

EFFECTOS DEL pH, TEMPERATURA Y SUSTRATOS RELACIONADOS EN LA
SÍNTESIS DEL COPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)
PRODUCIDO POR LA CEPA SILVESTRE *Bacillus mycooides M17-2*

GABRIELA ROMO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2008

EFFECTOS DEL pH, TEMPERATURA Y SUSTRATOS RELACIONADOS EN LA
SÍNTESIS DEL COPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)
PRODUCIDO POR LA CEPA SILVESTRE *Bacillus mycooides M17-2*

GABRIELA ROMO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Asesor:
Ph.D. PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTA Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2008

“Las ideas y conclusiones aportados en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

“Artículo 1 del acuerdo No. 234 de Octubre 11 de 1966, emanada por el honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño”.

Nota de aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, junio 2008

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fortaleza para seguir adelante en el transcurso de la vida y sobre todo durante mi carrera

A mis padres por su esfuerzo, comprensión y por haber estado pendientes de mi hasta el último momento

A todos mis amigos por su apoyo y colaboración desinteresada

A los profesores Jesús Cabrera y Jesús Romo por dedicar parte de su tiempo a realizar valiosas sugerencias y aportes, los cuales permitieron consolidar este trabajo de tesis

Al doctor Pablo Fernández Izquierdo por su asesoría, paciencia, apoyo incondicional y dedicación durante el desarrollo de este trabajo

Y en general a todas las personas que de una u otra manera colaboraron durante todo el proceso de esta investigación

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mi madre porque junto conmigo ha sufrido los tropiezos y ha celebrado cada triunfo de mi vida.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	22
2. MARCO TEÓRICO	23
2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	24
2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	25
2.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAs	28
2.3.1. <i>Bacillus</i> productores de PHAs	30
2.3.1.1. <i>Bacillus mycooides</i>	30
2.4. RUTAS BIOSINTÉTICAS DE PHAs	31
2.4.1. Biosíntesis de PHA en <i>Ralstonia eutropha</i>	31
2.4.2. Síntesis de PHA con una enoil-CoA hidratasa	32
2.4.3. Ruta de la metilmalonil-CoA para la síntesis de P(3HB-3HV) a partir de azúcares	34
2.4.4. Biosíntesis de PHA _(MCL) a partir de ácidos grasos en <i>pseudomonas</i>	35
2.4.5. Biosíntesis de PHAs _(MCL) a partir de carbohidratos en <i>pseudomonas</i>	36
2.5. SUSTRATOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs	37
2.5.1. Sustratos carbonados	38
2.5.2. Magnesio	38
2.5.3. Fosfato	39
2.5.4. Nitrógeno	39

2.5.5. Sales inorgánicas	39
2.5.6. Agua	40
2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA SÍNTESIS DE PHA Y SU COMPOSICIÓN	40
2.6.1. Sustrato de alimento y condiciones de crecimiento	40
2.6.2. Cepa Bacteriana	43
2.7. MÉTODOS PARA LA RECUPERACIÓN DEL PHA	44
2.7.1. Extracción con Solventes	44
2.7.2. Digestión con hipoclorito de sodio	45
2.7.3. Digestión enzimática	45
2.8. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PHAs	46
2.8.1. Métodos de identificación	46
2.8.1.1. Microscopía	46
2.8.1.2. Tinciones y fluorescencias	46
2.8.1.3. Hibridación de colonias	48
2.8.2. Métodos para el análisis de PHAs	48
2.8.2.1. Gravimetría	49
2.8.2.2. Espectrometría	49
2.8.2.3. Espectroscopía infrarroja (IR)	49
2.8.2.4. Cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)	50
2.8.2.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	51
2.8.3. Otros métodos para el análisis de PHAs	52
2.9. BIODEGRADABILIDAD DE LOS PHAs	53

2.10. APLICACIONES	55
2.10.1. Aplicaciones médicas y farmacéuticas	55
2.10.2. Aplicaciones agrícolas	56
2.10.3. Empaques biodegradables para productos	56
3. METODOLOGÍA	58
3.1. MICROORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO	58
3.2. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO	58
3.2.1. Evaluación de la temperatura	58
3.2.2. Evaluación del pH	59
3.3. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO	60
3.3.1. Cinética de crecimiento	61
3.4. ANALISIS DEL COPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)	62
3.4.1. Extracción del polímero	62
3.4.2. Identificación del polímero por espectroscopía infrarroja	62
3.4.3. Identificación del polímero por cromatografía de gases (GC)	63
3.4.4. Identificación del polímero por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS)	63
3.5. CUANTIFICACIÓN DEL COPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)	63
3.6. CUANTIFICACIÓN DE CARBONO TOTAL POR EL MÉTODO DE DUBOIS	64
3.7. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	66

4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO	66
4.1.1. Evaluación del efecto de la temperatura.	67
4.1.2. Evaluación del efecto del pH.	68
4.2. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO	70
4.2.1. Cinética de crecimiento	71
4.3. ANALISIS DEL COPOLÍMERO POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)	78
4.3.1. Identificación del polímero por espectroscopía infrarroja (IR)	78
4.3.2. Identificación del polímero por cromatografía de gases (GC)	79
4.3.3. Identificación por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).	81
5. CONCLUSIONES	85
6. RECOMENDACIONES	86
7. BIBLIOGRAFÍA	87
8. ANEXOS.	98

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Propiedades físicas de los polihidroxicanoatos y el polipropileno
- Tabla 2. Microorganismos productores de PHAs
- Tabla 3. Degradación de PHA por microorganismos aislados de diferentes ambientes
- Tabla 4. Composición del medio basal (MB) empleado para la producción de PHAs con *B. mycooides* M17-2
- Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación de temperatura en la síntesis del polímero producido por *B. mycooides* en un medio de cultivo MB de pH 6.5
- Tabla 6. Diseño experimental para la evaluación del pH en la síntesis del polímero producido por *B. mycooides* en un medio de cultivo MB
- Tabla 7. Diseño experimental para la evaluación del de ácidos grasos de cadena corta en la síntesis del polímero producido por *B. mycooides*
- Tabla 8. Efecto de la temperatura en la síntesis de biomasa y PHA en la cepa *B.mycooides* M17-2 en medio de cultivo MB a pH 6.5
- Tabla 9. Efecto del pH en la síntesis de biomasa y PHA en la cepa *B.mycooides* M17-2 en medio de cultivo MB a T^o=30°C
- Tabla 10. Efecto de los ácidos grasos de cadena corta en la producción de biomasa y en la síntesis de polímero en la cepa de *B mycooides* M17-2

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos
- Figura 2. Identificación de PHA
- Figura 3. Estructura de otros copolímeros
- Figura 4. Ruta biosintética para la producción de PHB y P(HB-HV) en *Alcaligenes eutrophus*
- Figura 5. Ruta biosintética de *Rhodospirillum rubrum*
- Figura 6. Biosíntesis de PHA con una enoil-CoA hidratasa en *Aeromonas caviae*
- Figura 7. Ruta metilmalonil-CoA para síntesis de P(3HB-3HV) a partir de azúcares
- Figura 8. Biosíntesis de PHAs_(MCL) a partir de ácidos grasos en *Pseudomonas*
- Figura 9. Biosíntesis de PHAs_(MCL) a partir de carbohidratos en *Pseudomonas*
- Figura 10. Tinciones y fluorescencias: (A) Epifluorescencia del PHA en microorganismos teñidos con Azul Nilo. (B) Fluorescencia de diferentes aislados bacterianos con Rojo Nilo. (C) Tinción de los gránulos de PHA con Sudán Negro
- Figura 11. Degradación del P(3HB-3HV) en un ambiente aeróbico (lodo de alcantarilla)
- Figura 12. Síntesis y degradación de poli(R)- 3-hidroxi-butirato
- Figura 13. Aplicaciones de los PHAs
- Figura 14. Proceso de inoculación para la evaluación de la temperatura y el pH
- Figura 15. Proceso de inoculación para evaluar el efecto de los ácidos grasos de cadena corta
- Figura 16. Crecimiento, producción de PHA y consumo de sustrato en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 en medio MB bajo condiciones óptimas: pH 7 y temperatura 30°C
- Figura 17. Crecimiento, producción de PHA y consumo de sustrato en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2, en medio MB suplementado con ácido butírico, bajo condiciones óptimas: pH 7 y temperatura 30°C
- Figura 18. Crecimiento, producción de PHA y consumo de sustrato en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2, en medio MB suplementado con ácido propiónico, bajo condiciones óptimas: pH 7 y temperatura 30°C
- Figura 19. Ácido propiónico como precursor de la fracción valerato
- Figura 20. Espectro Infrarrojo del PHA producido por la cepa *B. mycoides* M17-2 obtenido después de la fermentación en medio MB + ácido propiónico
- Figura 21. Cromatograma del copolímero obtenido de la fermentación en medio basal
- Figura 22. Cromatograma del copolímero obtenido de la fermentación en medio basal más ácido propiónico
- Figura 23. Espectro de masas del éster metílico del ácido 3-Hidroxi-butírico obtenido en medio MB suplementado con Ácido propiónico
- Figura 24. Espectro de masas del éster metílico del ácido 3-Hidroxi-valérico obtenido en medio MB suplementado con Ácido propiónico

Figura 25. Posibles rutas de fragmentación para el ester metílico del ácido 3-hidroxi-butírico

Figura 26. Posibles rutas de fragmentación para el ester metílico del ácido 3-hidroxi-valérico

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Pruebas Duncan para cada grupo de datos de biomasa y PHA obtenido en la evaluación del efecto del pH y la temperatura

Anexo B. Pruebas Duncan para cada grupo de datos de Biomasa y PHA obtenido en la evaluación del efecto de ácidos grasos de cadena corta

Anexo C. Cuantificación del copolímero poli-(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato)

Anexo D. Curva de calibración obtenida mediante el método de Dubois para la cuantificación de carbono total.

Anexo E. Diagrama de flujo de la metodología

RESUMEN

Se evaluó el efecto del pH, temperatura, y ácidos grasos de cadena corta como ácido butírico y ácido propiónico en la síntesis del copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) producido por la cepa silvestre *Bacillus mycoides* M17-2, para lo cual se utilizaron técnicas como: gravimetría, para cuantificar biomasa y GC, GC-MS y espectrometría infrarroja para análisis cualitativo y cuantitativo del polímero.

Se determinó que para esta cepa la mayor producción de biomasa y síntesis de PHA se obtuvo a 30°C y pH 7, a condiciones inferiores o superiores a estos valores tanto el crecimiento celular como la producción del polímero se ven afectadas negativamente. Bajo estas condiciones se realizó la cinética de crecimiento en un medio suplementado con ácido propiónico y otra en un medio suplementado con ácido butírico y se las comparó con un medio testigo, de esta forma se determinó que el ácido butírico ejerce un efecto tóxico sobre esta cepa, inhibiendo el crecimiento celular, por consiguiente la síntesis de polímero fue mínima, mientras que el ácido propiónico, a pesar que también tubo un efecto tóxico sobre el crecimiento celular, fue asimilado y convertido en precursor de la fracción 3-HV del copolímero obteniéndose un incremento de esta fracción y variando la composición del copolímero de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato 95:5) a poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato 50:50).

ABSTRACT

The effect of pH, temperature and short-chain fatty acids such as butyric acid and propionic acid in the synthesis of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by the wild strain *Bacillus mycoides* M17-2 was evaluated through techniques such as gravimetry, to quantify biomass and GC, GC-MS and infrared spectrometry for qualitative and quantitative analysis of the polymer.

It was determined in this strain that the increased production of biomass and PHA synthesis was obtained at 30°C and pH 7, in conditions below or above of these values both cell growth and production of the polymer are affected negatively. Under these conditions of pH and temperature was determined the cell growth kinetics of *B. mycoides* M17-2 in a medium supplemented with propionic acid and another medium supplemented with butyric acid, then were compared with a medium control, thus found that butyric acid exerts a toxic effect on this strain, so that inhibited cell growth, therefore the synthesis of polymer was minimal, while the propionic acid, although it also had a toxic effect on cell growth was assimilated and become a precursor of the fraction 3-HV of copolymer, obtaining an increase in this fraction and changing the composition of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxivalerato 95:5) to poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxivalerato 50:50).

INTRODUCCIÓN

Los plásticos sintéticos o de origen petroquímico son de gran utilidad en la vida diaria del hombre debido a que han reemplazado materiales como la madera, el vidrio y algunos materiales de construcción, sin embargo la acumulación de los residuos plásticos se ha convertido en uno de los problemas ecológicos más graves debido a su dificultad para degradarse, es por eso que diversos grupos científicos se han esforzado por encontrar en la naturaleza una solución al problema de la biodegradación total del plástico, ya que no basta con reciclarlo, es por eso que han puesto a trabajar a las bacterias con una nueva finalidad: la producción de plásticos, y no sólo han logrado obtener compuestos con propiedades similares a las de los obtenidos del petróleo sino que, además, poseen ciertas ventajas, entre ellas que son degradados en compuestos que no contaminan el medio ambiente, como agua, dióxido de carbono y humus, y que además son producidos a partir de fuentes renovables de energía, lo que contribuye con el mantenimiento de las reservas fósiles (no renovables) en el planeta.^{1,2}

Entre la gran variedad de plásticos biodegradables obtenidos se encuentran los Polihidroxialcanoatos (PHAs) los cuales son producidos por diversas especies bacterianas y debido a sus propiedades físicas y químicas, son considerados como posibles sustitutos de los plásticos convencionales, con la gran ventaja que son completamente biodegradables.³

Los PHAs son poliésteres intracelulares que acumulan las bacterias como gránulos de reserva de carbono en condiciones y sustratos apropiados, es por eso que su producción y extracción a nivel industrial resultan costosos. Sin embargo en los últimos años se han desarrollado estudios tanto para obtener nuevas cepas bacterianas capaces de crecer y producir altos niveles de PHA en sustratos baratos, así como para mejorar los procesos de fermentación y extracción del polímero. Por otro lado, se ha profundizado en el conocimiento de los genes, en el metabolismo y los mecanismos de regulación de síntesis de este material, con el objetivo de emplear microorganismos recombinantes que faciliten su producción a gran escala.⁴

¹ Brussels Biotech, Galáctica SA, " Biopolymers as viable alternatives to common plastic materials". 2004.

² Demicheli Mario, "Plásticos biodegradables a partir de fuentes renovables ". 2001. *IPTS* , vol 10.

³ Byrom, D. Polyhydroxyalkanoates. In: Mobley DP, editor. *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. p. 5–33.

⁴ Khanna, S., and Srivastava, A. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. 2005. Vol. 40. p. 607–619.

Actualmente para la producción de PHA se utilizan cepas como *Ralstonia eutropha*, *Rhodobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* entre otras, las cuales se caracterizan por ser grandes productoras de PHA y algunas de ellas tienen gran importancia a nivel industrial por acumular el polímero aproximadamente en un 80% de su peso seco.^{5,6,7}

De los diferentes suelos del departamento de Nariño también se han aislado cepas productoras de PHA, y se han caracterizado a través de patrones de oxidación de azúcares y por su perfil lipídico, encontrándose una cepa catalogada como M17-2 perteneciente a la especie *Bacillus mycoides*, productora del copolímero (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)(3HB-3HV).⁸

Por esta razón, para este trabajo de investigación se tomó la cepa M17-2 la cual produce el copolímero 3HB-3HV cuya fracción 3-HV está en baja concentración, por lo tanto se trazó como objetivo evaluar el efecto de factores como pH y temperatura y sustratos relacionados como ácido butírico y ácido propiónico (ácidos grasos de cadena corta) en la síntesis del copolímero producido por esta cepa.

Aportes teóricos

En este trabajo de investigación se demostró que existe una ruta metabólica que conduce desde el ácido propiónico hacia la síntesis de la unidad monomérica 3-HV la cual se polimeriza para conformar el copolímero poli (3-HB-3-HV) producido por la cepa *B. mycoides* M17-2 por lo tanto el ácido propiónico es el precursor que promueve la síntesis de la fracción 3-HV

La síntesis de la fracción 3-HV es una vía de detoxificación involucrada en la regulación de las concentraciones de ácido propiónico intracelular

Aportes Prácticos

Se diseñó una metodología para modificar las relaciones monoméricas del copolímero poli(3-Hidroxi-butirato-co-3-Hidroxi-valerato) de 95:5 a 50:50, con lo cual se modifican las propiedades físicas del mismo.

⁵ Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K. Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters From Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects. 1998. Vol. 65. p. 127-161.

⁶ Kim, B., et al. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fedbatch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. 1994. Vol. 43. p. 892-898.

⁷ Lee, S. Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. 1996a. Vol. 14. p. 431-438.

⁸ Hidalgo, W., Zambrano, J.C. Aislamiento de Bacterias Nativas Productoras de Polihidroxialcanoatos PHAs Presentes en Suelos de la Región Andina del Departamento de Nariño. Tesis. Universidad de Nariño, 2005.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar los efectos del pH, temperatura y ácidos grasos de cadena corta en la síntesis de polihidroxicanoatos (PHAs) de una cepa silvestre *Bacillus mycooides* M17-2

ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del pH y temperatura en la síntesis del polímero sintetizado por *Bacillus mycooides* M17-2
- Determinar el efecto de ácido butírico y ácido propiónico en la síntesis del polímero
- Determinar la cinética de producción de biomasa y de síntesis del polímero de la cepa silvestre de *Bacillus mycooides*

2. MARCO TEÓRICO

Los plásticos son sustancias orgánicas que se obtienen mediante reacciones químicas entre diferentes materias primas de origen sintético o natural y que pueden ser moldeados o procesados en una gran variedad de formas, aplicando calor y presión. En la actualidad se producen más de 700 tipos de plásticos, entre ellos, poliestireno, nylon, policloruro de vinilo (PVC), siliconas, resinas entre otros. Se dice que son polímeros (del latín “poli = muchas” y “meros = partes”) porque están formados por largas cadenas de moléculas (monómeros) unidas entre sí que contienen en su estructura principalmente carbono e hidrógeno. Los plásticos se dividen en tres grandes grupos de acuerdo a su composición:⁹

- Polímeros sintéticos puros: no son biodegradables ya que los microorganismos no tienen las enzimas necesarias para degradarlos.
- Polímeros naturales puros: son totalmente biodegradables pues se descomponen en sustancias simples como dióxido de carbono y agua por la acción de los microorganismos descomponedores que se alimentan de ellos.
- Uniones de polímeros naturales y sintéticos: están constituidos por polímeros sintéticos, derivados del petróleo que se procesan en refinerías e incluyen mezclas de almidón. Este tipo de polímeros de cierto modo es biodegradable aunque lo único que se degrada en el medio ambiente es su componente de almidón pero la parte del polímero sintético queda inalterable.

