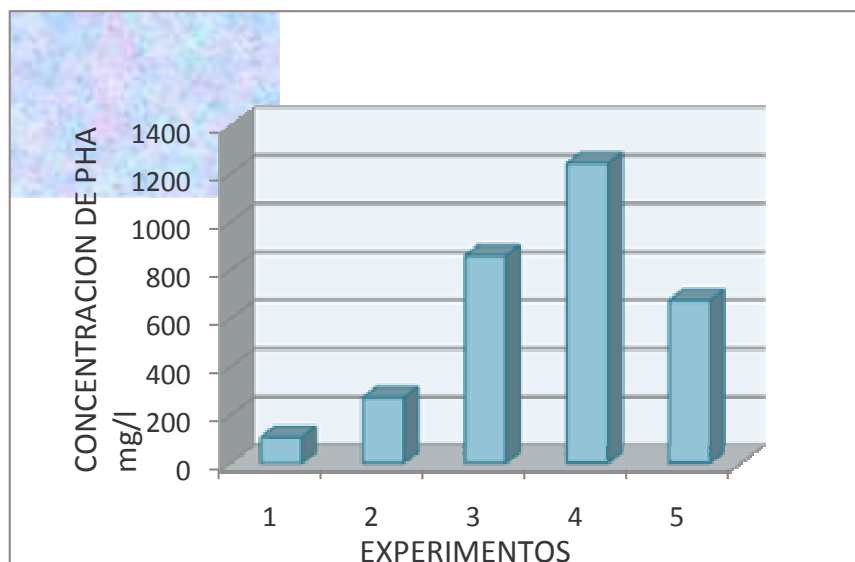
Los coeficientes positivos de la ecuación indican que a mayor cantidad de quinua, mayor cantidad de PHA, induciendo a una relación directa entre estas dos variables. Con base en esta ecuación por medio de aproximación a la máxima pendiente, se encontró la zona de respuesta óptima con 5 tratamientos y 3 replicas. En la tabla 24 se indican los resultados obtenidos.

Tabla. 24 cantidades de PHA en mg.L<sup>-1</sup> obtenidos en cada uno de los experimentos planteados en el diseño de máxima pendiente.

Diseño de máxima pendiente mg/l de PHA en cinco experimentos					
Experimento	1	2	3	4	5
Media	108,566667	271,17	858,413333	1240,17	671,513333
σ	0,43003876	0,978927985	0,5501212	0,73532306	0,81647617

La cantidad de PHA aumentó en cada uno de los tratamientos sin embargo, en el tratamiento 4, donde los sustratos se encuentran en una relación de 10:24 para Quinua y Papa, se obtuvo mayor cantidad de co-polímero, tal como se aprecia en la figura 24.

Figura 22. Zona de respuesta optima.



Con el fin de comprobar que sustratos en estudio sobresalen dentro del parámetro establecido se aplicó la prueba de comparación de medias (Prueba de Duncan) con un nivel de confianza del 95%.

Este análisis aplicó un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Los resultados indican que la mejor respuesta en cuanto a producción de polímero se dio en el experimento 4 que tiene una relación 10:24 de hidrolizado de quinua e hidrolizado de papa respectivamente, en este tratamiento la cantidad de polímero supera las cantidades de los otros experimentos en 76% de rendimiento, esto indica que la descompensación nutricional de los sustratos debe estar en una relación 2:1 para *B. mycooides* M17-2, ya que la fuente de carbono es aproximadamente el doble de la de nitrógeno. En estas circunstancias las células acumulan el copolímero como reserva energética para utilizarla en su etapa de esporulación.

En la tabla 25 se presenta la relación de la cantidad de PHA producido en el desarrollo de este trabajo desde la fase inicial hasta la fase final, al igual que otros datos reportados por otros autores que han trabajado con la misma cepa y con cepas similares. También se puede observar que el tratamiento con hidrolizado de papa y quinua supera los reportes de Nur y colaboradores en una cepa comercial de *Bacillus*. El hecho de que se haya obtenido un rendimiento superior al reportado en un aislamiento bacteriano silvestre, hace de esta investigación un gran aporte en la investigación de síntesis de PHA.

Tabla 25. Relación de producción de PHA mg/l con los sustratos empleados en el medio de cultivo.

Microorganismo	Sustratos Utilizados en la Producción de PHA			PHA mg.L <sup>-1</sup>
<i>Bacillus mycooides</i> M17-2	10 g.L <sup>-1</sup> Sacarosa	7,5 g.L <sup>-1</sup> peptona	0.5 g.L <sup>-1</sup> Na2HP04	63,05
<i>Bacillus mycooides</i> M17-2	13 g.L <sup>-1</sup> hidrolizado de Papa	10,5 g.L <sup>-1</sup> hidrolizado de Quinua	0.7 g.L <sup>-1</sup> de Na2HP04,	298,83
<i>Bacillus mycooides</i> M17-2	24,5147 g.L <sup>-1</sup> hidrolizado de Papa	10,4037 g.L <sup>-1</sup> hidrolizado de Quinua	Ausente	1240,17
<i>Bacillus mycooides</i> <sup>113</sup> M17-2	Glucosa 5 g.L <sup>-1</sup>	Peptona g.L <sup>-1</sup>	Extracto de Levadura 2,5g.L <sup>-1</sup>	8,142
<i>Bacillus megaterium</i> 112 <sup>114</sup>	Sacarosa	Peptona	L-cistina y L glicina	54