Los plásticos sintéticos al no ser biodegradados perduran en la naturaleza por largos períodos de tiempo y por tanto se acumulan, generando así grandes cantidades de residuos sólidos. Muchos de estos materiales pueden ser reciclados, sin embargo, este proceso produce grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente. En búsqueda de una solución a estos problemas se han desarrollado polímeros biodegradables a partir de materias primas renovables, derivadas de plantas y bacterias. Entre estos polímeros están: los naturales como el almidón y la celulosa; los producidos por microorganismos como los polihidroxicanoatos (PHA) y sintéticos como los polilactatos (PLA). Por sus altas tasas de biodegradabilidad y sus excelentes propiedades físico-mecánicas los PLA y los PHA han resultado ser los de más amplia aplicación en la actualidad.¹⁰

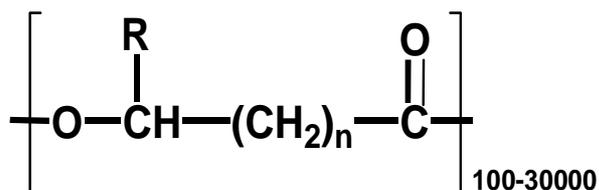
⁹ Brussels Biotech, Op. cit

¹⁰ Demicheli Mario, Op, cit

2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

Los polihidroxicanoatos son polímeros de naturaleza hidroxilácida, en los cuales el grupo carbonilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente. Su estructura general se muestra en la figura 1.

Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos¹¹



n = 1	R =	Hidrógeno	poli(-3-hidroxipropionato)
		Metil	poli(-3-hidroxibutirato)
		Etil	poli(-3-hidroxivalerato)
		Propil	poli(-3-hidroxihexanoato)
		Pentil	poli(-3-hidroxiocanoato)
		Nonil	poli(-3-hidroxi-dodecanoato)
n = 2	R =	Hidrógeno	poli(-4-hidroxibutirato)
n = 3	R =	Hidrógeno	poli(-5-hidroxivalerato)

El primer PHA descubierto fue el poli(3-D-hidroxibutirato)(PHB), un homopolímero que fue detectado en la especie *Bacillus megaterium*¹². En la actualidad se conocen muchas bacterias que sintetizan y acumulan PHA como reserva de carbono y energía bajo condiciones limitadas de nutrientes en presencia de una fuente de carbono en exceso¹³, este biopolímero acumulado puede ser degradado por depolimerasas intracelulares y metabolizado como fuente de carbono y energía. La mayoría de PHAs están compuestas por monómeros de R-3-ácidos hidroxialcanóicos que oscilan entre 3 y 14 átomos de carbono, su peso molecular está en el rango de 2×10^5 a 3×10^6 daltons, dependiendo del tipo de microorganismo y condiciones de crecimiento. Los PHAs son acumulados en las células en forma de gránulos discretos, el tamaño y número por célula varía dependiendo de las diferentes especies, por ejemplo, la bacteria *Alcaligenes eutrophus* aproximadamente acumula de 8 a 13 gránulos por célula como se observa en la figura 2a y tienen un diámetro entre 0.2 y 0.5 μm , los gránulos aparecen como inclusiones altamente refractivas bajo la observación al

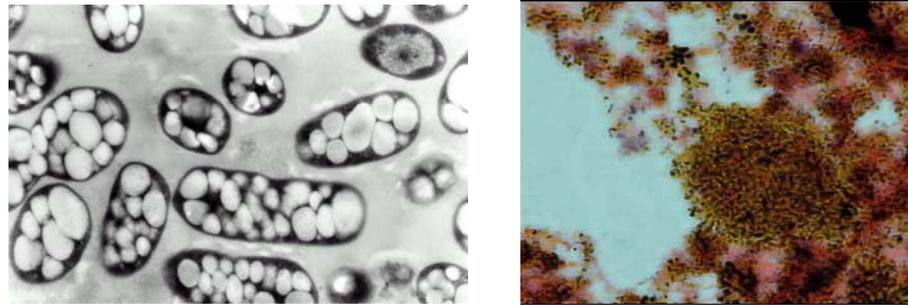
¹¹ Lee SY. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. 996b. Vol. 49. p. 1- 14.

¹² Lemoigne, M. Produits de deshydratation et de polymerization de 1 acide β -hidroxibutiric; *Bull Soc.* 1926. Vol. 8. p. 7770-7782

¹³ Byrom, D., OP. cit

microscopio electrónico¹⁴. Los Microorganismos que acumulan PHA son identificados fácilmente mediante una tinción con Sudán negro o azul Nilo como en la figura 2b¹⁵.

Figura 2. Identificación de PHA



a. Acumulación de P(3HB) por *Alcaligenes eutrophus*

b. Tinción con sudan negro

Los PHAs pueden ser divididos en dos amplios grupos dependiendo del número de átomos de carbono en las unidades monoméricas; los polihidroxicanoatos de longitud de cadena corta PHAs_(SCL), que poseen de 3 a 5 átomos de carbono, y los polihidroxicanoatos de longitud de cadena media PHAs_(MCL) que poseen entre 6 a 14 átomos de carbono. Esta agrupación se debe a la especificidad del sustrato de síntesis de PHA que sólo acepta 3-hidroxicanoatos (3HAs) de un cierto rango de átomos de carbono¹⁶. Las PHA sintasas de *Alcaligenes eutrophus* pueden polimerizar únicamente 3HAs_(SCL), mientras que las de *Pseudomonas oleovorans* sólo polimerizan 3HAs_(MCL). Gran cantidad de PHAs_(MCL) contienen varios grupos funcionales como olefinas, grupos alquilo ramificados, halógenos, aromáticos y grupos ciano^{17,18}.

2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Los PHAs son poliésteres de cadena lineal que presentan actividad óptica debido a la quiralidad del carbono β o carbono 3 que hace al compuesto perfectamente isotáctico, además tienen una masa molecular suficientemente alta lo cual les permite poseer características similares a las de los plásticos convencionales

¹⁴ Doi Y, et al. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. 1992. Rev. 103. p. 103-108.

¹⁵ Ostle, A. G., y J. G. Holt. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. 1982. Vol. 44. p. 238-241

¹⁶ Anderson, A., et al. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. 1990. Vol 54. N°4. p. 540-572.

¹⁷ Valentin, H. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. 1994. Vol. 40. p. 710-716.

¹⁸ Huijberts, G. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. 1992. Vol. 58. p. 536-544.

como el polipropileno¹⁹. En la tabla 1 se muestran las propiedades de algunos polihidroxicanoatos.

Tabla 1. Propiedades físicas de los polihidroxicanoatos y el polipropileno

Parámetro	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HHx)	Polipropileno
Punto de fusión (°C)	177	145	150	61	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	2	-1	-7	-36	-10
Cristalinidad (%)	70	56	45	30	60
Elongación de ruptura (%)	5	50	444	300	400

P(3HB)=poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB-3HV)=poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), P(3HB-4HB)=poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato), P(3HO-3HH)=poli(3-hidroxi-octanoato-co-3-hidroxi-hexanoato)²⁰

Dentro de la amplia gama de PHAs que se pueden obtener, solamente tres han sido producidos con alta productividad: PHB (poli-3-hidroxi-butirato), P(HB-co-HV) (poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) y P(HHx-co-HO) poli(-3-hidroxi-hexanoato-co-3-hidroxi-octanoato)²¹, es por eso que la mayoría de los estudios referentes a las propiedades físicas de los PHAs se han realizado con estos polímeros. El homopolímero PHB es un termoplástico cuyas unidades monoméricas están todas en la configuración D(-) debido a la estereoespecificidad de las enzimas involucradas en la síntesis por lo cual es 100% estereoespecífico²² por esta razón es altamente cristalino, lo cual hace que sea un material excesivamente frágil y quebradizo, su alta temperatura de fusión de 177°C es ligeramente más baja que la temperatura a la cual este polímero se descompone térmicamente (185°C)²³, sin embargo el PHB posee varias propiedades útiles como resistencia a la humedad, insolubilidad en agua y pureza óptica, esto diferencia al PHB de otros plásticos biodegradables actualmente disponibles que son solubles en agua o sensibles a la humedad²⁴.

¹⁹ Chen, G, et al. Microbial production of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. Prog. Natl. Sci. 2000. Vol. 10. p. 843-850

²⁰ Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. Synthesis and properties of polyhydroxyalkanoates. biological polyesters. 2000. Vol. 25. p. 1503-1555.

²¹ Hahn, S. K., et al. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. 1995. Vol. 61. N° 1. p. 34-39.

²² Lee, S. (1996b)Op. cit

²³ Madison, L. and Huisman, G. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates). From DNA to plastic. 1999. Vol. 63. N° 1. p. 21-53.

²⁴ Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer (Minireview). 2004. Vol. 3. N° 1. p. 18-24.

2.3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAs

Existen cerca de 300 especies bacterianas que acumulan PHAs, pero el porcentaje de acumulación en muchas de ellas es muy bajo por lo cual se rechazan ante la imposibilidad de industrializar el proceso. Sin embargo, especies como *Ralstonia eutropha* (antes *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* y *Azotobacter vinelandii* han sido investigadas ampliamente. El microorganismo más investigado ha sido *R. eutropha* por su capacidad de acumular grandes cantidades de PHAs del tipo poli-3-hidroxibutirato (PHB), en un medio simple a partir de fuentes de carbono económicas tales como glucosa, fructosa y residuos de la industria oleica^{28,29}.

Las bacterias productoras de PHAs pueden ser divididas en dos grupos basados en las condiciones del cultivo requeridas para la síntesis de PHA. El primer grupo de bacterias requiere condiciones caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre. El segundo grupo de bacterias acumulan el polímero durante el crecimiento y no requiere de limitación de nutrientes para la síntesis de PHA. Microorganismos como *R. eutropha* y bacterias metilotróficas (*Protomonas extorquens*, y *Protomonas oleovorans*) pertenecen al primer grupo, mientras que *Alcaligenes latus*, cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*, y bacterias recombinantes como *E. coli* pertenecen al segundo grupo³⁰.

Es necesario que las cepas productoras de PHAs tengan una velocidad específica de crecimiento, que puedan utilizar diferentes sustratos y sobre todo que el porcentaje de producción del polímero sea alto en relación al peso seco de la biomasa. Por ejemplo *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, acumulan PHA en condiciones apropiadas de limitación de nutrientes cerca del 80% de su peso seco y con alto peso molecular³¹; *Rhizobium meliloti* M5N1, produce alrededor del 60% del peso seco, cuando se cultiva en fructosa como fuente de carbono³²; en procariotes marinos, los PHAs se acumulan intracelularmente en grandes cantidades con rangos de 25-80% del peso seco celular³³.

De igual manera, otras bacterias que presentan las anteriores características han sido utilizadas favorablemente para la producción industrial, como *Azotobacter*

²⁸ Lee, S. Y. 1996a. Op.cit

²⁹ Barbosa, M. Producción De Poli-β-Hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. 2005. Vol.10 N°1. p. 45-54.

³⁰ Khanna, S., and Srivastava, A. Op. Cit

³¹ Asenjo, J. A. et. Al. Effect of Single Nutrient limitation on Poly-β-hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. 1995. Vol.46 N°5. p. 497-502.

³² Jan, S. et. al: Quantitative 1HNMR spectroscopy analysis of the poly (3-hydroxyalkanoate) extracted from *Rhizobium meliloti* cells. 1995. Vol. 92. p. 1793-1796.

³³ Weiner, R. M.: Biopolymers from marine prokariotes. 1997. Vol. 15. p. 390-394.

vinelandii, *Alcaligenes latus*, algunas especies de metilotróficos y algunos microorganismos recombinantes como *R. eutropha* recombinante, *Escherichia coli* recombinante y *Klebsiella aerogenes* recombinante, esencialmente por la gran variedad de sustratos en los cuales estas pueden crecer³⁴.

En la tabla 2 se puede apreciar algunas bacterias productoras de PHAs, el tipo de polímero producido y los sustratos (precursores) utilizados para su biosíntesis.

Tabla 2. Microorganismos productores de PHAs

Organismo	Sustrato	PHA	Referencias
<i>Azotobacter vinelandii</i> UWD	Valerato + glucosa	P(3HB-3HV)	Page y Manchak, 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 40126	Acetato	P(3HB-3HV)	Haywood <i>et al.</i> , 1991
<i>Methylobacterium Exorquens</i>	Metanol + Valerato	P(3HB-3HV)	Bourque <i>et al.</i> , 1992
<i>Alcaligenes Latus</i>	Sacarosa	P(3HB)	Yamane <i>et al.</i> , 1996
<i>Alcaligenes Latus</i>	1,5-Pentadiol	P(3HB-3HHx)	Sudesh K, <i>et al.</i> , 2000
<i>R. eutropha</i>	Acido Pentanóico Acido 3-hydroxypropionic	P(3HB-3HP)	Sudesh K, <i>et al.</i> , 2000
<i>R. eutropha</i> H16	Acido 3-mercaptopropiónico	P(3HB-3MP)	Lütke, Tina, <i>et al.</i> , 2001
<i>R. eutropha</i> H16	Propionato	P(3HB-3HV)	Doi <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudomonas</i> 135	Metanol	P(3HB)	Daniel <i>et al.</i> , 1992
<i>Pseudomonas extorquens</i> MP4	Metanol	P(3HB-3HV)	Haywood <i>et al.</i> , 1989
<i>Comamonas acidovorans</i>	1,4-butanediol, 1,6-hexanediol	P(3HB-4HB)	Sudesh K, <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> recombinante	Glucosa	P(3HB-4HB)	Hein, S, y Steinbunchel. 1997.
<i>Aeromonas caviae</i>	Aceite de oliva	P(3HB-3HH)	Doi, Y., S. Kitamura, and H. Abe. 1995.
<i>Bacillus subtilis</i> 25	Glucosa	P(3HB)	Z. Nur Yükksekdağ. <i>et. al</i> 2004.
<i>B. megaterium</i> 12	Glucosa	P(3HB)	Z. Nur Yükksekdağ. <i>et. al</i> 2004.

P(3HB)=poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB-3HV)=poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P(3HB-4HB)=poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato), P(3HB-3HH)=poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato), P(3HB-3MP)=poli(3-hidroxi-butirato-co-3-mercaptopropionato).

Además de las bacterias existen otros organismos vivos capaces de producir PHAs, es el caso de algunas plantas transgénicas (plantas modificadas genéticamente) como soya, canola, maíz, algodón alfalfa y tabaco que aún están en estudio.

³⁴ Zhang, H., et al. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. 1994. Vol. 60. p. 1198–1205

La producción de PHAs por parte de estos organismos es de gran importancia para su supervivencia ya que son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes como fuente de carbono y energía para el enquistamiento y la esporulación, para la degradación de compuestos tóxicos³⁵ y como fuente de poder reductor³⁶.

2.3.1. *Bacillus* productores de PHAs. Se ha estudiado la capacidad de algunas especies de *Bacillus* para producir PHB, como *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* entre otras, con el fin de seleccionar una cepa que produzca altos niveles de PHB para utilizarla a nivel industrial y se ha encontrado por ejemplo, en las cepas *Bacillus subtilis* 25 y *Bacillus megaterium*12 que cuando crecen en caldo nutritivo producen 0.101 g/L, 0.142 g/L del homopolímero PHB respectivamente³⁷.

2.3.1.1. *Bacillus mycoides*. Los *Bacillus mycoides* son bacterias Gram-positivas que forman colonias que se extienden sobre agar en forma de crecimiento rizoide, por lo que se denominan colonias filamentosas, esta característica las diferencia de los *Bacillus cereus*. Además presentan forma de bastón y endosporas ovales con posición central.

En estudios realizados por Borah y Takur (2002) se pudo apreciar que la cepa *Bacillus mycoides* RLJB-017 aislada de lodos activos produce aproximadamente un 69.4% de PHB respecto a su peso seco cuando creció en un medio suplementado con sacarosa.

En el banco de cepas del laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad de Nariño existen cepas aisladas de diferentes suelos de la región pertenecientes a esta especie, y se ha encontrado que algunas de estas cepas producen PHAs, destacándose la cepa silvestre *Bacillus mycoides* M17-2, la cual puede sintetizar el copolímero poli(3HB-3HV) sin necesidad de adicionar al medio de cultivo propionato, valerato u otros ácidos grasos de cadena impar que se han identificado como precursores inmediatos de la unidad monomérica 3-hidroxivalerato, estos resultados sugieren para este microorganismo un elevado potencial industrial ya que permitiría obtener plástico con un menor costo de producción³⁸.

³⁵ Godoy, F. Poly- β -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. 2003. Vol. 36. p. 315-20.

³⁶ Henrysson, T. Influence of the endogenous storage lipid poly- β -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting ethanotrophic mixed cultures. 1993. Vol. 59. p. 1602-1606.

³⁷ Yüksesdağ Z., et al. Op.cit.

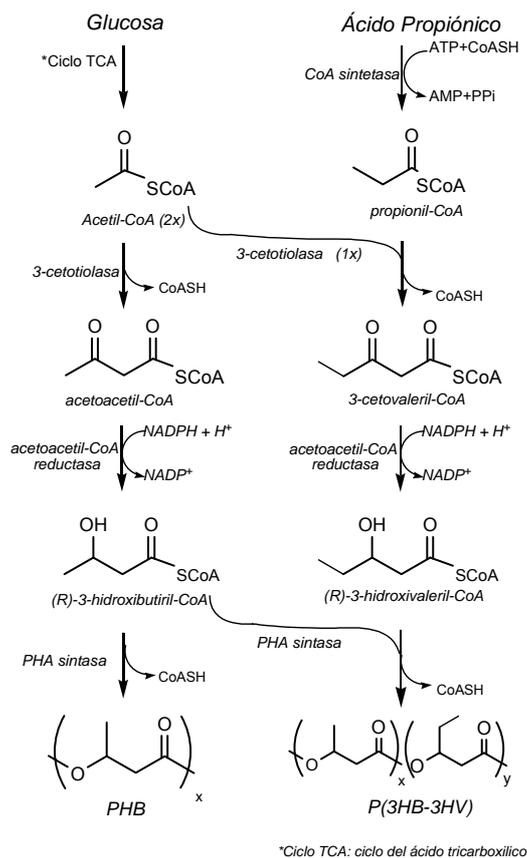
³⁸ Fernández, P., et al. Influencia de Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Crecimiento Bacteriano y Síntesis de Polihidroxialcanoato de una Cepa de *Bacillus mycoides* FLB2. 2006. Vol. 1. N° 7. p. 34-42

2.4. RUTAS BIOSINTÉTICAS DE PHAs

El PHB es solo un tipo de los muchos PHAs que son sintetizados por microorganismos, pero no todos usan las mismas rutas biológicas para sintetizarlos ya que sus metabolismos son diferentes. La ruta mas conocida para la síntesis de PHB abarca las reacciones catalizadas por una tiolasa, una reductasa, y una polimerasa, y es característica de *Ralstonia eutropha*, esta y otras rutas se explican a continuación.

2.4.1. Biosíntesis de PHA en *Ralstonia eutropha*³⁹. La ruta biosintética de *Ralstonia eutropha* es la mas estudiada ya que la mayoría de los organismos productores de PHA usa esta ruta metabólica para sintetizarlos. La figura 4 muestra esquemáticamente la ruta de producción de PHB y P(3HB-3HV) para estos organismos.

Figura 4. Ruta biosintética para la producción de PHB y P(HB-HV) en *Alcaligenes eutrophus*⁴⁰.



³⁹ Kim, B., Lee, S. Op. cit

⁴⁰ Ojumu, T. V. Op. cit

En esta bacteria el PHB es sintetizado desde la acetil-CoA por la acción secuencial de tres enzimas. La primera enzima, 3-cetotiolasa cataliza la formación de un enlace carbono-carbono (por una condensación biológica de claisen) entre dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) para formar acetoacetil-CoA. Esta es seguida por la acción de la segunda enzima, la acetoacetil-CoA reductasa, la cual cataliza la reducción estereoselectiva de la acetoacetil-CoA hasta (R)-3-hidroxiacetil-CoA. Finalmente la tercera enzima, la PHB sintasa polimeriza los monómeros de (R)-3-hidroxiacetil-CoA para formar PHB⁴¹.

Cabe mencionar que gran variedad de PHAs con diferentes monómeros de 3 a 5 carbonos han sido producidos en *A. eutrophus*, pero la proporción de estos monómeros son influenciados por el tipo y la cantidad relativa de las fuentes de carbono suministradas en el medio de cultivo. Por ejemplo la adición de ácido propiónico al medio del cultivo que contiene glucosa, conduce a la producción del copolímero compuesto de 3-Hidroxiacetil-CoA y 3-hidroxiisovalerato P(HB-HV) (figura 4), para su formación la acetil-CoA se produce por la eliminación de un carbono carbonílico de la propionil-CoA, luego dos moles de acetil-CoA son usadas para formar una unidad de HB del copolímero, mientras una unidad de HV es formada por reacción de acetil-CoA y propionil-CoA⁴².

Se ha reportado que si se considera el ácido valérico como única fuente de carbono, la proporción del monómero de 3HV en el PHA producido en esta bacteria es del 90%⁴³.

R. eutropha es además, capaz de acumular PHA a partir de fuentes de carbono especializadas como ácido 4-Hidroxiacetil-CoA, γ -butirolactona y 1,4-butadienol. Cuando estos sustratos se adicionan al medio de cultivo se incorporan monómeros de 4-HB junto con 3-HB⁴⁴.

2.4.2. Síntesis de PHA con una enoil-CoA hidratasa. Enzimas del tipo enoil-CoA hidratasa están muy involucradas en la síntesis de PHA en microorganismos como: *Rhodospirillum rubrum* y *Aeromonas caviae*. Para *Rhodospirillum rubrum* Moskowitz y Merrick (1969) propusieron una ruta que comprende dos hidratasas, una específica para el enantiómero *R* y la otra específica para el enantiómero *S*. Esta ruta es casi similar a la de *Ralstonia eutropha*. Sus modificaciones consisten en que después de que la molécula de acetoacetil-CoA formada por la β -cetotiolasa y luego reducida por una reductasa NADH-dependiente a L(+)-3-hidroxiacetil-CoA, esta es convertida a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA por dos enoil-CoA hidratasas (con una molécula de crotonil-CoA como intermediaria). Luego la

⁴¹ Steinbüchel, A. Polyhydroxyalkanoic acids. 1991. p. 124-213.

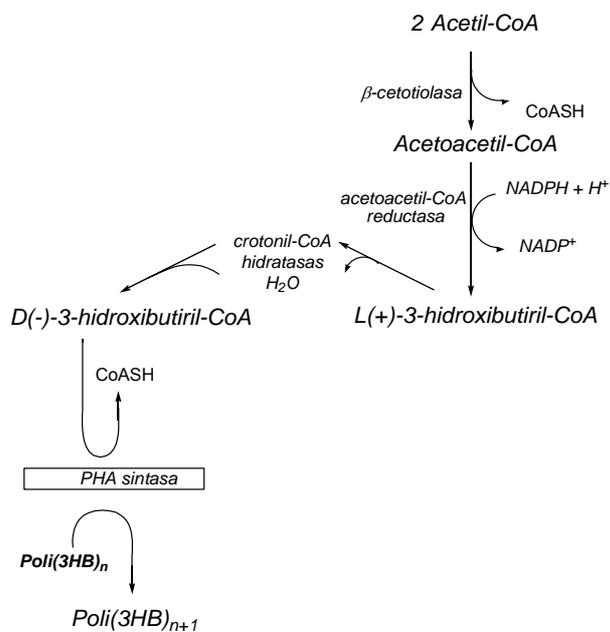
⁴² Steinbüchel, A. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolymer by *Chromobacterium violaceum*. 1993. Vol. 39. p. 443-449.

⁴³ Poirier Y, et al. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. 1995. Vol. 13. p. 142-150..

⁴⁴ Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. Op. cit.

polimerización es catalizada por la PHA sintasa. Un esquema simple de esta ruta se muestra en la figura 5⁴⁵.

Figura 5. Ruta biosintética de *Rhodospirillum rubrum*



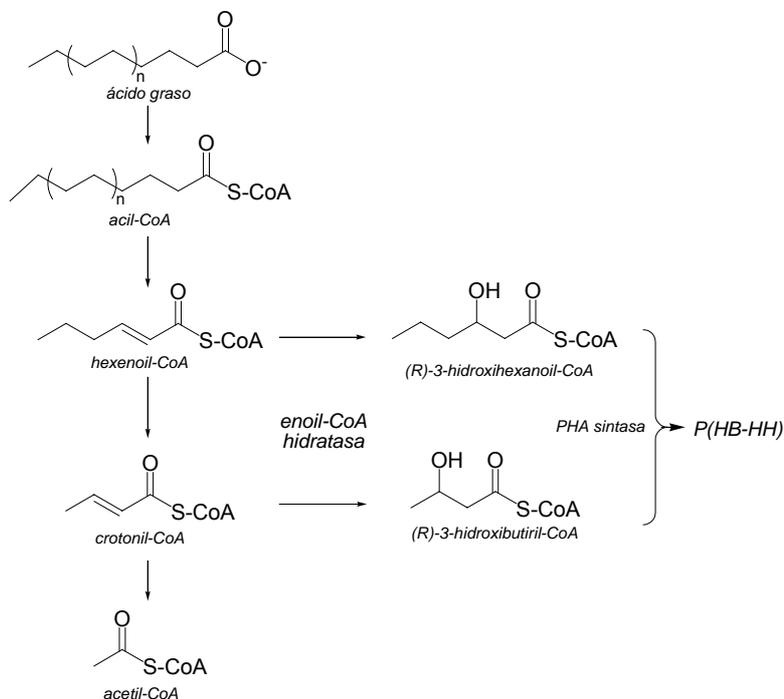
En *Aeromonas caviae* se produce el copolímero poli(3-hidroxi-buirato-co-3-hidroxi-hexanoato) P(HB-HH) cuando crece en ácidos grasos de número par de carbonos o en aceite de oliva. La ruta biosintética de PHA en *A. caviae* procede a partir de derivados enoil-CoA de la ruta de oxidación de ácidos grasos (figura 6)⁴⁶. Mediante esta ruta el PHA es producido en ausencia de una tiolasa y una reductasa, de manera que utiliza una enoil-CoA hidratasa para la formación del monómero *R*-3-hidroxi a partir de crotonil-CoA o hexenoil-CoA. De esta manera la enoil-CoA hidratasa puede convertir crotonil-CoA, pentenoil CoA y hexenoil en precursores del PHA⁴⁷.

⁴⁵ Moskowitz, G. and Merrick. Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate. Enzymatic synthesis of D-(-)-β-hydroxybutyryl Coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. 1989. Vol. 8. p. 2748-2755.

⁴⁶ Madison, L. and Huisman, G. Op. cit.

⁴⁷ Fukui, T. and Doi. Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. 1998. Vol 180. p. 667-673.

Figura 6. Biosíntesis de PHA con una enoil-CoA hidratasa en *Aeromonas caviae*

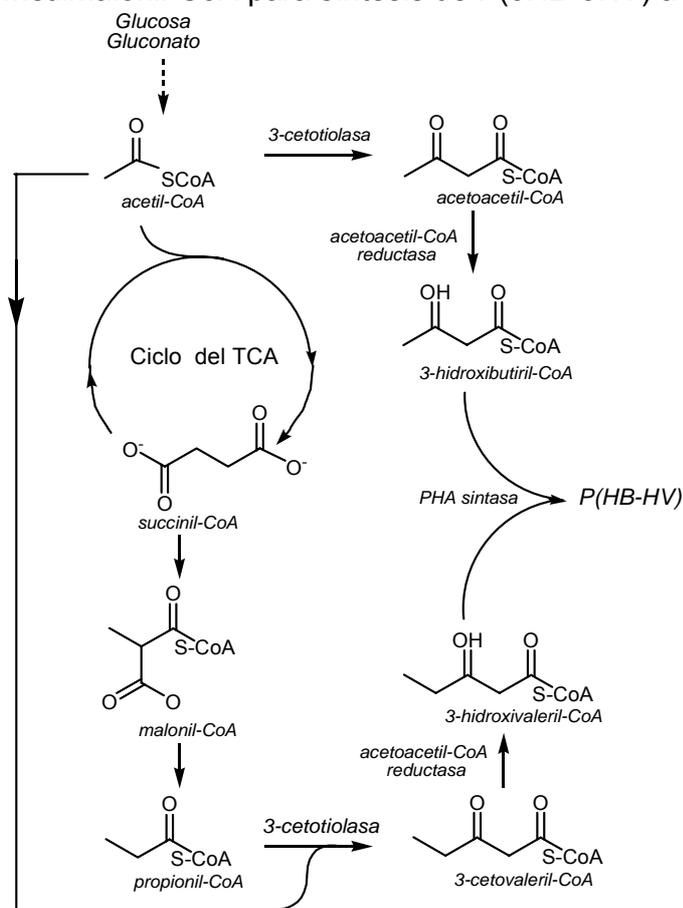


2.4.3. Ruta de la metilmalonil-CoA para la síntesis de P(3HB-3HV) a partir de azúcares. Algunos microorganismos acumulan P(3HB-3HV) a partir de azúcares por la ruta metilmalonil-CoA, como es el caso de *Rhodococcus ruber*, la cual a diferencia de *Ralstonia eutropha* sintetiza la fracción 3HV del copolímero en ausencia de los precursores típicos como propionato o valerato⁴⁸, de tal manera que el copolímero es sintetizado a partir de la acetil-CoA y la propionil-CoA donde la última es producto de la ruta metilmalonil-CoA. En esta ruta la succinil-CoA en el ciclo TCA se convierte a metilmalonil-CoA, la cual es descarboxilada a propionil-CoA, luego la propionil-CoA y la acetil-CoA son convertidas a P(3HB-3HV) por las enzimas típicas, (tiolasa, reductasa y polimerasa) como se observa en la figura 7⁴⁹.

⁴⁸ Anderson, A. J. The production of polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. 1990. Vol. 186. p. 119–129.

⁴⁹ Williams, D. R. Production of a co-polyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid by *Rhodococcus ruber*, biosynthetic considerations. 1994. Vol. 40. p. 717–723.

Figura 7. Ruta metilmalonil-CoA para síntesis de P(3HB-3HV) a partir de azucares



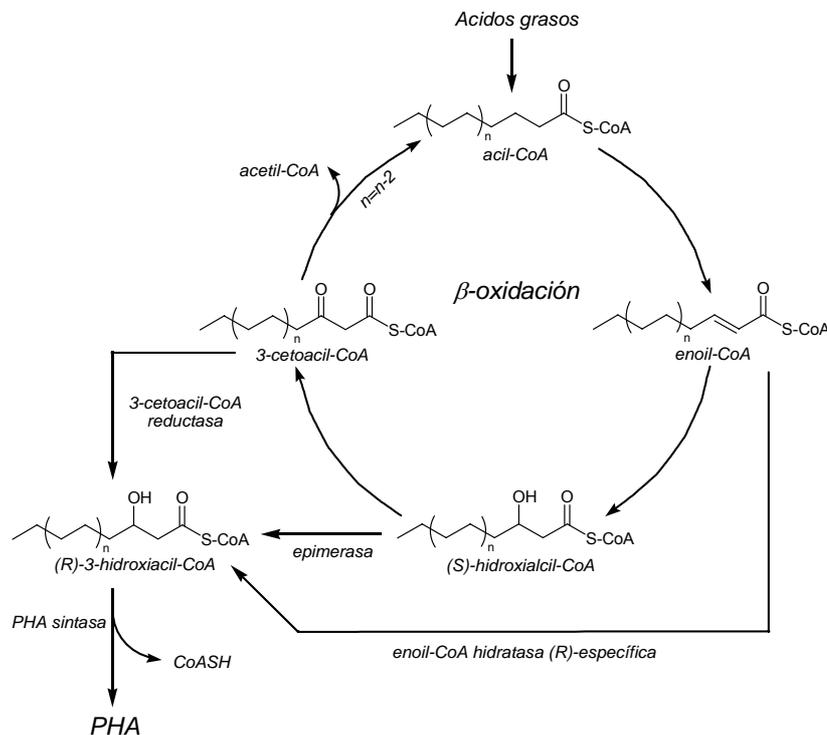
2.4.4. Biosíntesis de PHA_(MCL) a partir de ácidos grasos en *Pseudomonas*. Los PHAs_(MCL) formados por pseudomonas pertenecientes al grupo I de homología de ARN ribosomal están directamente relacionados a la estructura de mcl-alcanos, alquenos, alcoholes o ácidos grasos que son utilizados como fuente de carbono. Por ejemplo, *Pseudomonas oleovorans* acumula un poliéster que contiene 3-hidroxiocatonato como principal constituyente (alrededor de un 90%) cuando crece en octanoato o ácido octanóico⁵⁰.

En el genero pseudomonas, los intermedios del ciclo de la β -oxidación de ácidos grasos son utilizados como precursores para la síntesis de PHA (figura 8). En esta ruta, los ácidos grasos son degradados de tal forma que se remueven unidades de

⁵⁰ Brandl, H., Fuller, R. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(b-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. 1988. Vol. 54. p. 1977–1982..

carbonos como acetyl-CoA, para formar acil-CoA, la cual es oxidada hasta 3-cetoacil-CoA via intermedios 3-hidroxiacil-CoA⁵¹.