Una vez analizados todos los datos encontrados en el desarrollo de este trabajo el medio de cultivo recomendado para la producción industrial de PHA por *B.*

<sup>113</sup> HIDALGO, H. y ZAMBRANO, J. Op., Cit. p.111

<sup>114</sup> NUR, Z. ASLIM, B. BEYATH, Y. Op., cit. p.65

*mycoides* M17-2 es el suplementado con harina de papa hidrolizada con ácido sulfúrico al 1% que se encuentra en el medio de cultivo en una concentración de 24,5147 g.L<sup>-1</sup> y harina de quinua hidrolizada con ácido clorhídrico 3N que se encuentra en el medio de cultivo en una concentración de 10,4037 g.L<sup>-1</sup>.

## 5. CONCLUSIONES

Se determinó que las cantidades óptimas de los sustratos comerciales en el medio de cultivo de referencia son  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa,  $7,5 \text{ g.L}^{-1}$  de peptona y  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de fosfato ácido de sodio, bajo estas condiciones de concentración la cepa *Bacillus mycoides M17-2* produce  $63,05 \text{ mg.L}^{-1}$  de copolímero.

La mejor fuente de carbono evaluada en la cual *Bacillus mycoides M17-2*, produjo mayor cantidad de PHA fue harina de papa hidrolizada con ácido sulfúrico al 1% obteniéndose  $57,51 \text{ mg.L}^{-1}$  de copolímero.

La mejor fuente de nitrógeno evaluada en la cual *Bacillus mycoides M17-2*, produjo mayor cantidad de PHA fue harina de quinua hidrolizada con ácido clorhídrico 3N obteniéndose  $236,55 \text{ mg.L}^{-1}$  de copolímero.

En el medio de cultivo optimizado se obtuvo  $1240,17 \text{ mg.L}^{-1}$  de PHA, este valor tuvo un incremento del 95% con respecto al valor obtenido en el medio de cultivo de referencia donde se obtuvo  $63,05 \text{ mg/l}$  de copolímero.

## 6. RECOMENDACIONES

Optimizar las condiciones de crecimiento en este medio de cultivo como son, temperatura, pH, aireación y agitación para favorecer a gran escala la síntesis del polímero.

Evaluar la síntesis de PHA a escala de planta piloto

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ALBERTSSON and KARLSSON, S. Degradable Polymers for the Future. 1995. p. 113-125
- ALEMANY, Lamana. y FONT, Sebarroja. Prácticas de bioquímica. España: Alambra 1983. p.32-212
- ANDERSON, A. and DAWES, A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol.1990 .Rev. 54. p 450-472.
- AOAC, Official Methods of Analysis, 16 ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington. 1995.
- ASENJO, J. A. Effect of Single Nutrient limitation on Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Bioeng. 1995. V.5.p.497-502
- BARBOSA, M. Producción de polímeros biodegradables usando *R. eutropha*. Tesis Ingeniería Química. Bogotá. Universidad nacional de Colombia. 2002
- BASSET, D. Developments in Crystalline, Polymers-2. Elsevier Appl. Science Publishers, London.1988
- BELLO, Luis, Isolation and partial Characterization of banana starches. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999 Vol.47.p. 854-856.
- BENYON, Sarah. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Harcourt brace. Madrid, España. 1998. p.19,91-95
- BIEHLER, M. A first practical use of specially constructed starter cultures in a new biotechnological nitrate elimination process for drinking water with degradable biopolymers as adhesion material; En DECHEMA Biotechnology Conferences. 1998. 3(B). p.997-1002 (Biehler, 1989; Storey, 1991; Nothenberg, 1995; Biedermann et. al., 1997).
- BOHÓRQUEZ A. Camilo. Biología Aplicada, McGRAW-HILL, Colombia 1994. p. 134
- BOUCHEZ, P. y AZZI, D. Biotechnology: Use of hydrolytic enzymes in preprocessing of feedstuffs. In Nutritional Strategies and Aquaculture waste, C.B. Cowey and C.Y. Cho. 1991. p. 91-101.

- BOURQUE, D. and POMERLEAU, D. High-cell-density production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. Appl. Microbiol. Biotechnol.1995. V. 44.p. 367-376.
- BOX, G., HUNTER, W. G., HUNTER, S., J. (1988). Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, Análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona. Editorial Reverté. p. 675.
- BYROM, D. Polymers synthesis by microorganisms; technology and economics; Trends. Biotechnol.1990. V.5. p. 246-250
- CHISTI, Y. and MOO-YOUNG, M. Bioprocess intensification through bioreactor engineering. Trans Inst Chem. Eng. 1996.
- CHISTI, Y. Fermentation. Basic considerations .In: Robinson R, Batt C,Patel P, editors. Encyclopedia of food microbiology. London academic Press.1999.
- CLESCERI, L., GREENBERG, A., TRUSELL, R. Metodos Normalizados, Edición Díaz de Santos, S.A. 1992. p. 4-163.
- CROMATOGRAFIA DE GASES. Education.Quantitation. Methods in GC. Alltech Associates.1998
- FERNANDEZ , P. Abundancia de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos de Suelos de la Región Andina del Departamento de Nariño y Caracterización de un Aislado Bacteriano FLB2 productor del Copolímero poli(3Hidroxybutirato-co-3Hidroxivalerato 95:5). Tesis Doctoral. Universidad de la Habana. Cuba. 2006.
- FRISTCHE, K., LENZ, R. and FULLER, C. Bacterial polyester containing branched poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates).1990. V. 12. p. 92-101
- FUKUI, T. and DOI. Y. Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutirate-co-3-Hydroxyhexanoate) Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*; J. Bacteriol. 1997. V. 15. p. 4821-4830
- FUKUI, T. y DOI, Y. Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutirate-co-3-Hydroxyhexanoate) Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*. J. Bacterial. 1997. p. 4821-4830
- GABBERT, K. STEINBÜCHEL, A. and SCHUBERT. P. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly(b-hydroxybutyric acid)-synthetic pathway in *Pseudomonas* sp.Arch. Microbiol.1998. p.101–104.
- GEMGROSS, O. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules *in vitro*. USA. 2000. p. 92.