Figura 8. Biosíntesis de PHAs_(MCL) a partir de ácidos grasos en *pseudomonas*



La especificidad por el sustrato de la mcl-PHA sintasa varía entre hidroxialcanoil-CoAs de 6 a 14 átomos de carbono, con la preferencia por monómeros de 8, 9 y 10 carbonos. A pesar de que el intermedio de la β -oxidación es el (S)-hidroxialcil-CoA, para la síntesis de PHA la forma (S) necesita ser convertida a (R)-3-hidroxialcil-CoA, este precursor de PHA puede ser el producto de una reacción catalizada por una hidratasa, por una epimerasa o por una 3-cetoacil-CoA reductasa específica, pero aun el mecanismo es desconocido. Luego por la acción de una PHA polimerasa es convertido a PHA⁵²

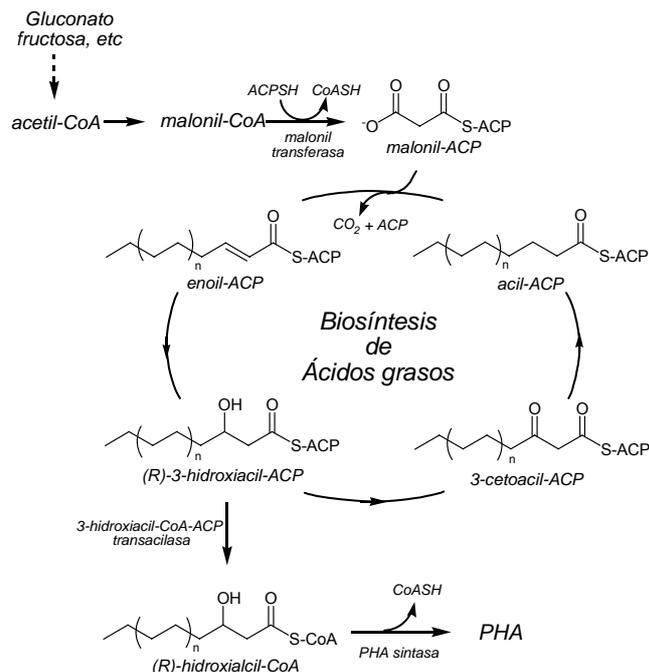
2.4.5. Biosíntesis de PHAs_(MCL) a partir de carbohidratos en *Pseudomonas*. La mayoría de las pseudomonas que pertenecen al grupo I de homología del ARN ribosomal como *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. Marginalis*, entre otras pueden

⁵¹ Lageveen, R. G. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3-hydroxyalkenoates. 1988. Vol. 54. p. 2924–2932.

⁵² Du, G. and Yu, J. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*. mcl-poly-3-hydroxyalkanoates) synthesis versus oxidation. 2002. Vol 38. p. 325-332.

además sintetizar PHAs_(MCL) a partir de fuentes de carbono no relacionadas como carbohidratos: gluconato, fructosa, acetato, glicerol y lactato, los cuales son metabolizados hasta acetil-CoA. Los PHAs producidos por este tipo de bacterias, principalmente copoliésteres, contienen 3-hidroxidecanoato como monómero predominante⁵³.

Figura 9. Biosíntesis de PHAs_(MCL) a partir de carbohidratos en *pseudomonas*



En esta ruta, los monómeros 3-hidroxiacil se derivan de la vía general de la biosíntesis de ácidos grasos, como se muestra en la figura 9. Los intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos que están en la forma (*R*)-3-hidroxiacil-proteína portadora de acilo ((*R*)-3-hidroxiacil-ACP) necesitan ser convertidos a la forma (*R*)-3-hidroxiacil-CoA para su incorporación en el PHA, esto se logra por la acción de la 3-hidroxiacil-CoA-ACP transacilasa⁵⁴.

2.5. SUSTRATOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs

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

⁵³ Timm, A., and A. Steinbüchel. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *pseudomonas*. 1990. Vol. 56. p. 3360–3367.

⁵⁴ Rehm, B., Krüger, and Steinbüchel., A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. 1998. Vol. 273. p. 24044–24051.

carbono, nitrógeno, fosfatos, sulfatos, magnesio y potasio en los diferentes medios de cultivo empleados⁵⁵.

2.5.1. Sustratos carbonados. Existen diferentes tipos de PHAs que pueden ser producidos dependiendo del sustrato carbonado en el cual crezcan los microorganismos. Estos sustratos se han clasificado en 2 grupos: sustratos relacionados y sustratos no relacionados, los cuales deben estar acondicionados con los requerimientos necesarios para la síntesis de PHA como las sales minerales, los fosfatos, agua, entre otros.⁵⁶

Los sustratos relacionados son aquellos cuyo esqueleto carbonado está relacionado con la estructura de las unidades monoméricas constituyentes de los PHAs, dentro de los cuales se encuentran los n-alcoholes (metanol, octanol, decanol, etanol), -n-alcanos (hexano, octano, metano, decano, heptano), -n-alcanoicos (propionato, hexanoato, octanoato, 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. Por ejemplo en *R. eutropha* se han detectado monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, mientras que en *P. oleovorans*, se han encontrado monómeros de 6 a 14. Esto demuestra la existencia de dos tipos de PHA polimerasa en estos microorganismos, dependientes de sustratos de cadena corta y larga, respectivamente⁵⁷.

Los sustratos no relacionados como su nombre lo indica no tienen ninguna relación con los monómeros del polímero, es decir son aquellos derivados de productos agrícolas, como las azúcares (fructosa, glucosa, etc)

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. Por ejemplo estudios realizados con una cepa de *Azotobacter* sp. aislada de muestras de suelo han demostrado que es capaz de utilizar sacarosa o melazas de caña para producir PHB⁵⁸.

2.5.2. Magnesio. Es esencial para el crecimiento y funcionamiento celular y parece tener los mejores papeles, principalmente en la preservación de la integridad de

⁵⁵ Storey, F. R. Synthesis and fabrication of completely absorbable composites for biomaterials. 1991. p. 123-214.

⁵⁶ Yu, H. et al. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch cultura of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. 1997. p. 28-32

⁵⁷ Green, P., et al. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acids β -oxidación inhibited *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol. 133. N° 43. p. 4-7

⁵⁸ De Almeida, A , Ruiz, J. A. Bioplásticos una alternativa ecológica. 2004. N° 3. p. 1-10

los ribosomas, como parte de un mecanismo de control para la permeabilidad de membrana celular y como cofactor en varias reacciones enzimáticas⁵⁹. Se ha demostrado que el magnesio juega un papel importante en la producción de PHA, por ejemplo cuando *P. Aeruginosa* se cultivó en un medio con Mg⁺ la producción de PHB aumentó, mientras que en condiciones limitadas de Mg⁺ se obtuvieron rendimientos muy bajos⁶⁰.

2.5.3. 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 fosfatos⁶¹. En *Acinetobacter sp.* la biosíntesis de PHB es estimulada por bajas concentraciones de fosfato. Esto se debe a que los genes involucrados en la biosíntesis de PHB se activan transcripcionalmente bajo estas condiciones^{62,63}.

2.5.4. Nitrógeno. El nitrógeno en pequeñas proporciones en el medio de cultivo favorece la biosíntesis de PHAs, ya que al producirse un desbalance nutricional la síntesis de proteínas y el metabolismo celular se ven impedidos. Para obtener una mayor producción de PHA se debe escoger una fuente de nitrógeno adecuada, por ejemplo en el caso de *B. subtilis*, después de un estudio con diferentes fuentes de nitrógeno se encontró que cuando se agregó peptona proteasa al medio de cultivo en una proporción del 2% se obtuvo un porcentaje de rendimiento bastante alto de PHB con relación a las otras fuentes de nitrógeno ensayadas⁶⁴.

2.5.5. Sales inorgánicas. Las sales son un factor determinante en el crecimiento de cepas productoras de PHA. Según estudios realizados con bacterias aisladas de un ecosistema marino, se determinó la influencia de las sales en un medio compuesto por nutrientes en agua destilada y en agua de mar natural a la cual se le adicionó nutrientes. Las bacterias marinas crecen bien en concentraciones de NaCl entre 2.5% y 4%, la concentración promedio de sal en el mar es de 3.5%,

⁵⁹ Steinbuchel, A., Valentin, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiol. Lett. Vol 128. P. 219–228. 1995

⁶⁰ Barbuzzi, T., et al. Microbial Synthesis of Poly(3-Hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from Fatty Acids: Identification of Higher Monomer Units and Structural Characterization. Biomacromolecules. 2004. Vol. 10. P. 35-41.

⁶¹ Asenjo, J. A. et. al. Op cit

⁶² Schembri, M., A., et al. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. J. Bacteriol. 1995. Vol. 177. p. 4501-4507.

⁶³ Yüksekdağ Z., et al. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. 2004. Vol. 3. N° 1. p. 63-66.

⁶⁴ Lee, S. Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. TIBCH. Vol. 14. p. 431-438. 1996.

concentraciones que son garantizadas en el medio de cultivo con agua de mar natural. Estas condiciones favorecieron un incremento en la síntesis de biopolímeros⁶⁵.

2.5.6. Agua. Es un nutriente muy importante ya que sin ella las bacterias no pueden completar su ciclo de vida. Si las bacterias no disponen de agua es posible que den lugar a formas de resistencia y esporular, viviendo así de forma latente⁶⁶.

2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA SÍNTESIS DE PHA Y SU COMPOSICIÓN

2.6.1. Sustrato de alimento y condiciones de crecimiento. Se ha considerado que la composición del copolímero, es decir, porcentaje de HB (%HB) y porcentaje de HV (%HV), es influenciado principalmente por el sustrato usado. De manera que cuando un ácido alcanóico de longitud de cadena par es usado como sustrato, el polímero producido por *R. eutropha* es el homopolímero PHB, mientras que cuando se usa un sustrato de longitud de cadena impar este microorganismo produce el copolímero PHB-PHV, lo cual también sucede cuando se usa glucosa o fructosa. La concentración del sustrato proporcionado también afecta la cantidad de polímero. Por ejemplo, cuando ácido propiónico es usado como única fuente de carbono en *R. eutropha* se produce un alto contenido de PHA de un 56% a una concentración de ácido propiónico de 14g/L, mientras que un bajo contenido de PHA de un 12% se obtiene cuando la concentración de ácido propiónico es de 2g/L⁶⁷.

Así mismo, la estructura y la composición de PHA, como las propiedades físicas y térmicas pueden ser controladas por la composición y concentración de los sustratos, por ejemplo se ha estudiado la producción de PHA por *R. eutropha* usando varios tipos de sustratos; el copolímero 3-hidroxi butirato-3-hidroxi propionato (3HB-3HP) se obtiene cuando se usa ácido 3-hidroxi propiónico, 1,5-pentanodiol, 1,7-heptanodiol o 1,9-nonanodiol como fuente de carbono; el copolímero 3-hidroxi butirato-4-hidroxi butirato (3HB-4HB) se obtiene a partir de ácido 4-hidroxi butírico, γ -butirolactona, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, 1,8-octanodiol, 1,10-decanodiol, o 1,12-dodecanodiol y el copolímero 3-hidroxi butirato-3-hidroxi valerato (3-HB-3HV) se obtiene a partir de ácido propiónico o pentanóico. Por otro lado, se ha encontrado que la velocidad de degradación aumenta cuando en el copolímero están presentes las unidades 3HB y 4HB mientras que la

⁶⁵ Carballo, M., et al. Evaluación de la producción de polihidroxi alcanoatos por cepas bacterianas marinas. 2003. Vol. 17. N° 1. p. 36-42.

⁶⁶ Witholt, B. Bacterial Nutrition [online] "sine loco": s.n. [cited on January 2004]. p. 2-8. Available from internet: <www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/Capitulo09/capitulo09.pdf>

⁶⁷ Shimizu, H. Control of Molecular Weight Distribution and Mole Fraction in Poly(-D(-)-3-hydroxyalkanoates) (PHA) Production by *Alcaligenes eutrophus*. 1994, 365-372.

presencia de las unidades 3HV en el copolímero reduce la velocidad de degradación⁶⁸.

De igual forma que los sustratos utilizados, las condiciones de crecimiento como pH y temperatura, son factores muy importantes que afectan tanto la producción de biomasa como la de PHA.

El pH es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo sólo puede crecer en un rango estrecho de pH fuera del cual mueren rápidamente, así las condiciones altamente ácidas o alcalinas tienden a inhibir muchas bacterias comunes, ya que el pH óptimo de la mayoría de las especies es cercano a la neutralidad. A nivel interno la regulación del pH de los microorganismos se realiza mediante un sistema de transporte de protones localizado en la membrana citoplasmática que básicamente es una bomba de protones ATP-dependiente⁶⁹. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplasmática. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 7.0⁷⁰.

Azospirillum brasilense por ejemplo crece bien y acumula PHB a valores de pH cercanos a la neutralidad. En esta cepa se obtuvo un rendimiento máximo a pH 6,8 para una tasa de crecimiento de 1,67 g/L sin embargo el crecimiento y el rendimiento no muestran estar marcadamente influenciados por el pH por lo tanto este factor no influye decisivamente en la respuesta productiva de esta cepa⁷¹. Por otro lado, en estudios realizados por Shimizu (1994) en *R. eutropha* se encontró que para la producción de PHB a partir de ácido butírico las condiciones óptimas fueron 3g/L de ácido butírico, un pH de 8.0 y una temperatura de 30°C obteniéndose un 75% de PHB. Cuando el pH se mantuvo constante y se variaron las concentraciones del sustrato a 0.03, 0.3 y 1.0g/L, el contenido de PHB fue de 44%, 55% y 63% respectivamente, luego al mantener constante la concentración de sustrato y variar el pH a 6.9 y 7.5 se obtuvo un contenido del 53% y 58% respectivamente⁷².

Se ha encontrado que mutantes de *Sphaerotilus natans*, habitantes típicas de lodos activos, por ser tolerantes a altas concentraciones de propionato en el medio de cultivo son capaces de producir el copolímero (3HB-3HV) de manera que el contenido de 3HV y la concentración final del PHA acumulado son dependientes

⁶⁸ Yu, J. Production of PHA from starch wastewater via organic acids. 2001. Vol. 86. p. 105-112.

⁶⁹ Baath, E. Adaptation of Soil Bacterial Communities to Prevailing pH in Different Soils. 1996. p. 227-237.

⁷⁰ Madigan, M., et al. Brock Microbiología de los Microorganismos. 10ª edición. p. 158-159

⁷¹ Martínez J. et al. Influencia de la aereación en la síntesis de poli-hidroxibutirato en *azospirillum brasilense* cepa 7. 2004. Vol. 18. N°1. p. 14-15

⁷² Shimizu, H. Op. cit

del pH, en consecuencia, la fracción 3HV varía de 15 a 43% entre valores de pH de 7.3 y 5.9, estableciendo así un medio de control de la composición del PHA en esta bacteria⁷³.

Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento tiende a bajar durante el cultivo. Por otra parte, el decrecimiento del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores⁷⁴.

La temperatura es otro factor importante que afecta el crecimiento y producción de PHA debido a que cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada a la cual las enzimas que participan en las reacciones metabólicas actúan eficazmente. Si se tiene en cuenta la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura del medio de cultivo en los microorganismos se puede observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. A temperaturas muy bajas la membrana celular también se ve muy afectada debido a que hay un cambio de estado de los lípidos que la componen de modo que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular, mientras que la muerte a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de las proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas⁷⁵.

Como la temperatura afecta la composición de los ácidos grasos de las membranas bacterianas debido a que este factor influye en las actividades enzimáticas de la biosíntesis de ácidos grasos, también ha sido estudiada la composición de PHA en relación a la temperatura de crecimiento. Por ejemplo, cuando Hori (1994) examinó el efecto de varios parámetros fisiológicos en la producción de PHA por *Pseudomonas putida* concluyó que la velocidad de formación de PHA es alta a una temperatura de 30°C con una concentración de octanoato de 3.5Mm y un pH de 7.8. La masa molecular del PHA no se afecta mientras dura el proceso de fermentación, pero a una temperatura más baja (15°C) y una concentración de octano más baja (1.5mM) se obtiene un PHA con una masa molecular doblemente alta (2.4×10^5 Da)⁷⁶. En *Protomonas extorquens* sp. también se estudió el efecto de factores fisiológicos encontrándose que cuando se varía drásticamente la temperatura de crecimiento y el pH respecto a las condiciones óptimas (30°C y pH 7), el peso molecular del PHB producido por

⁷³ Takeda, M., et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a mutant of *Sphaerotilus natans*. 1995. Vol.44. p.37- 42

⁷⁴ Madigan, M., et al. Op. cit. p. 158-159

⁷⁵ Madigan, M., et al. Op. cit. p. 151-152

⁷⁶ Hori, K., et al Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. 1994. Vol. 16. p. 709-714.

esta bacteria es significativamente alto. Sin embargo, bajo dichas condiciones se reduce el rendimiento de producción de PHB⁷⁷.

Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular se vuelve lento y las células paran de crecer; aunque no tienen porqué morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división⁷⁸.

2.6.2. Cepa bacteriana. Desde el punto de vista industrial *Alcaligenes eutrophus* es el organismo escogido por la Imperial Chemical Industries (ICI), porque produce un PHA fácilmente extraíble y con alto peso molecular. Esta cepa produce un 70-80% de polímero bajo condiciones limitadas de fosfato, el copolímero (3HB-co-3HV) es producido cuando la mezcla de glucosa y ácido propiónico es usada como sustrato de alimento⁷⁹. Además se ha reportado que controlando la concentración de glucosa y propionato en el medio de cultivo se consigue modificar la composición del copolímero⁸⁰. Por otra parte, Yamane *et al.* (1996) estudio la producción de PHB por *Alcaligenes latus* usando sacarosa como sustrato y obtuvo una alta concentración celular (142g/L) en un corto tiempo de incubación (18 horas) y un contenido de PHB del 50%. Del mismo modo cuando *R. eutropha* es alimentada con glucosa e incubada por 30 horas también se obtiene una alta concentración celular (122g/L) y una alta producción de PHB (65%). El peso molecular promedio del PHA obtenido en ambos estudios fue de 3.16×10^5 Da⁸¹. *Azotobacter vinelandii* también ha sido estudiado por su capacidad de producir PHA, sin embargo Page (1992) afirmó que no puede considerarse para la producción comercial porque produce bajos rendimientos de PHA⁸². Del mismo modo especies de *Methilotrofos* han sido investigadas y también se han obtenido bajos rendimientos y PHA de bajo peso molecular, además PHA producido es difícilmente extraíble⁸³.

En general se han reportado varios tipos de bacterias capaces de producir PHAs con diferentes composiciones de PHB/PHV y diferentes rendimientos ya que cada una se comporta diferente cuando crecen en un mismo sustrato. Debido a esto

⁷⁷ Suzuki, T., et al. Control of molecular weight of poly-b-hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. 1988. Vol. 27. p. 487-491.