GERNGROSS and MARTIN. Enzyme-catalyzed synthesis of poly [ $\beta$ -(-)-3-hydroxybutyrate]: Formation of macroscopic granules in vitro. *Usa*. 1985. V.92. p. 6279-6283

HENDERSON, R. and JONES, W. Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production for *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture; *Microbiology*, 1997. V.143. p. 2361-2371.

HIDALGO, H. y ZAMBRANO, J. Aislamiento de bacterias nativas productoras de polihidroxialcanoatos PHA's presentes en suelos de la región andina del departamento de Nariño. Universidad de Nariño. 2005.

HORI, K., KANEKO, M., TANJI, Y., XING, X., UNNU, H. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Appl. Microbiol And Biotechnol*. V. 59. p. 211-216. 2002

HUSMANN, W. Ingeniería Metabólica de poli(3 Hidroxialcanoatos). Proceso de Polimerización de PHB.1999.

HYAVARINER, A. And DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química, Hidrólisis con Ácidos en Almidones, España: Hispano Americana.1962. Tomo I. p. 153.

JAN, S. H MNR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass; *Enzyme Microb*. 1996. p.195-201

JAN, S. Quantitative  $^1\text{H}$ NMR spectroscopy analysis of the poly (3-hydroxyalkanoate) extracted from *Rhizobium meliloti* cells.1995. V. 92. p. 1793-1796

KARR, I., WATERS and EMERICH, D. Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-inclusions high-pressure liquid chromatography and U. V. Detection; *Appl. Environ. Microbiol*.1983. p. 1339-1344

KIM and NAW, Chang. Production of (3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. 1998. Vol.20 p.109-112.

KRANZ, R., GABBERT, M y MADIGAN, T. Positive Selection Systems for Discovery of Novel Polyester. Biosynthesis Genes Based on Fatty Acid Detoxification. (1997). V. 63. p. 3010-3013

KUNIKO, M. NAKAMURA, Y. And DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. En: *Polymer Commun*. 1988. Vol.29 p.174-176.

LAFFERTY, R, KORSATKO, B. and KORSATKO, W. Microbial Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid. 2001. Publishers. New York. p.135-176.

LAFFERTY, R. and KORSATKO, W. Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric Acid. In: *Biotechnology*. VCH Publishers. New York. USA.1998. p.135-176.

LAGEWEER, R. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*, effect of substrates on formation and composition of poly-R-3hydroxyalkanoates; *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V.54 p. 2924-2932.

LAÑEZ, Enrique. Curso de Microbiología general citoplasma inclusiones citoplasmáticas.1998. p.2-10

LAW, K. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge. 2001. p. 7-12

LEAF, T. *Sacharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate. *Microbiol.* 1996. V. 142. p. 1180-1196

LEE, Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *pseudomonas patida* under phosphorus limitation.1999.p.466-471

LEE, S. and CHANG, H. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. 1994.V.2.p.169-176

LEE, S. and CHANG, H., High cell density cultivation of *Escherichia coli* using sucrose as a carbon source. *Biotechnol.*1993.V.15. p. 971-974

LEE, S. and CHANG, N. Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies; *Can. J. Microbiol.*1995. p. 207-215

LEHNINGER, A. Bioquímica. Editorial pueblo y educación, Ciudad de la habana. 1982. p. 73-96

LENZ, R. y KIMB, W. Functionalized poly(3-hydroxyalkanoates) produced for bacteria; *Novel. Biodegradable. Microbial. Biopolymer.*1990. p. 23-25

LINDSAY, K. "Truly degradable resins are now truly commercial". *Modern Plastics.* 1992. p. 69-62-64

LINKO, S., VAHERI, H and SEPPAELEAE, J. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources. 1993. *Microbiol. Biotechnol.* V. 39. p. 11-15.