⁷⁸ Madigan, M., et al. Op. cit. p. 151-152

⁷⁹ Byrom D. Production of Poly-β-hydroxybutyrate: Poly-β-hydroxyvalerate copolymers. 1992, Rev. 103. p.247-250.

⁸⁰ Silva C., Steinbüchel, A. Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate-Producing Strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and Analysis of a Mutant Accumulating a Copolyester with Higher 3-Hydroxyvalerate Content. Vol. 68. p. 271-279.

⁸¹ Yamane, T., Fukunaga, M., and Lee, Y. W. Increase PHB productivity by High-Cell-Density Fed-batch Culture of *Alcaligenes latus*, a Growth-Associated PHB Producer. 1996. Vol. 50. p. 197-202.

⁸² Page, W. J. Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* Strain UWD in Beet Molasses Culture. 1992. Vol. 103. p. 149-158.

⁸³ Byrom D. Op. cit.

son pocas las cepas bacterianas utilizadas a nivel industrial porque no todas tienen la habilidad de producir altos rendimientos de PHA sobre todo en sustratos económicos.

2.7. MÉTODOS PARA LA RECUPERACIÓN DEL PHA

Los métodos de recuperación o extracción del polímero son uno de los factores que contribuyen al costo global de la producción de los PHAs, es por eso que se han investigado y estudiado diferentes procesos de recuperación del polímero con el propósito de encontrar una manera más económica para aislarlo y purificarlo⁸⁴.

La mayoría de los métodos de recuperación de PHAs reportados, son para el PHB. Dentro de estos métodos esta la extracción con solventes, digestión con hipoclorito de sodio y digestión enzimática

2.7.1. Extracción con solventes. Los PHAs son solubles en solventes como cloroformo, cloruro de metilo o 1,2 dicloroetano. Estos 3 solventes pueden usarse para extraer el polímero a partir de la biomasa, sin embargo, es usado a nivel industrial, pero son técnicas comunes de laboratorio para la recuperación de PHAs⁸⁵.

Doi (1990) describe un método de extracción con cloroformo en soxhlet durante 1 hora luego el PHA extraído es separado de los lípidos por precipitación con dietil eter, hexano, metanol o etanol. Finalmente el polímero es nuevamente disuelto en cloroformo y posteriormente purificado por precipitación con hexano⁸⁶.

Ramsay y colaboradores (1994) examinaron la recuperación de PHA con 3 solventes clorados diferentes (cloroformo, cloruro de metilo y 1,2-dicloroetano) y obtuvieron la mejor extracción y purificación cuando la biomasa se trató previamente con acetona. El tiempo óptimo de digestión para todos 3 solventes fue de 15 minutos. Las temperaturas para cada solvente fueron 61, 40 y 83°C respectivamente. Después de este procedimiento se llegó a la conclusión de que estas condiciones de extracción tienen un gran impacto sobre la degradación del PHA durante el proceso de extracción⁸⁷.

⁸⁴ Braunegg, G. et al. Op cit.

⁸⁵ Ramsay, J. Separation of PHA from microbial biomass and its intracellular and extracellular biodegradation. *Memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 2000.

⁸⁶ Doi, Y. *Microbial Polyesters*. 1990.

⁸⁷ Ramsay, J. A., et al. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. 1994. Vol. 8. p. 589-594.

Holmes y Lim (1990) señalaron que una desventaja de utilizar extracción directa con solventes es que la alta viscosidad de la solución que contiene el PHA impide eliminar los residuos de biomasa⁸⁸.

2.7.2. Digestión con hipoclorito de sodio. El hipoclorito de sodio solubiliza materiales celulares y deja intacto el PHA, de manera que este puede ser separado de la solución por centrifugación. Sin embargo, el hipoclorito causa una disminución en el peso molecular del polímero, lo cual se debe a que es un oxidante fuerte, por lo tanto se debe tener cuidado al seleccionar las condiciones apropiadas para realizar la digestión, con el fin de mantener un alto peso molecular del polímero⁸⁹. Para evitar este problema Kwang *et al.* (1994) y Hahn *et al.* (1995) han usado dispersiones de hipoclorito-cloroformo donde se busca que el hipoclorito libere el polímero mediante la digestión de la membrana celular y demás organelos celulares y el cloroformo solubilice los gránulos liberados protegiéndolos de la acción degradativa del hipoclorito⁹⁰.

2.7.3. Digestión enzimática. Los pasos de este proceso incluyen un tratamiento térmico (100-150°C) para romper las células y desnaturalizar los ácidos nucleicos, una digestión enzimática y un lavado aniónico para solubilizar los materiales celulares para finalmente concentrar el PHA por centrifugación y blanquearlo con peróxido de hidrógeno.

De acuerdo a Steinbuchel (1996), las enzimas utilizadas durante la digestión enzimática son: lisozima, posfolipasa, lecitinasa, proteinasa alcalasa entre otras. Estas enzimas combinadas con agentes que poseen actividad superficial hidrolizan la mayoría de los materiales celulares mientras que el PHA permanece intacto⁹¹.

Fidler y Dennis (1992) investigaron un sistema para extraer los gránulos de PHB a partir de *E. coli* por la acción de una lisozima. Esta penetra y rompe la célula ocasionando la liberación de los gránulos de PHB. En este sistema se usó un plásmido separado y expresado en un bajo nivel a lo largo del ciclo celular. Al final de la fase de acumulación, las células son sembradas y resuspendidas en un agente quelante, etilendiaminatetraacetato. Esto activa la lisozima y de esta manera rompe la estructura celular y libera los gránulos de PHA al tiempo en que la acumulación de PHA es máxima⁹².

⁸⁸ Holmes, P.A. and Lim, G.B. 1990. U.S. Patent 4,910,145

⁸⁹ Hahn, S.K.; Chang, Y.K.; Lee, S.Y. Op. cit

⁹⁰ Kwang, S., Chang, Y. Optimization of Microbial Poly (3-hydroxybutyrate) recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. 1994. Vol. 44. No 2. p. 256-261

⁹¹ Steinbuchel, A. PHB and Other Polyhydroxyalkanoic Acids. 1996. p. 403-464.

⁹² Fidler, S. and Dennis, D. Polyhydroxyalkanoate Production in Recombinant *Escherichia coli*. 1992. Vol. 103. p. 231-236.

2.8. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PHAs

Debido a que no todas las bacterias producen PHAs se han desarrollado diferentes técnicas para detectar y cuantificar los PHAs producidos por microorganismos. Estas técnicas han sido de gran ayuda para el estudio de los diferentes polímeros sintetizados por bacterias y para el estudio de las mismas.

2.8.1. Métodos de identificación. Estos métodos permiten detectar la presencia de PHA dentro de las células bacterianas para luego realizar un tamizaje cualitativo. Entre estos métodos se encuentran:

2.8.1.1. Microscopía. Preparaciones convencionales de microscopía óptica, electrónica y tratamiento de imágenes han sido utilizadas con el fin de estudiar la ultraestructura del PHB y compuestos con él relacionados, brindando información valiosa referente a los aspectos citológicos del polímero como: dimensión, localización dentro de la célula en varios estadios fisiológicos y condiciones de cultivo⁹³. El estado amorfo de los gránulos de PHA nativos se ha sugerido de los resultados, a partir de la cinética de cristalización muy lenta de pequeñas partículas. Los bajos niveles de PHB detectados en muestras naturales, no constituyen un indicador confiable de la pérdida de información genética para la síntesis de PHB en las comunidades bacterianas naturales. Esto se debe a que en períodos de inanición dichos niveles cambian drásticamente cuando el PHB es degradado⁹⁴.

Las técnicas de microscopía crioelectrónicas son apropiadas para una descripción confiable de la estructura, sin embargo, 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 copolímero⁹⁵.

2.8.1.2. Tinciones y fluorescencias. Las inclusiones o gránulos de PHA se pueden reconocer gracias a su afinidad por los colorantes como, Azul Nilo, Rojo Nilo y Sudán Negro.

El Azul Nilo es una oxazina básica, la cual es soluble en agua y etanol. Su forma oxidada, el Rojo Nilo (oxazona), se forma por la oxidación espontánea del Azul Nilo en solución acuosa o por reflujo del Azul Nilo con ácido sulfúrico diluido. El Rojo Nilo es soluble en lípidos neutros y mezclado con Azul Nilo se puede usar

⁹³ Mayer, F. Structural aspects of poly- β -hydroxybutyrate granules. 1992. p. 265-268.

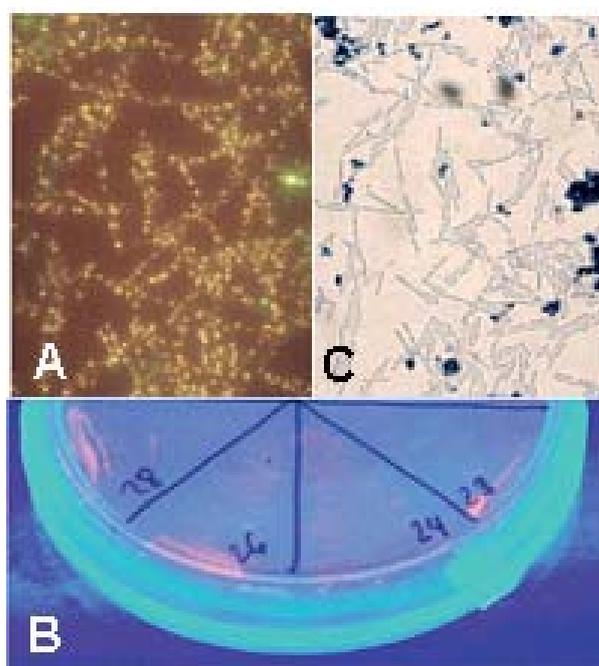
⁹⁴ López, N. I. et al. Op cit.

⁹⁵ Revol, J. F. et. al. High- resolution electron microscopy of poly(β -hydroxybutyrate). 1989. Vol. 30. p. 1973-1976.

como colorante histológico para la diferenciación simultánea de los lípidos ácidos y neutros^{96,97}.

El Azul Nilo al 1% en solución acuosa se utiliza para la tinción de los gránulos de PHA, los cuales al ser examinados en un microscopio equipado con epifluorescencia a 450nm, producen una fluorescencia naranja brillante como se observa en la figura 10a.

Figura 10. Tinciones y fluorescencias: (A) Epifluorescencia del PHA en microorganismos teñidos con Azul Nilo. (B) Fluorescencia de diferentes aislados bacterianos con Rojo Nilo. (C) Tinción de los gránulos de PHA con Sudán Negro⁹⁸



El Rojo Nilo lipofílico generalmente es adicionado al medio para teñir las colonias que almacenen PHA, a una concentración muy baja, de manera que no inhiba el crecimiento celular. La fluorescencia con Rojo Nilo se emite de color rosado de diferentes intensidades cuando son irradiadas con luz UV a 365nm. Estas intensidades dependen de la concentración de PHA ya que el Rojo Nilo es absorbido y acumulado en los gránulos confiriéndole fluorescencia a las células⁹⁹.

⁹⁶ Cain, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipids.1947. Vol. 88. p. 383-392.

⁹⁷ Page, W., and Tenove, J. Quantitation of Poly- β -Hydroxybutirate by Fluorescence of Bacteria and Granules Stained with Nile Blue. Vol. 10. N° 1. p. 215-217.

⁹⁸ Berlanga, M., Montero, T. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. 2006. Vol. 9. p. 95-102.

⁹⁹ Carballo, M. Op. cit.

La tinción con Rojo Nilo permite tanto la identificación de PHA en las células como la cuantificación del polímero en el medio líquido. Sin embargo el Rojo Nilo no puede ser usado para identificar la composición del monómero(s) del PHA acumulado¹⁰⁰. En la figura 10b se puede observar algunas intensidades de fluorescencia de diferentes aislados bacterianos.

El Sudán Negro es otro colorante que tiene gran afinidad por los gránulos de PHA. Es una sustancia liposoluble de manera que se combina con los materiales lipídicos de la célula por eso se usa a menudo para revelar la presencia de PHA. Por lo general para la tinción se utiliza Sudán Negro 0.3% en etanol del 70% y posteriormente se realiza un baño con Safranina acuosa (5%). Es por eso que al observar la tinción al microscopio los gránulos se tiñen de color negro azulado, mientras que las paredes de las células lo hacen de color rosa como se observa en la figura 10c¹⁰¹.

Según Ostle y Holt (1982) el Azul Nilo es un colorante excelente para teñir los gránulos de PHA en las bacterias y es en efecto, superior al Sudán Negro para este propósito ya que el Azul Nilo parece teñir muchos más gránulos de PHA que el Sudán Negro¹⁰².

Mientras estos métodos son utilizados para identificar la presencia de PHA, los análisis químicos son requeridos para determinar la composición de sus monómeros.

2.8.1.3. Hibridación de Colonias. 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 ambientales¹⁰³.

2.8.2. Métodos para el análisis de PHA. Mediante los siguientes métodos se pueden confirmar la presencia de PHA en las bacterias y además se puede determinar la composición y la cantidad de polímero producido.

¹⁰⁰ Gorenflo, V., Steinbüchel, A. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. 1999. Vol. 51. p. 765-772.

¹⁰¹ Burdon, K. L. Fatty Material In Bacteria And Fungi Revealed By Staining Dried, Fixed Slide Preparations . 1946. Vol. 52. p. 665-678.

¹⁰² Ostle, A.G., and J.G. Holt. Op cit.

¹⁰³ López, N. I., et al. Op. cit.

2.8.2.1. Gravimetría. Es un método cuantitativo muy utilizado y consiste en la extracción del PHA de la biomasa liofilizada con cloroformo seguida por una precipitación con dietileter o acetona, sin embargo tiene la dificultad de ser muy lento. Una vez extraído el PHA se puede determinar sus propiedades, como punto de fusión peso molecular, termoplaticidad, empleando además la pirólisis para determinar la composición de los elementos formadores de estos materiales¹⁰⁴.

2.8.2.2. Espectrofotometría. Un método espectrofotométrico fue descrito en 1958 por Williamson y Wilkinson quienes demostraron que bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura todos los materiales celulares excepto el PHB, se disuelven en solución alcalina de hipoclorito de sodio, de manera que se puede determinar la turbidez de la suspensión producida por los gránulos del polímero. Este método es estandarizado por comprobación con el método gravimétrico, pero esta estandarización debe ser cuidadosa para cada organismo y se debe tener en cuenta que solo el polímero puede ser medido¹⁰⁵.

Otro método simple y específico que puede usarse para medir PHB consiste en la extracción del polímero con cloroformo y la posterior hidrólisis y deshidratación del PHB a ácido crotónico mediante el calentamiento con ácido sulfúrico concentrado, luego la muestra es analizada espectrofotométricamente a 235nm (ya que el máximo de absorción ultravioleta del ácido crotónico se da a 235nm cuando esta disuelto en H₂SO₄), contra un blanco de ácido sulfúrico^{106,107}. El inconveniente de este método es que al momento de realizar la extracción con cloroformo, este puede disolver algunas impurezas que pueden interferir en las lecturas de absorbancia¹⁰⁸.

2.8.2.3. Espectroscopía infrarroja (IR). Esta técnica es de gran utilidad en el análisis cualitativo del polímero ya que permite identificar el grupo o grupos funcionales característicos mediante el análisis de las características vibracionales de las moléculas. Los espectros son registrados en el rango de 4000-400cm⁻¹ y las bandas más características que se presentan son las del grupo carbonilo (C=O) con vibración de tensión entre 1750-1730cm⁻¹ y la vibración de tensión asimétrica del grupo C-O-C que se presenta entre el rango de 1300-1000cm⁻¹. Para este tipo de análisis se utilizan técnicas como la fase sólida en pastillas de KBr¹⁰⁹.

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier IR-TF es una técnica química de rutina más avanzada y más sensible, y también es usada para el

¹⁰⁴ Basset, D. C.: Developments in Crystalline, Polymers-2. 1988.

¹⁰⁵ Williamson, D. and Wilkinson J. The isolation and estimation of the poly-3-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. 1958. Vol. 19. p. 198-209.

¹⁰⁶ Law, J. H., and Slepecky.. Assay of poly-phydroxybutyric acid. 1961. Vol. 82. p. 33-36.

¹⁰⁷ Khanna, S., and Srivastava, A. Op. cit

¹⁰⁸ Martinez, J. Op cit. 2003

¹⁰⁹ Rubinson, K., and Rubinson, J. Química Analítica Contemporánea. 1 ed. México: Pearson Education. 2000. p. 434-440.

estudio de la estructura molecular pero cuando se aplica a una colección grande de células microbianas intactas los espectros resultantes reflejan la composición bioquímica total de las células¹¹⁰. Por ejemplo las bandas observadas en un espectro obtenido de bacterias productoras de PHA se deben a los principales componentes celulares como proteínas, lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y PHA. Es por eso que los espectros de IR-FT pueden considerarse como perfiles químicos de una muestra y mediante ellos se puede predecir la cantidad de un analito como el PHB.¹¹¹

Para la cuantificación de PHB por medio de IR-FT, el espectro se calibra con valores de referencia conocidos para el analito, estos valores se determinan por un método establecido, como por ejemplo cromatografía de gases. Gracias al desarrollo de modelos matemáticos estadísticos los espectros se relacionan con las concentraciones del analito. Entre los métodos más comunes que se usan para este propósito son: métodos de regresión del componente principal (RCP) y método de cuadrados mínimos parciales (CMP)¹¹².