- LINKO, S., VAHERI, H. y SEPPAELEAE, J. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1993). V.39(1). p. 11-15.
- LOPEZ, N., PETTINARI, M. and MENDEZ, B. Detection of reserve polymer synthesis in natural bacterial populations. 1997. p.129-136
- MADIGAN, M. and MARTINKO, Brock Biology of Microorganisms. Princeton Hall, New Jersey. 1997. 10<sup>a</sup> edition, p. 70-72
- MADIGAN, M. and MARTINKO, T. *Brock Biology of Microorganisms*. Princeton Hall, New Jersey. 1997
- MADIGAN, M. Biología de los microorganismos. 10<sup>a</sup> edición. Prentice Hall. p. 70-73
- MAYER, F. Structural aspects of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules, en; Schlegel H. G.; A. Steinbüchel. Bacterial polyhydroxyalkanoates poly- $\beta$ -hydroxyalkanoic acid. 1992. p. 265-268
- MORENO, D. calidad de la papa para usos industriales. Santa Fe de Bogotá CORPOICA, 2001. p. 1
- NELSON, J. Rapad determination of starch: An index to maturity in starchy vegetables. En: *Journal of industrial and engineering chemistry*. 1963. Vol. 15. No.3
- NOTHENBERG, M. Bactéria produz resina biodegradavel de açúcar. *Plástico moderno*. 1997. p.28-37
- NUR, Z. and BELMA, A. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25. 2003
- NUR, Z. ASLIM, B. BEYATH, Y. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12.
- ODA, Y. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi. *J. Ferment. Bioeng.* 1995. V. 3. p. 265-269
- OSTLE, A. and HOLT, J. Nile blue A as a fluorescent strain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate; *Appl. Environ. Microbiol.* 1982. V. 44. p. 238-241
- PAGE, W. and TENOVE, J. Quantitation of poly-b- hydroxybutyrate by fluorescence of Bacteria and granules stained with Nile Bllue. 1996. p. 215-220
- PAGE, W. Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate- $\beta$ -hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestris*; *Appl. Microbiol. Biotecchnol.* 1997. p. 88-93

PHILLIP, R. Formation of Short Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol.3 No.1 p.208-213

RAYMOND E. KIRK. Enciclopedia de tecnología química, Editorial hispanoamericana. Mexico 1962. Tomo IX. p. 229-233.

RENNER, G. HAAGE, G. and BRAUNEGG, G. Production of Short-Side-Chain Polyhydroxyalkanoates by Various Bacteria from the rRNA Superfamily III. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V.46. p. 268-272.

ROCHE. Dig System and Dig Application Manual. Editado Roche. 2003.

ROSE, A. Microbiología Química. Introducción a la fisiología Microbiana. Segunda Edición española. ed. Alhambra, Madrid, España. 1997.

SAN ROMAN, J. y GUILLEN, P. Biomateriales poliméricos compuestos para aplicaciones quirúrgicas: material para cirugía ortopédica y remodelación ósea; Rev. de Plásticos Modernos. (1992) V.438. p. 674-688.

SARUUL, P., SRIENC, F. Production of a biodegradable plastic polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in transgenic alfalfa. Crop. Science. 2002. p. 919-927.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. En biomaterials. Novel materials from biological sources (ed. D. Byrom); Macmillan Publishers and Ltd. And ICI Biological Products Buissnes. 1991. p.125-213

STEINBÜCHEL, A. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalcanoic acid inclusions; Can. J. Microbiol. 1995. p. 94-105

STENINBUHEL, A. and PIEPER, U. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. p. 1-6.

STOREY. Synthesis and fabrication of completely absorbable composites for biomaterials; En biomaterials. New York. 1991. p. 123-214.

TAN, Z. Phylogenetic and Genetic Relationships of *Mesorhizobium thianshanense* and Related Rhizobia. 1997. p. 874-879.

TAVERNIER, P. Exopolysaccharide and Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* Strains. 1997. p. 21-26.

VALAPPIL, S and BOCCACINI, A. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. Springer Science+Business Media B.V. 2006. 91:1-17.

WEINER, R. Biopolymers from marine prokariotes; Tibtech.1997. V.15. p. 390-394.

WEINER, R. M. Biopolymers from marine prokariotes; Tibtech.1997.p. 390-394.

WIKIPEDIA, La enciclopedia libre.Disponible en internet  
□[http://es.wikipedia.org/wiki/Suero\\_de\\_leche](http://es.wikipedia.org/wiki/Suero_de_leche)

WIKIPEDIA, La enciclopedia libre.Disponible en internet  
□<http://es.wikipedia.org/wiki/Melaza>

YU, Jian and SI, Y. Dynamic Study and Modeling of the Formation of Polyhydroxyalkanoates Combined with Treatment of High Strength Wastewater. 2000. p. 3-4.

ZHANG, K., SHIRAKI y SATIO, T. Purification of an Extracelular D-(-)- 3-Hydroxybutyrate oligomer hidrolase from *Pseudomonas sp.*1997.

## 8. ANEXOS

Anexo A. Cuantificación del copolímero poli(3 hidroxibutirato-co-3-hidrovalerato).

A partir de las curvas de calibración y mediante regresión lineal se determinó la relación entre el área y la concentración. Los modelos matemáticos que permiten encontrar esta relación son los siguientes:

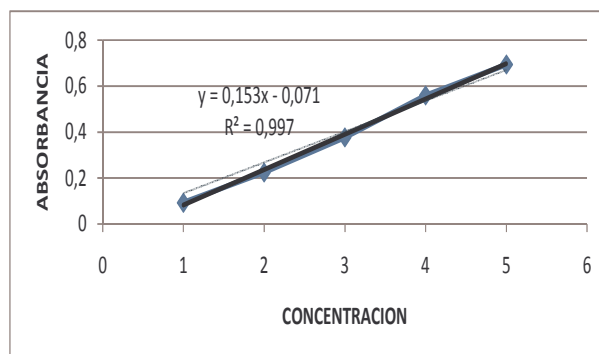
$$\text{Derivado metilado del ácido butírico } y = 6,0920.x - 37,26 \quad R^2 = 0,998$$

$$\text{Derivado metilado del ácido valérico } y = 6,090.x - 19,95 \quad R^2 = 0,997$$

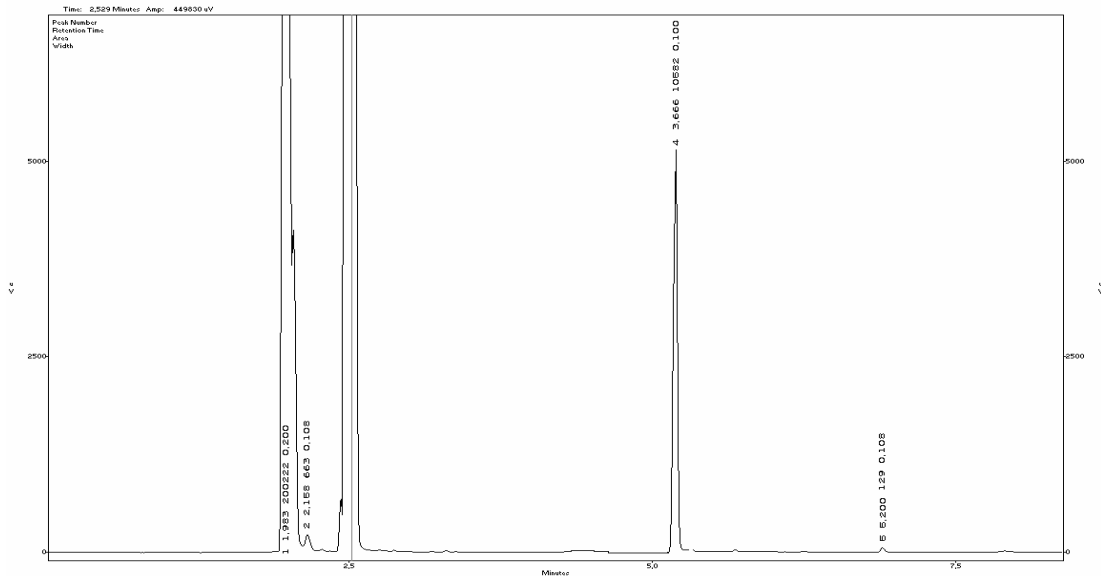
Se estima que el factor de respuesta (Rf), para la cuantificación de los metil ésteres 3HB y 3HV corresponde a 6,0920 y 6,090 respectivamente. Cabe anotar que las ecuaciones tienen un alto grado de confiabilidad debido a que su coeficiente de determinación es relativamente alto ( $R^2$ ).

Anexo B. Curva de calibración obtenida mediante el método de Antrona para la cuantificación de azúcares totales.

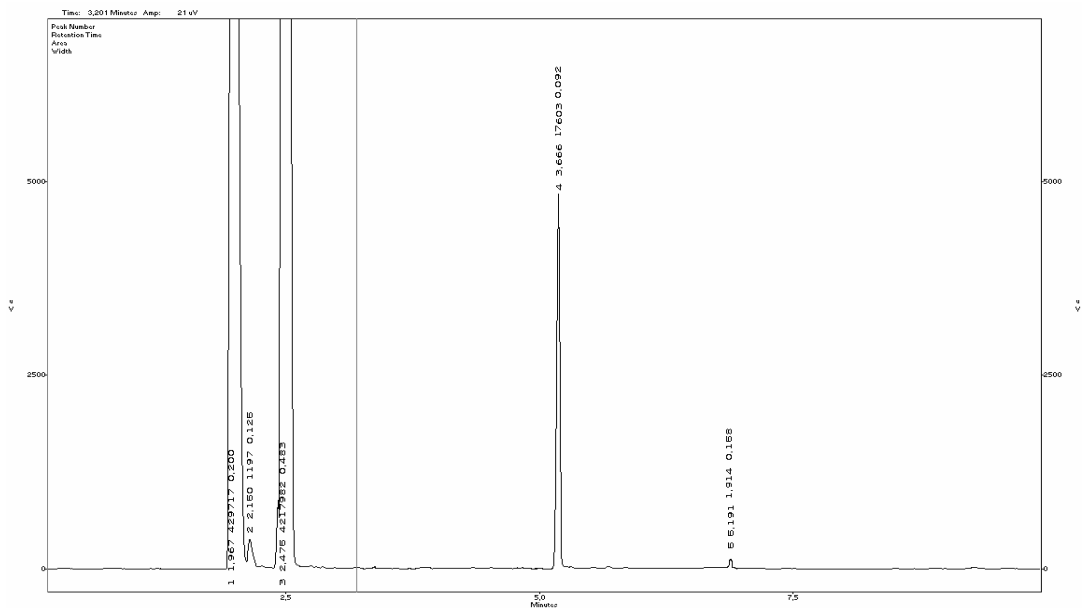
Concentración mg/l	Absorbancia
0.0002	0,09255
0,0004	0,22396
0,0008	0,37631
0,0012	0,55831
0,0016	0,69298