La espectroscopia IR-TF, tiene las siguientes ventajas: se requiere de pequeñas cantidades de muestras (~0.4mg de biomasa), es un método rápido (tiempo de análisis 30min), no se requiere de ningún solvente y la manipulación de la muestra es mínima. Por estas razones la espectroscopia IR-TF en combinación con técnicas estadísticas multivariativas es una alternativa prometedora para el análisis de PHB por medios convencionales¹¹³.

Los métodos descritos anteriormente permiten la cuantificación total de PHA pero no individual de los componentes del PHA. Para esto se han desarrollado otros métodos, los cuales se describen en los siguientes epígrafes.

2.8.2.4. Cromatografía de gases (CG) y Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). La cromatografía de gases es un método físico de separación mediante el cual se pueden identificar y cuantificar los componentes individuales del PHA. Este método consiste en una extracción y posterior metanólisis del PHA en condiciones medianamente ácidas (metanol-H₂SO₄) o alcalinas (metanol-KOH) con el fin de formar los metil ésteres del hidroxialcanoato los cuales luego son analizados por CG¹¹⁴. Otro método de CG que se utilizó para incrementar la recuperación de PHA, consiste en llevar a cabo una extracción o una propanólisis

¹¹⁰ Naumann, D. Microbiological characterisation by FTIR spectroscopy. 1991. Vol. 351. p. 81–82.

¹¹¹ Zagreba, J., Savenkov, and M. Ginovska. Ir-spectrophotometric control of chemical composition of microbial biomass, 1990. p. 139–147.

¹¹² Kansiz, M. Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(b-hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. 2000. Vol. 66. p. 3415-3420.

¹¹³ Kansiz, M. Op. cit.

¹¹⁴ Braunegg, G., Sonnleitner, B. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. 1978. Vol. 6. p. 29-37.

simultanea en HCL en lugar de una metanolisis en H₂SO₄, con el fin de obtener los propil esteres¹¹⁵.

La determinación cuantitativa se realiza evaluando las áreas de los picos mediante una calibración de la determinación cromatográfica del PHA para obtener una relación lineal entre el área del pico y la concentración. Para que este método sea mas preciso y reproducible se utiliza un estándar interno, por ejemplo en la determinación del PHB se utiliza ácido benzoico como estándar interno ya que el tiempo de retención del metil ester del ácido benzoico es aproximadamente 2 minutos mas largo que el tiempo de retención del metil ester del ácido 3-hidroxiбутírico¹¹⁶.

La cromatografía de gases es por lo tanto una alternativa muy utilizada para el análisis de PHA porque es un método rápido, sensible, reproducible y requiere de muestras muy pequeñas.

La cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS) es otra alternativa para el análisis de PHA. Esta técnica permite la separación y la identificación simultanea de mezclas volátiles complejas. Los componentes de la mezcla problema son separados, detectados e identificados y los espectros de masa obtenidos indican las masas de las moléculas (o átomos) ionizadas de las muestras y de cualquier fragmento iónico que surja por su descomposición al igual que la abundancia relativa de cada uno. Es por eso que los metil esteres de los 3-hidroxiácidos (obtenidos por metanólisis) que componen el PHA pueden ser identificados y también cuantificados por CG-MS. Los espectros obtenidos muestran el perfil de fragmentación de masas y gracias a ellos se puede averiguar la estructura y composición del polímero teniendo como referencia el espectro de masas de un estándar¹¹⁷.

2.8.2.5. Resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN es la técnica espectroscópica que más información suministra para la determinación de la estructura de un compuesto. Mediante resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) y de carbono trece (RMN ¹³C) se puede determinar con buena aproximación el esqueleto hidrocarbonado de cualquier molécula, es por eso que la RMN es otro método utilizado para el análisis de PHA.

Jan y colaboradores en 1996, describieron un nuevo método para la extracción de PHB y el posterior análisis en su forma polimérica por RMN, mostrando que las suspensiones celulares de *A. eutrophus* en las dispersiones de hipoclorito de

¹¹⁵ Riis, V., Mai, W. Gas chromatographic determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. 1988. Vol. 445. p. 285-289.

¹¹⁶ Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty. Op. cit

¹¹⁷ Saruul P., Srienc, F., Production of a Biodegradable Plastic Polymer, Poly-β-Hydroxybutyrate, in Transgenic Alfalfa. 2002. Vol. 42. p. 919-927.

sodio y cloroformo, conllevan a la disolución y a la migración inmediata del PHB a la fase de cloroformo, evitando una degradación severa del polímero¹¹⁸. Para el análisis por RMN las muestras son tratadas con cloroformo deuterado (CDCl₃) y utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, a partir del cual se reportan los desplazamientos químicos (delta δ expresado en ppm) a una temperatura de 300 °K. Para registrar estos desplazamientos se utilizan espectrofotómetros a frecuencias de 250 MHz (H¹) y 62.9 MHz (C¹³) y tubos para RMN de 5 mm de diámetro¹¹⁹

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C reflejan los desplazamientos químicos de los núcleos a manera de señales. El área bajo la curva de dichas señales sirve para la cuantificación del polímero. Esta área corresponde a la suma de las contribuciones debidas a los protones (¹H) o carbonos (¹³C) y las señales a diferentes frecuencias se deben a los distintos grupos de protones y carbonos magnéticamente equivalentes del HB en el caso del homopolímero (PHB) y de HB y HV para el copolímero poli(HB-HV). Las asignaciones de ¹H y ¹³C pueden ser confirmadas por medio de técnicas bidimensionales como gCOSY (gradiente ¹H, ¹H COSY), 1D TOCSY (¹H Total correlation spectroscopy with selective excitation), gHSQC (¹H, ¹³C gradiente heteronuclear single quantum coherence) y gHMBC (¹H, ¹³C gradiente heteronuclear múltiple bond correlation), las cuales dan información sobre las interacciones H-H y C-H^{120,121}

2.8.3. Otros métodos para el análisis de PHA. Métodos recientes para la cuantificación de PHA incluyen HPLC, cromatografía iónica y determinación enzimática. La HPLC (Ion-exclusión high-pressure liquid chromatography) se basa en la conversión de PHB a ácido crotónico el cual es analizado por HPLC con columna de exclusión iónica y detectado por su absorbancia intensa a 210nm. Esta es una técnica cromatográfica rápida y simple para el análisis de rutina de PHB¹²².

La cromatografía iónica y los métodos enzimáticos se basan en la depolimerización del PHA (conversión de los monómeros a ácidos alcanóicos), lo cual se realiza por digestión propanólica o hidrolítica. La digestión propanólica transforma estequiométricamente el copolímero P(3HB-HV) a 3HB y 3HV. La

¹¹⁸ Jan, S. et. al.: ¹H MNR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass; *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 18: 195-201.

¹¹⁹ Lemos, P., Serafim, L. Metabolic Pathway for Propionate Utilization by Phosphorus-Accumulating Organisms in Activated Sludge: ¹³C Labeling and In Vivo Nuclear Magnetic Resonance. 2003. Vol. 69. Nº 1. p. 241-251.

¹²⁰ Lutke-Eversloh, T., Steinbuchel, A. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfurcontaining polymer with thioester linkages. 2001. Vol. 147. p. 11–19.

¹²¹ Insuasty, B., Zuluaga, F. Análisis Orgánico y Espectral. *Facultad de Ciencias, Universidad del Valle*. 2000. 119-149.

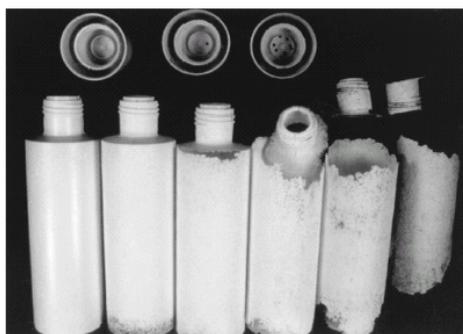
¹²² Karr DB, Waters JK,. Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion highpressure liquid chromatography and UV detection. 1983. Vol. 46. p. 1339–44.

digestión hidrolítica es mas adecuada para la determinación del PHB. Para la cuantificación tanto de 3HB como de 3HV se lleva a cabo por cromatografía de intercambio iónico (IC) con detección de conductividad. Alternativamente el total de 3HB y 3HV se cuantifica usando un Kit de ensayo enzimático comercial y una detección colorimétrica. El 3HB o 3HV es enzimáticamente oxidado y la NADH producida a partir de NAD^+ se reoxida en presencia de cloruro de yodo-nitrotetraoilo para producir formazan, el cual se mide a 492nm¹²³.

2.9. BIODEGRADABILIDAD DE LOS PHAs

Una de las extraordinarias propiedades de los PHA es su biodegradabilidad en diversos ambientes como suelo, agua de mar y agua de lago, estos ambientes han sido evaluados y se ha encontrado que la velocidad de biodegradación (figura 11) esta influenciada por factores como población microbiana, temperatura, nivel de humedad, pH, así como por la composición, cristalinidad, aditivos y área superficial del PHA¹²⁴.

Figura 11. Degradación del P(3HB-3HV) en un ambiente aeróbico (lodo de alcantarilla).



Las botellas fueron incubadas a una temperatura promedio de 20°C. El progreso de la degradación se observa cuando las botellas han sido sometidas a este tratamiento por 0, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas¹²⁵.

El tiempo de degradación de una pieza de PHB por ejemplo, es de unos pocos meses en alcantarillas anaeróbicas y de 2 años en agua de mar. Lee en 1996 también mostró que el P(HB-HV) es completamente degradado después de 6, 75 y 350 semanas en alcantarillas anaeróbicas, tierra y agua de mar respectivamente. Los productos finales de degradación de PHA en ambientes aeróbicos son el dióxido de carbono y agua mientras en condiciones anaerobias además se produce metano^{126,127}

¹²³ Hesselmann, R. Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. 1999. Vol. 35. p. 111–9.

¹²⁴ Khanna, S., and Srivastava, A. Op. cit

¹²⁵ Madison, L and Huisman, G. Op. cit.

¹²⁶ Jendrossek, D., A. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. 1996. Vol. 46. p. 451–463.

Debido a que los PHA son polímeros sólidos de alto peso molecular y es muy difícil que sean transportados a través de la pared celular, varios microorganismos excretan PHA polimerasas que hidrolizan el PHA en oligómeros o monómeros solubles en agua para luego utilizarlos como nutrientes dentro de las células. Entre estos microorganismos se encuentran hongos y bacterias que se han aislado de diferentes ambientes como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Degradación de PHA por microorganismos aislados de diferentes ambientes¹²⁸

Fuente de la cual se aisló el microorganismo	Microorganismo	Referencias
Suelo	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Acidovorax faecalis</i> <i>Comamonas</i> sp. <i>Pseudomonas lemoignei</i> <i>Variovorax paradoxus</i>	Mergaert J. 1993 Mergaert J. 1993 Jendrossek D, 1993 Delafield FP, 1965 Mergaert J. 1993
Lodo activado	<i>A. faecalis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tanio T, 1982 Schirmer A, 1993
Agua de mar	<i>Comamonas testosteroni</i>	Kasuya K, 1994
Agua de Lago	<i>P. stutzeri</i>	Mukai K, 1994
Lodo anaerobico	<i>Ilyobacter delafieldii</i>	Jansen PH, 1990

El polímero sólido PHB es un substrato insoluble en agua mientras que las PHB depolimerasas si son solubles en agua. La degradación enzimática es por consiguiente una reacción heterogénea que comprende 2 pasos: adsorción de la enzima sobre la superficie del material de PHB y la hidrólisis de las cadenas del polímero por un sitio activo de la enzima. El P(3HB-3HV) también es insoluble en agua y no es afectado por la humedad, el proceso de degradación comienza cuando el polímero es enterrado por ejemplo, mientras este en contacto con el aire es totalmente inerte y puede conservarse durante años, de manera que tiene la misma durabilidad que el plástico común¹²⁹.

En la figura 12 se puede observar la ruta de degradación del PHB, la cual inicia por la acción de la PHA depolimerasa para formar ácido *R*-3-hidroxybutírico, luego la NAD-deshidrogenasa específica oxida el ácido a acetoacetato, el cuál es luego convertido a acetoacetyl-CoA, por lo tanto la acetoacetyl-CoA es un intermedio común de la biosíntesis y degradación del PHB¹³⁰.

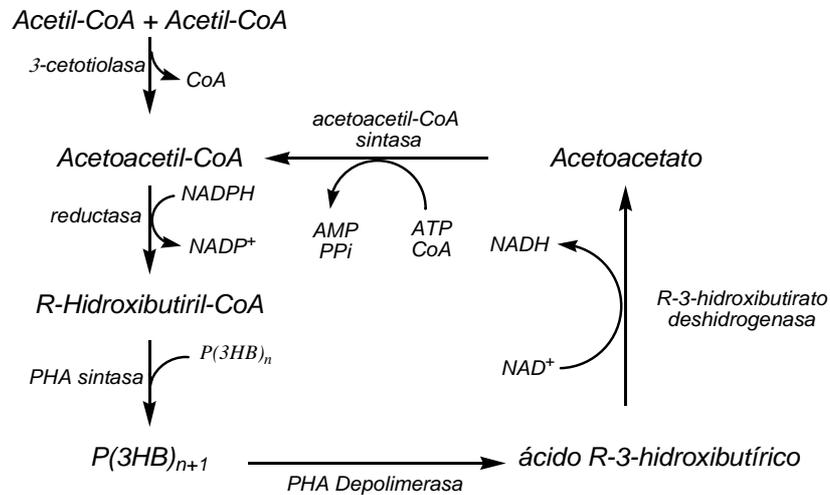
¹²⁷ Lee, S. Op. cit

¹²⁸ Khanna, S., and Srivastava, A. Op. cit

¹²⁹ Mergaert, J. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soil. 1993. Vol. 59. p. 3233-3238.

¹³⁰ Saito Y, Doi Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas aeruginosa* AO-232 from ¹³C-labeled acetate and propionate. 1993. Vol. 15. p. 287-292.

Figura 12. Síntesis y degradación de poli(*R*)- 3-hidroxi-butirato.



2.10. APLICACIONES

Las posibles aplicaciones del PHA bacteriano están directamente relacionadas con sus propiedades, tales como degradabilidad biológica, características termoplásticas y depolimerización a las unidades monoméricas que conforman el polímero. Las aplicaciones de los PHAs han sido concentradas en 3 áreas principales: Médica y farmacéutica, agrícola, y empaques¹³¹.

2.10.1. Aplicaciones médicas y farmacéuticas. (Figura 13a), la biocompatibilidad del P(HB-HV) junto con su degradación hidrolítica lenta hacen de este polímero un potencial en cirugía reconstructiva. Según Lee (1996a) el producto de degradación del PHB, el D(-)-3-hidroxi-butirato es un metabolito intermedio, común en las células animales pero también se ha detectado cantidades relativamente grandes en plasma sanguíneo humano, lo cual reafirma su biocompatibilidad. Los PHAs por ser biocompatibles tienen diversidad de aplicaciones médicas, terapéuticas y farmacéuticas como por ejemplo, pueden ser usados como portadores biodegradables en la dosificación de drogas a largo plazo dentro del cuerpo para construir válvulas para el corazón¹³², para reparar fracturas de huesos estimular su crecimiento¹³³, para fabricar hilos quirúrgicos, para realizar suturas, para elaborar vendajes para heridas y para reemplazos de vasos sanguíneos.

¹³¹ Lee SY.(1996b). Op. cit

¹³² Sodian, R. Early *in vivo* experience with tissue- engineered trileaflet heart valves. 2000. 102(Suppl.3):III22-29.

¹³³ Galego N,. Characterization and application of poly(b-hydroxyalkanoates) family as a composite biomaterials. 2000. Vol. 19. p. 485-492.

La ventaja de usar plásticos biodegradables durante una implantación consiste en que no sería necesaria la remoción quirúrgica debido a su compatibilidad¹³⁴.

Figura 13. Aplicaciones de los PHAs



2.10.2. Aplicaciones agrícolas. (Figura 13b), los PHAs son biodegradables en el suelo, por consiguiente, el uso de los PHAs en el sector agrícola es muy prometedor. Ya que pueden ser usados como: portadores biodegradables en la dosificación a largo plazo de insecticidas, herbicidas o fertilizantes; matriz biodegradable en el suministro de droga en medicina veterinaria, entubado para la irrigación de las cosechas, por consiguiente no es necesario mover los elementos biodegradables al finalizar el tiempo de cosecha¹³⁵.

2.10.3. Empaques biodegradables para productos. (Figura 13c), como el homopolímero PHB y el copolímero P(HB-HV) poseen propiedades como la fuerza de tensión y flexibilidad similares a las del propileno y poliestireno estos pueden ser usados en procesos de separación, moldeo y mezclado con polímeros sintéticos para formar heteropolímeros, además las pequeñas cantidades de PHAs mejoran las propiedades de algunos polímeros convencionales. También los PHAs son usados para hacer películas, láminas y fibras, bolsas y recipientes para

¹³⁴ Scholz, C. Poly(b-hydroxyalkanoates) as potential biomedical materials: an overview. In: (Ed.) Scholz C, Gross RA. 2000. ACS series 764. p. 328-334.

¹³⁵ Lee SY.(1996b). Op. cit

productos cosméticos y farmacéuticos, elementos de disposición como navajas de afeitar y productos femeninos¹³⁶.

¹³⁶ Tsuchikura, K. 'BIOPOL' Properties and Processing. 1994, 362-364.

3. METODOLOGIA

3.1. MICROORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO

Para este estudio se utilizó una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* M17-2, productora del copolímero p(HB-co-HV 95:5). La cual fue seleccionada del banco de cepas existente en el laboratorio de Biotecnología microbiana de la Universidad de Nariño.

El medio de cultivo utilizado para esta bacteria denominado medio basal (MB) se preparó con glucosa, peptona y fosfato ácido de sodio como fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato respectivamente en las concentraciones indicadas en la tabla 4 y se estabilizó a un pH de 6.5.