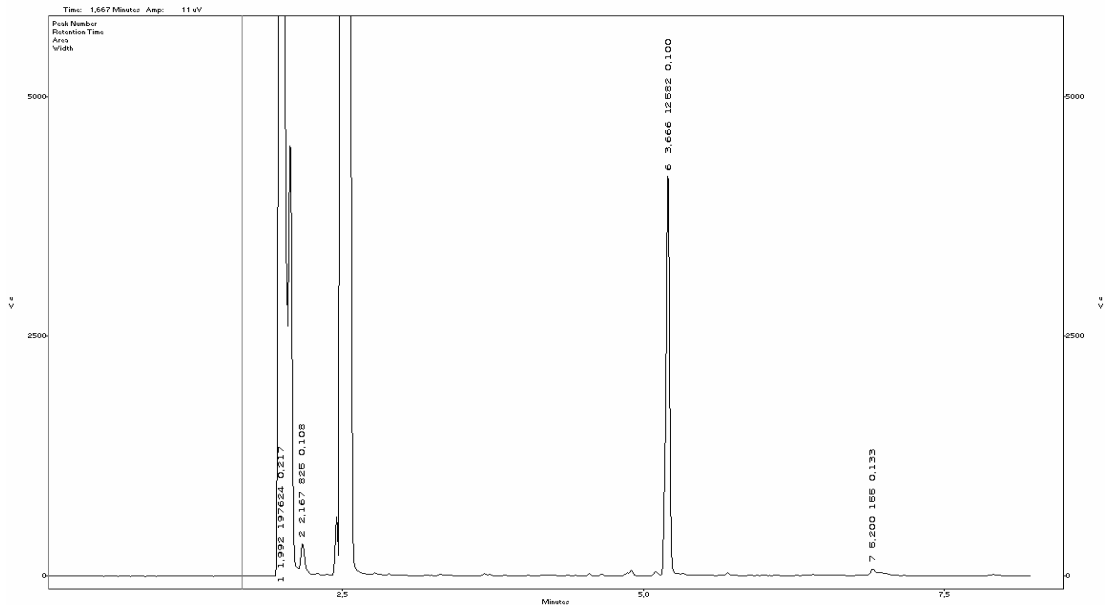
Anexo C. Cromatograma del copolimero P(3-HB-co-3-HV), utilizado como patrón para la cuantificación de los metil ester (3-Hidroxi butirato)(3HB) y (3-Hidroxi valerato)(3HV).



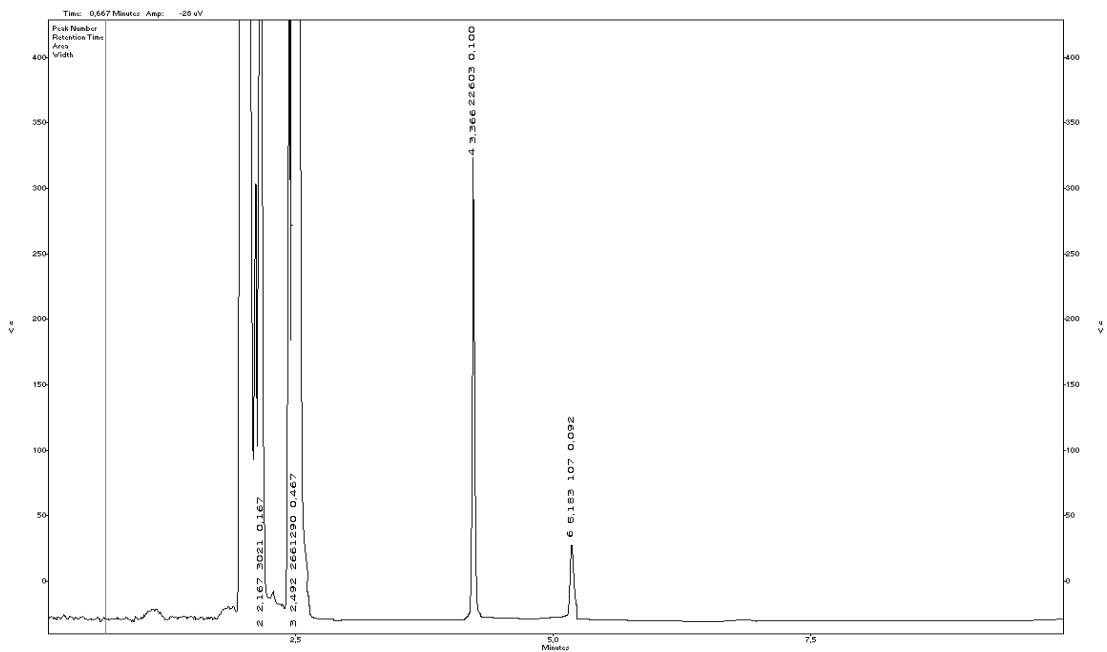
Anexo D. Cromatograma del experimentos 2 de la matriz codificada, donde se obtuvo la cantidad del copolimero P(3-HB-co-3-HV). Utilizando sustratos comerciales.