Tabla 4. Composición del medio basal (MB) empleado para la producción de PHAs con *B. mycoides* M17-2

Nutriente	Fuente	Concentración
Carbono	Glucosa	10g/L
Nitrógeno	Peptona	7.5g/L
Fosfato	NaHPO ₄	0.5g/L

La cepa *B. mycoides* (M17-2) se preservó en perlas de porcelana y en caldo glicerol a -20°C para análisis posteriores¹³⁷. A partir de los tubos preservados se prepararon inóculos para las diferentes fermentaciones.

3.2. EFECTOS DE LA TEMPERATURA y EL pH EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO

3.2.1. Evaluación de la temperatura. Para establecer el efecto producido por la temperatura en la síntesis del polímero se realizó un diseño experimental de bloques al azar con 3 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento. Las condiciones del experimento se observan en la tabla 5.

¹³⁷ Hidalgo, W., Zambrano, J. C. Op. cit

Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación de temperatura en la síntesis del polímero producido por *B. mycooides* en un medio de cultivo MB de pH 6.5

Factor	Tratamientos		
	T1	T2	T3
Temperatura	19°C	30°C	35°C

A partir de las cepas bacterianas preservadas se preparó un preinoculo en medio de cultivo MB (descrito en el epígrafe 3.1) previamente esterilizado el cual se llevó a una densidad óptica de 0.02 de absorbancia medida mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11. Posteriormente para preparar el inóculo, 1 ml de preinoculo se adicionó a 72 ml de medio MB y se incubó a 30°C con agitación constante de 120 rpm por 20 horas, transcurrido este tiempo el inóculo bacteriano se sembró a una concentración del 10% en el medio de fermentación (MB) para cada repetición, luego los medios de cultivo inoculados se incubaron a las temperaturas respectivas y se agitaron a 120rpm.

Superado el tiempo de fermentación se procedió primero a cuantificar la producción de biomasa por gravimetría, mediante una modificación del método estandarizado por Sthal (1996)¹³⁸ y luego a analizar el PHA por cromatografía de gases¹³⁹. Para esto se aplicó el siguiente protocolo: cada caldo fermentado se dividió en dos partes, 10ml para cuantificar peso seco y 50 ml para análisis del polímero. Para cuantificar el peso seco, la biomasa se centrifugó en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de volumen efectivo a 8000rpm durante 3 min, el botón celular se lavó con agua destilada, se seco a 80°C y se pesó en una balanza analítica.¹⁴⁰ Para el análisis del polímero se realizaron los procedimientos que se describen en los epígrafes 3.4.1,y 3.4.3 .

3.2.2. Evaluación del pH. Igualmente para establecer el efecto del pH en la síntesis del polímero y la producción de biomasa se realizó un diseño experimental de bloques al azar con 3 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento. (tabla 6).

Tabla 6. Diseño experimental para la evaluación del pH en la síntesis del polímero producido por *B. mycooides* en un medio de cultivo MB

Factor	Tratamientos		
	T1	T2	T3
pH	6.0	6.5	7.0

¹³⁸ Sthal, P and Klug, M. Characterization And Differentiation Of Filamentous Fungi Basedon Fatty Acid Composition. 1996. Vol. 62. p. 4136-4146.

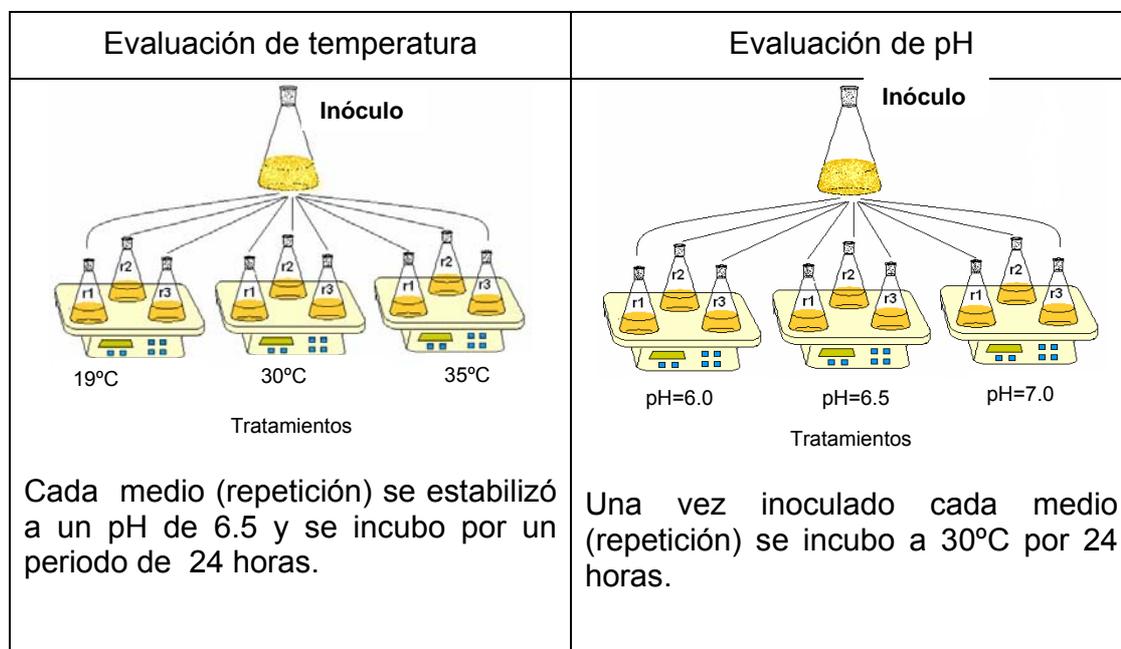
¹³⁹ Braunegg, G., Sonnleitner, B. Lafferty. Op. cit

¹⁴⁰ Fernández, P., et. al. Op.cit.

Para este experimento el preinoculo y el inoculo se prepararon en las mismas condiciones que en el epígrafe 3.2.1 con la diferencia que los tratamientos se incubaron a la temperatura donde se obtuvo la mayor producción de polímero. La cuantificación de peso seco igualmente se llevó a cabo por gravimetría y el análisis del polímero se llevó a cabo mediante los procedimientos que se describen en los epígrafes 3.4.1y 3.4.3.

En la figura 14 se muestra el proceso de inoculación en las repeticiones de cada tratamiento tanto para la evaluación de la temperatura como para la evaluación del pH.

Figura 14. Proceso de inoculación para la evaluación de la temperatura y el pH



3.3. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO

Para evaluar el efecto de diferentes sustratos relacionados como los ácidos grasos de cadena corta en la síntesis del polímero se realizó un diseño experimental de bloques al azar con 3 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento como se muestra en la tabla 7 donde se utilizó ácido butírico¹⁴¹ y ácido propiónico¹⁴², los cuales fueron escogidos por tener estructuras similares a las unidades monoméricas que conforman el copolímero p(HB-co-HV) y porque en otras cepas son precursores

¹⁴¹ Shimizu, H. Op. cit

¹⁴² Doi, Y., Segawa, A., Nakamura, S., and Kunioka, M. Production of biodegradable Copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. 1990. p. 37-48.

de las unidades monoméricas del polímero. El testigo se preparó como referencia para comparar y observar como se afecta el crecimiento y la síntesis del polímero a lo largo de la cinética.

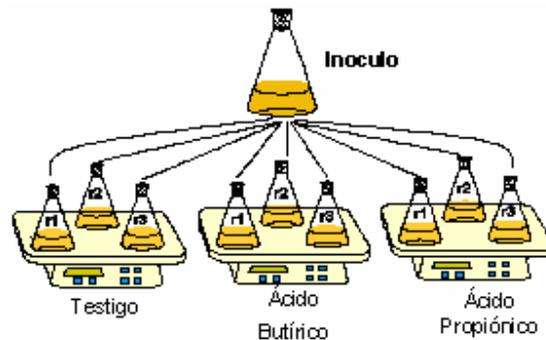
Tabla 7. Diseño experimental para la evaluación los ácidos grasos de cadena corta en la síntesis del polímero producido por *B. mycooides*

Tratamiento	Composición
T1: Testigo	MB
T2: Ácido Butírico	MB + Ácido Butírico (2g/L)
T3: Ácido Propiónico	MB + Ácido Propiónico (2g/L)

En este experimento se preparó un preinoculo y 36 ml de inóculo por tratamiento, bajo las mismas condiciones descritas en el epígrafe 3.2.1 con la diferencia que el medio de cultivo se ajustó a pH 7 y se incubó a 30°C.

3.3.1. Cinética de crecimiento. La cinética de crecimiento se realizó para cada tratamiento de la siguiente manera. Se prepararon 360ml de medio de cultivo MB ajustado a un pH de 7, por repetición de cada tratamiento. El inóculo se sembró a una concentración del 10% en cada medio, luego se incubaron a 30°C y se agitaron a 120rpm.

Figura 15. Proceso de inoculación para evaluar el efecto de los ácidos grasos de cadena corta



Después de las primeras 4 horas de incubación se adicionó 0.28g de ácido butírico o ácido propiónico según el caso, esta operación se repitió con intervalo de 4 horas por 7 veces para un total de 2 g/L del ácido graso (sustrato relacionado) luego se incubó durante 32 horas.

Para determinar el perfil del crecimiento microbiano y la síntesis del polímero cada 4 horas se colectaron 60 ml de los cuales 10 ml se utilizaron para evaluar la

biomasa por gravimetría y el resto para cuantificar el copolímero por cromatografía de gases.

Las variables de respuesta ha evaluar en este experimento fueron: la producción de biomasa (mg/L), la producción de PHA (mg/L) y la relación HB:HV.

Las muestras tomadas para peso seco se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se conservó para la determinación de carbono total que se describe en el epígrafe 4.4. Posteriormente las muestras se lavaron con agua destilada en tubos de microcentrifuga de 1.5ml de volumen efectivo. Los botones celulares obtenidos se secaron a 80°C y luego se pesaron. La extracción y posterior análisis del polímero se describe en la siguiente sección.

3.4. ANALISIS DEL COPOLÍMERO POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDORXIVALERATO)

3.4.1. Extracción del polímero. De cada uno de los caldos con crecimiento celular obtenido en los diferentes experimentos se extrajeron muestras destinadas para análisis del polímero las cuales se centrifugaron a 8000rpm durante 3 minutos y se lavaron con agua destilada en tubos de microcentrifuga de 1.5 de volumen efectivo. Los botones celulares obtenidos se lisaron en hipoclorito de sodio con 5% de cloro libre y EDTA 10mM y se llevaron a baño maría a 30°C por una hora y media. Superado este tiempo los tubos se centrifugaron a 8000rpm por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con agua destilada (desechando el sobrenadante) centrifugando a 8000 rpm por 3 minutos; el sedimento recuperado se purificó con 2 baños sucesivos de acetona y metanol, se centrifugó a 8000rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego el sedimento se lavó con agua destilada y se centrifugó (desechando el sobrenadante). Finalmente el sedimento obtenido se secó a 80°C y se conservó para realizar posteriores procedimientos¹⁴³.

3.4.2. Identificación del polímero por espectroscopia infrarroja (IR). La identificación por IR se realizó para el polímero obtenido en los tratamientos testigo, ácido butírico y ácido propiónico. Una vez finalizada la cinética, de cada tratamiento, se tomaron 50ml del residuo de cada caldo fermentado, a partir de los cuales se extrajo la biomasa por gravimetría (epígrafe 3.2.1) y posteriormente se extrajo el polímero mediante el procedimiento descrito en el epígrafe 3.4.1. Posteriormente, del polímero seco extraído se tomaron 2 mg y se diluyeron con 1 ml de cloroformo anhidro para luego, ser analizados en un espectrofotómetro Perkin Elmer Serie 1600 FTIR usando como fase sólida una pastilla de KBr¹⁴⁴.

¹⁴³ Martinez, J. et al. Op cit

¹⁴⁴ Insuasty, B., Zuluaga, F. Op cit.

3.4.3. Identificación del polímero por cromatografía de gases (CG). Para la identificación del polímero por cromatografía, primero se realizó el proceso de derivatización que consiste en la esterificación de los monómeros que conforman el PHA. Para esto, cada muestra seca del polímero extraído en todos los tratamientos se disolvió en 1 ml de cloroformo (grado cromatográfico), luego se, adicionó 1 ml de agente derivatizante metanol: ácido sulfúrico (15% v/v), mediante esta reacción se forman los respectivos metil ésteres de los ácidos grasos (FAME's) o monómeros que conforman el copolímero. Posteriormente se sometió a reflujo a 90°C en baño María durante 2 horas; superado este tiempo se dejó enfriar y se adicionó 1ml de cloruro de sodio al 0.1% agitando fuertemente en vortex, luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se separó la fase acuosa de la fase orgánica. Finalmente se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, de aquí se utilizaron 0.4µl para inyectar en el cromatógrafo de gases. La identificación de los FAME's contenidos en el copolímero extraído se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención (t_r) con los t_r de los ésteres metílicos obtenidos después de la derivatización de un copolímero patrón de proporción 80:20 de 3-hidroxi butirato y 3-hidroxi valerato respectivamente, adquirido de *BIOMER* (Biodegradable polymers), Krailing, Alemania. El patrón, así como el polímero extraído de las muestras tomadas en cada tratamiento se analizó bajo condiciones cromatográficas ya estandarizadas en el grupo de investigación de Biotecnología Microbiana (BIOMA) de la Universidad de Nariño, en un cromatógrafo de gases *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); gas de arrastre (Helio) 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)¹⁴⁵.

3.4.4. Identificación por CG-MS. Una vez finalizada la cinética en los tratamientos testigo, ácido butírico y ácido propiónico se tomó el residuo de cada caldo fermentado de los tratamientos, se realizó la extracción del polímero, se secó y se pesó 2mg de este para su derivatización según el protocolo descrito en epígrafe 3.4.3. Posteriormente se inyectaron 0.4 µl en un cromatógrafo acoplado a un detector selectivo de masas (GC-MS) *Shimadzu* QP5000/Q5050A, con una biblioteca de espectros de masas WILEY-VCH. Columna DB5-MS (30m x 0.25mm, d.i., 0.25 µm) con fase estacionaria ligeramente polar de 5% fenil poli(dimetilsiloxano). Con programación de temperatura de 60°C (2min) @ 5°C/min hasta 250°C (15min).

3.5. CUANTIFICACIÓN DEL COPOLÍMERO POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO- co-3-HIDROXIVALERATO)

Para la cuantificación del PHA se realizó una curva de calibración con soluciones de concentración conocida del patrón certificado. Se realizaron diluciones seriadas

¹⁴⁵ Hidalgo, W., Zambrano, J. C. Op. cit

a partir de una solución de concentración 1000mg/L. Posteriormente cada solución se derivatizó según el protocolo descrito en el epígrafe 3.4.2, una vez derivatizadas la muestras se tomaron 0.4µmL de cada una para inyectar en el cromatógrafo de gases mediante inyección manual. Con los valores de concentración y las áreas obtenidas de cada pico se construyó la curva de calibración para cada uno de los metil ésteres, los cuales se ajustaron por regresión lineal. Se determinaron los factores de respuesta (Rf) del FID con base en la pendiente obtenida para cada recta (Anexo C) y las concentraciones de 3HB y 3HV en mg/L de suspensión bacteriana se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$Cx = \frac{Ax}{Rfx} \times \frac{Vf}{Vo} \quad \text{Ecuacion 1}^{146}$$

Donde:

Cx = concentración de la muestra problema (mg/L de suspensión bacteriana)

Ax = área cromatográfica del compuesto de interés

Rfx= factor de respuesta del compuesto de referencia

Vf = volumen final del extracto (mL)

Vo = volumen de suspensión bacteriana(mL)

3.6. CUANTIFICACIÓN DE CARBONO TOTAL POR EL METODO DE DUBOIS

La determinación de carbono total se realizó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 11. Primero se realizó una curva de calibración por triplicado con soluciones de glucosa de concentración conocida (Anexo D), a cada solución se le aplico el protocolo descrito por Dubois¹⁴⁷. Mediante esta curva se determinó que la concentración máxima para ser detectada en el espectrofotómetro es de 0.22g/L.

Esta técnica se realizó con el fin de determinar la capacidad de consumo de las fuentes de carbono por parte de la bacteria *B mycoides M17-2*. Para esto se colectó 5ml de sobrenadante de cada repetición de los tratamientos: testigo, ácido butírico y ácido propiónico, posteriormente se diluyeron 100 veces debido a que la concentración inicial de glucosa era de 10g/L. una vez diluidas las muestras se aplicó el procedimiento descrito por Dubois que consiste en adicionar 5ml de ácido tricloroacético frío al 10%, esta es la etapa de desproteización. Posteriormente se deja en reposo por 30min a 4°C, después de este tiempo se centrifuga a 3000 rpm por 10 min, se toma 1ml del sobrenadante y se adiciona 1ml de fenol al 5% y 5ml H₂SO₄ 98%, se deja en reposo 30 min; e inmediatamente se procede a leer cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 489nm.

¹⁴⁶ Allthech Associates . GC. Education. Quantitation Methods In GC. 1998.

¹⁴⁷ Dubois, M., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 1956. Vol. 28. p. 350-356.

3.7. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el procesamiento estadístico de los resultados obtenidos en cada diseño experimental se aplicó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan¹⁴⁸ y así comparar el crecimiento celular y la síntesis del polímero a diferentes valores de temperatura y pH y con los diferentes sustratos relacionados. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los datos se procesaron en el software STATGRAPHICS Plus versión 5.0.

Un esquema general de la metodología se puede observar en el Anexo E

¹⁴⁸ Lerch, G. La experimentación de las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-técnica. La Habana. Capítulo 16: Análisis de Varianza. Clasificación triple. 1977. p. 251-277.