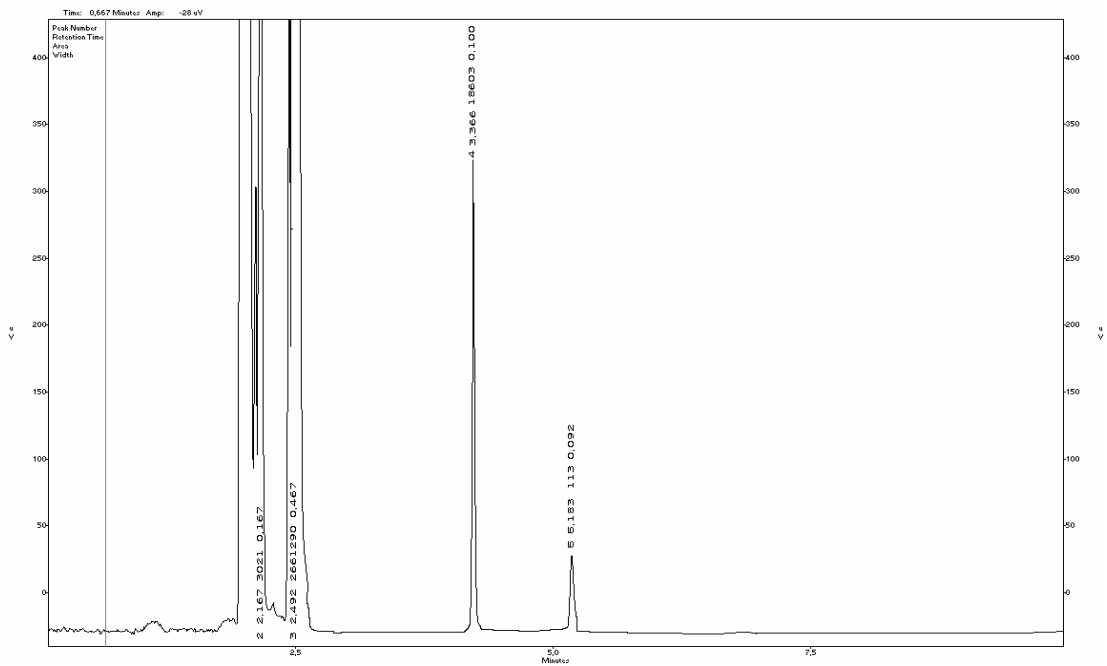


Anexo E. Cromatograma del copolimero P(3-HB-co-3-HV), cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de papa como fuente de carbono.

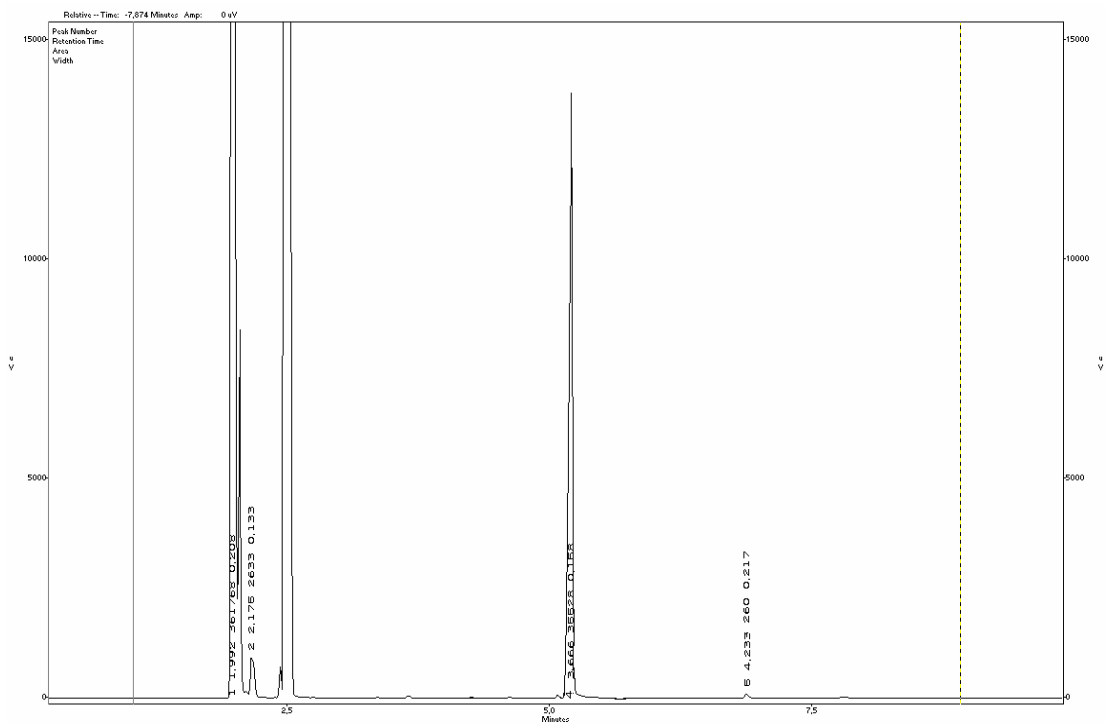


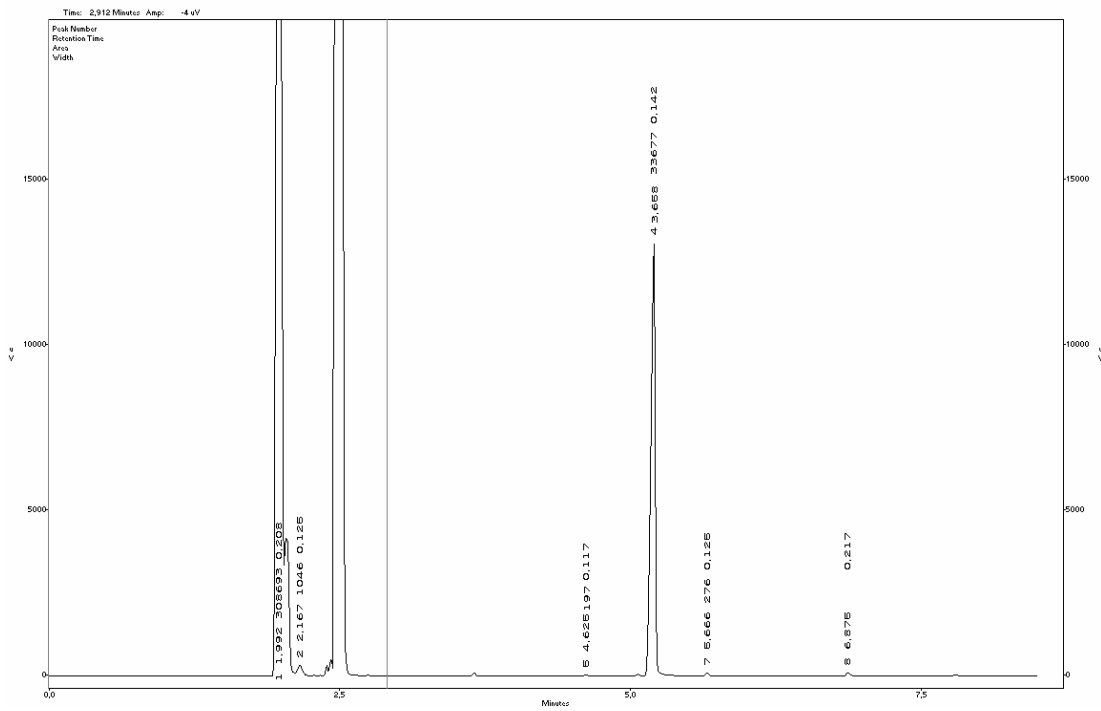
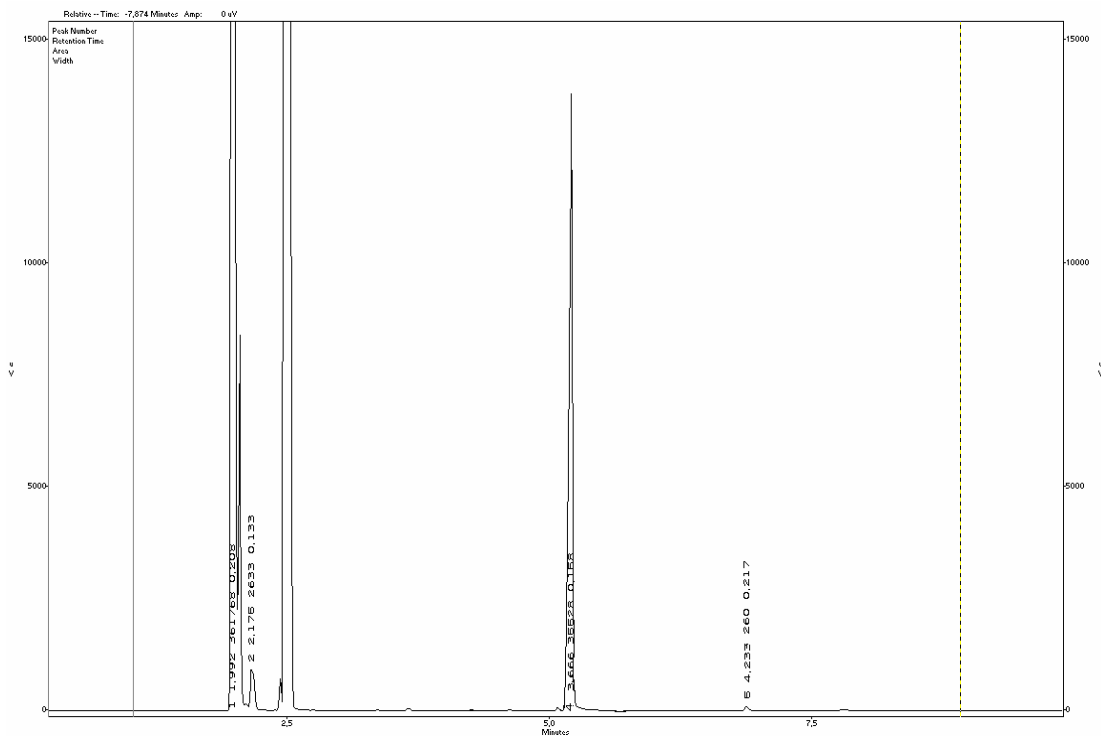
Anexo F. Cromatogramas del copolimero P(3-HB-co-3-HV), cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de Harina de Quinoa y Haba como fuentes de nitrogeno.





Anexo G. Cromatogramas del copolimero P(3-HB-co-3-HV), cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de Harina de Quinua como fuente de nitrógeno e hidrolizado de harina de papa como fuente de Carbono.





Anexo H. Cromatograma del copolimero P(3-HB-co-3-HV) en un medio optimo, cuando el medio de cultivo se encuentra suplementado con hidrolizado de Harina de Quinoa como fuente de nitrógeno e hidrolizado de harina de papa como fuente de Carbono