4. RESULTADOS Y ANALISIS

4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO

El efecto de los factores fisicoquímicos en el crecimiento bacteriano y producción de metabolitos ha sido evaluado en diferentes microorganismos^{149,150} y como resultado se ha establecido que el pH y la temperatura influyen en el metabolismo bacteriano^{151,152} en este sentido se ha determinado que la síntesis de polihidroxialcanoatos en cepas como *Alcaligenes eutrophus* H16¹⁵³, *Alcaligenes latus*¹⁵⁴, *P. aeruginosa*¹⁵⁵, *Bacillus subtilis* 25 y *Bacillus megaterium* 12¹⁵⁶, las condiciones óptimas de crecimiento y producción de PHA son: temperatura 30°C y pH 7, mientras que en *P. putida* la mayor producción del polímero se obtiene a 30°C y a un pH de 7.8¹⁵⁷.

Como resultado del diseño experimental para evaluar el efecto del pH y la temperatura en la síntesis del polímero, en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 se obtuvo mayores concentraciones de PHA y biomasa cuando el medio de cultivo se ajustó a un pH de 7 y fue incubado a una temperatura de 30°C. En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos en este experimento, donde se observan la producción de biomasa y PHA en cada tratamiento (temperatura y pH) con su respectiva desviación estándar.

¹⁴⁹ Kessler, B., and B. Witholt. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate 2001. Vol. 86. p. 97–104.

¹⁵⁰ Urakami, T., Yashima, K. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. 1992. Vol. 58. p. 3970-3976.

¹⁵¹ Narendranath, N. V., Power, R. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. 2005. Vol. 71. p. 2239-2243.

¹⁵² Harvey, RW, Mayberry, N. Effect of Growth Conditions and Staining Procedure upon the Subsurface Transport and Attachment Behaviors of a Groundwater Protist. 2002. Vol. 68. p. 1872-1881.

¹⁵³ Huijberts GNM, Van Der Wal, H, Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. 1994. Vol. 8. p. 187-192.

¹⁵⁴ Wang F, Lee SY. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. 1997. Vol. 63. p. 3703–3706.

¹⁵⁵ Timm A. and Steinbuchel A. Op cit.

¹⁵⁶ Yuksekdog, Z.N., Aslim, B. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. 2004. Vol. 3. N° 1. p. 63-66.

¹⁵⁷ Hori, K., K. et al. Op cit.

4.1.1. Evaluación del efecto de la temperatura. Según los datos expuestos en la tabla 8, se puede decir que a medida que se incrementa la temperatura tanto la producción de biomasa como de PHA se incrementa de manera proporcional hasta los 30°C donde se alcanza la mayor producción para las dos variables, sin embargo a temperaturas superiores la producción de biomasa y polímero comienza a decrecer.

Tabla 8. Efecto de la temperatura en la síntesis de biomasa y PHA en la cepa *B.mycooides M17-2* en medio de cultivo MB a pH 6.5

Medio de cultivo a pH 6.5						
TEMPERATURA	19°C		30°C		35°C	
	X	δ	X	δ	X	δ
Biomasa mg/L	296.667	15.275	333.667	50.000	263.333	15.275
PHA mg/L	93.973	11.923	121.487	3.706	25.480	3.827

Según el ANOVA realizado para los datos de biomasa se demuestra que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p=0,0038$) y a través de la prueba Duncan (Anexo A) se estableció que el tratamiento $t= 30^{\circ}\text{C}$ se destacó de los demás por la alta producción de biomasa. Igualmente los datos de PHA obtenidos en cada tratamiento presentan diferencias estadísticas significativas ($P=0.0000$) y del mismo modo se observó que la mayor producción de PHA se da a una temperatura de 30°C (Anexo A).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Borah y Thakur (2002) quienes mostraron que la temperatura a la cual *Bacillus mycooides RLJB-07*¹⁵⁸, produce los máximos valores para biomasa y PHB a una temperatura de 30°C .

Por lo anterior se puede establecer que en la cepa *Bacillus mycooides M17-2* la mayor producción de biomasa y de polímero se produjo a 30°C , esto se debe principalmente a que la temperatura afecta las reacciones enzimáticas de tal manera que si la temperatura se eleva, la velocidad de la reacción aumenta debido al incremento en la energía cinética de las moléculas reactantes. Sin embargo la energía calórica puede también incrementar la energía cinética de la enzima al punto de exceder la barrera energética para romper los enlaces débiles que conservan la estructura tridimensional de la enzima de tal manera que la cadena polipeptídica empieza a desnaturalizarse además de perder rápidamente su actividad catalítica¹⁵⁹, es por eso que para cada organismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no es posible el crecimiento, una

¹⁵⁸ Borah, B., Thakur, P. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Bacillus mycooides RLJ B-017*. 2002. Vol. 92. p. 776–83.

¹⁵⁹ Murray, R., Granner, D. Harper's Illustrated Biochemistry. 26ª Edición. Ed. MacGrawHill. United States of America. 2003. Pag 63-64.

temperatura óptima a la que se produce el crecimiento más rápido, y una temperatura máxima por encima de la cual no es posible el crecimiento¹⁶⁰.

Según lo anterior y como se observa en la tabla 8, se puede decir que cuando *B. mycooides* M17-2 se incuba a 30°C esta cepa produce mayor cantidad de biomasa y polímero porque a esta temperatura las reacciones enzimáticas dentro de las bacterias son más rápidas por lo tanto el crecimiento se acelera. Mientras que a temperaturas inferiores estas reacciones son lentas de manera que la velocidad de crecimiento también es lenta razón por lo cual los valores de producción de biomasa y PHA son menores. Lo mismo sucede a temperaturas superiores a 30°C, a las cuales las enzimas aun sin desnaturalizarse disminuyen su actividad catalítica de tal forma que las reacciones también se vuelven lentas, disminuyendo así la velocidad de crecimiento, obteniéndose valores más bajos de producción de biomasa y PHA.

4.1.2. Evaluación del efecto del pH. En la tabla 9 se puede observar el efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano y la síntesis del polímero, y según el ANOVA para los datos obtenidos en la evaluación del efecto del pH en la producción de biomasa revela que hay diferencias estadísticas significativas ($p=0.0008$) además la prueba Duncan (Anexo A) demostró que el tratamiento que se destaca de los otros es pH=7 .

Tabla 9. Efecto del pH en la síntesis de biomasa y PHA en la cepa *B.mycooides* M17-2 en medio de cultivo MB a 30°C

Medios incubados a 30°C						
pH	pH 6		pH 6.5		pH 7	
	X	$\bar{\delta}$	X	$\bar{\delta}$	X	$\bar{\delta}$
Biomasa mg/L	266.667	15.275	310.000	36.056	410.000	10.000
PHA mg/L	21.994	2.732	83.617	12.006	100.127	4.969

Por otro lado los datos obtenidos para PHA en cada tratamiento también presentan diferencias estadísticas significativas ($P= 0.0000$) y la prueba Duncan (Anexo A) mostró que el tratamiento que se destaca de los demás es pH=7

Según los anteriores análisis estadísticos la producción de biomasa y de polímero es mayor cuando el medio de cultivo se ajusta a un pH inicial de 7, resultados similares han sido obtenidos por Timm, A. (1990), Yuksekdag, Z.N., (2004) y

¹⁶⁰ Madigan, M., et al. Op. cit. p. 151-152

Borah, B. (2002) con *Bacillus subtilis* 25¹⁶¹, *Bacillus megaterium* 12¹⁶² y *Bacillus mycoides* RLJ B-017¹⁶³ utilizando un medio de cultivo ajustado a un pH de 7. A valores de pH altos o bajos respecto a un rango óptimo, las enzimas pueden sufrir una desnaturalización o una alteración en el estado de su carga, estos cambios de carga pueden afectar la su actividad, ya sea cambiando la estructura o la carga del residuo que funciona para ligar el sustrato. El cambio de conformación de las enzimas se debe a que conforme cambia su estado de carga, estas pueden desenrollarse, volverse mas compactas o disociarse, todo lo cual conduce a la pérdida de su actividad.¹⁶⁴

Por lo anterior en *Bacillus mycoides* M17-2, a pH 7, el crecimiento y la producción del PHA son mayores probablemente porque este valor esta dentro de un rango óptimo de pH dentro del cual las enzimas y los acarreadores de nutrientes tienen una actividad máxima porque a este valor se encuentran en el estado iónico apropiado por lo tanto la velocidad de crecimiento aumenta, mientras que a pHs inferiores a 7 se obtienen valores mas bajos para producción de biomasa y PHA debido a que la actividad enzimática disminuye por el cambio en la conformación de las enzimas de manera que la velocidad de las reacciones intracelulares disminuye, produciendo un crecimiento lento.

El pH también determina la solubilidad y la absorción de los nutrientes que son asimilados por la célula por eso entre mas solubles sean los nutrientes serán mas fácilmente asimilados por ejemplo en las bacterias productoras de PHA, el pH esta estrechamente relacionado con el fósforo el cual a su vez también esta relacionado con la producción de PHA¹⁶⁵. En *B. mycoides* M17-2 es posible que a pH 7 el fósforo adicionado al medio en forma de fosfato ácido de sodio se encuentra en estado soluble, por lo tanto puede ser asimilado por las bacterias y utilizado para la síntesis de ATP necesario para las reacciones metabólicas y para producir las enzimas involucradas en la síntesis de diferentes metabolitos como el PHA. Por otro lado a pHs inferiores a 7 probablemente la solubilidad del fosfato disminuye, por lo tanto puede haber menor disponibilidad de ATP lo cual ocasiona un descenso en el crecimiento celular y por consiguiente en la síntesis del polímero¹⁶⁶. Es por eso que a pH 7 los nutrientes son adecuadamente asimilados por las bacterias.

En conclusión, la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 produce mayor cantidad de biomasa cuando el medio de cultivo suplementado con glucosa (10g/L), peptona (7.5g/L) y NaHPO₄(0.5g/L) se ajusta a un pH de 7 y se incuba a una temperatura

¹⁶¹ Timm, A. and Steinbuchel A. Op. cit

¹⁶² Yuksekdag, Z.N. Op. cit

¹⁶³ Borah, B, Thakur PS. Op. cit

¹⁶⁴ Murray, R. Granner, D. Op. cit

¹⁶⁵ Schembri, M. et al. Op cit.

¹⁶⁶ Asenjo J. et al. Op cit.

de 30°C, condiciones que coinciden con las reportadas para otras bacterias. Adicionalmente se puede decir que las mayores producciones de polímero se obtienen cuando hay mayor producción de biomasa, debido a que la síntesis del metabolito se encuentra asociada al crecimiento¹⁶⁷.

4.2. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA EN LA SÍNTESIS DEL POLÍMERO

El tipo de sustrato adicionado al medio de cultivo donde crecen las bacterias productoras de PHAs es otro de los factores que influyen tanto en el crecimiento bacteriano como en la síntesis de polímero¹⁶⁸. Ácidos grasos de cadena corta como ácido butírico y ácido propiónico han sido reportados por diferentes autores como precursores de las unidades monoméricas que conforman los PHAs¹⁶⁹. Cuando la cepa *Bacillus mycooides* M17-2 se cultivó en un medio MB suplementado con ácido butírico y otro suplementado con ácido propiónico los resultados mostraron que estos sustratos ejercen un efecto negativo sobre la crecimiento celular y la producción del polímero en comparación con los resultados obtenidos en el tratamiento testigo como se observa en la tabla 10. Por otra parte cabe mencionar que cuando *B. mycooides* fue cultivada en medio MB suplementado con ácido propiónico se observó una modificación en las relaciones de la unidades que conforma el copolímero (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) es decir, que la relación entre las unidades monoméricas 3-Hidroxibutirato:3-Hidroxivalerato cambió de 95:5 a 50:50 respectivamente.

Tabla 10. Efecto de los ácidos grasos de cadena corta en la producción de biomasa y en la síntesis de polímero en la cepa de *B mycooides* M17-2

Tratamiento	Biomasa total producida (mg/L)		Polímero total producido(mg/L)		Velocidad específica crecimiento (μ)
	X	δ	X	δ	
Testigo	663.67	9.29	91.52	7.66	0.040h ⁻¹
Acido Propiónico	300.00	19.98	35.31	6.65	0.020h ⁻¹
Acido Butírico	43.33	1.53	3.98	0.024	0.002h ⁻¹

Según el ANOVA y la prueba Duncan realizados para los grupos de datos de Biomasa y PHA (Anexo B) se confirma que efectivamente existen diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos ($p=0.0000$). Adicional a esto, en el tratamiento testigo tanto la velocidad específica de crecimiento como la producción de biomasa y PHA son mayores, después de este, el segundo mejor

¹⁶⁷ Fernández, 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(3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato 95:5). Tesis Doctoral. Universidad de la Habana. Cuba. 2006.

¹⁶⁸ Shimizu, H. Op. cit

¹⁶⁹ Doi, Y., Segawa, A. Op. cit

tratamiento es el de ácido propiónico, porque hay un crecimiento celular y síntesis del polímero considerables y en último lugar el tratamiento con ácido butírico, en el cual se obtuvieron los valores mas bajos de producción de biomasa y síntesis de polímero

Por otro lado en la tabla 10 se evidencia que el ácido butírico como el ácido propiónico ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular el cual es más evidente con ácido butírico. Probablemente para *B. mycoides* M17-2 el ácido butírico es una sustancia tóxica ya que no es precursor de ningún intermedio involucrado en la síntesis del polímero y las bacterias no lo asimilan como nutriente, por lo tanto se acumula en el medio generando mayor concentración de su forma no disociada, esta concentración es la responsable de la inhibición del crecimiento celular¹⁷⁰. Según Chung (1997) las formas no disociadas de los ácidos débiles de bajo peso molecular como el ácido butírico y el ácido propiónico, desde el medio de cultivo migran por transporte pasivo fácilmente a través de la membrana celular y actúan como agentes desacoplantes del transporte de electrones, inhibiendo la síntesis de ATP. Esto quiere decir que en presencia de un desacoplante el transporte de electrones y la bomba de protones bombardeo de protones continúan a un ritmo acelerado, pero no se genera un gradiente de protones debido a que los desacoplantes por ser portadores de protones inducen poros en la membrana celular proporcionando un canal adicional al de la ATP sintetasa para el flujo de protones hacia el interior de la célula. Como resultado de este “corto circuito”, la fuerza proton-motriz motriz de protones se disipa completamente de manera que el ATP no puede ser sintetizado. Por esta razón la forma no disociada tanto del ácido butírico como del ácido propiónico pueden inhibir la síntesis de ATP necesario para la reproducción celular.¹⁷¹ Este comportamiento así descrito es característico de las sustancias tóxicas para bacterias.¹⁷²

4.2.1. Cinética de crecimiento. Durante la cinética, en cada tratamiento se observó como fueron asimiladas las fuentes de carbono y de que modo afectaron el crecimiento celular y la síntesis del polímero.

La composición del testigo (MB: peptona, glucosa y fosfato ácido de sodio) favorece el crecimiento bacteriano y por consiguiente la producción del polímero, debido a que este es un medio optimizado en el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño para la cepa *Bacillus mycoides* M17-2, por eso se utilizó este medio como referencia para comparar los otros tratamientos.

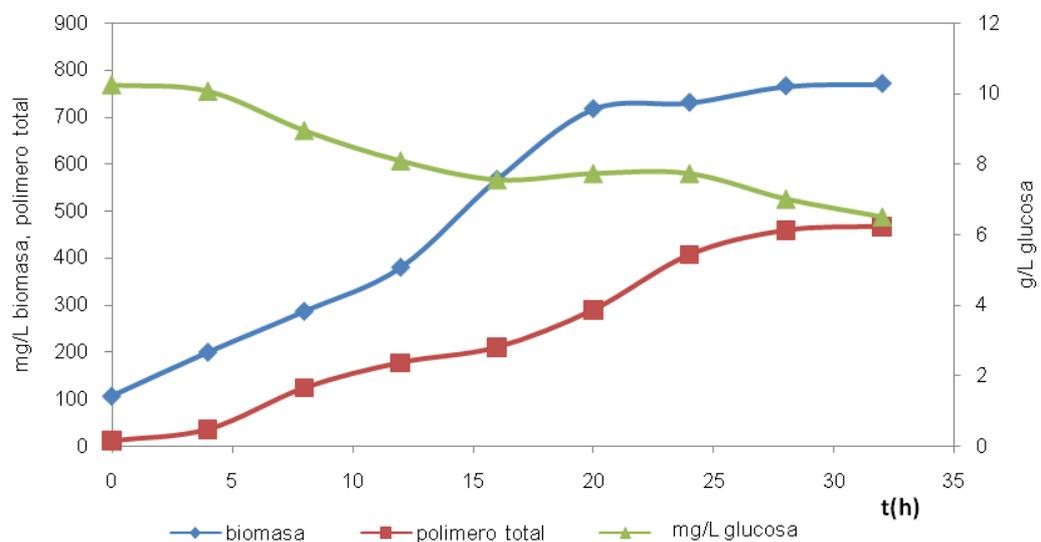
¹⁷⁰ Du G, Si Y, Yu J. Op. cit

¹⁷¹ Chung, Y. et al. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. 1997. Vol. 83. p. 492–495.

¹⁷² Barker, R. The bactericidal action of low molecular weight compounds. 1964. Vol.27. p. 213-220

En la figura 16 se pueden observar 3 curvas obtenidas como resultado de la cinética realizada en el tratamiento testigo. Estas curvas corresponden al crecimiento bacteriano (biomasa), producción total del polímero y consumo de glucosa. En la curva de biomasa se aprecian 2 fases; la primera corresponde a un crecimiento exponencial que comprende de 0 hasta las 20 horas y la segunda corresponde a una fase estacionaria, desde las 20 horas en adelante.

Figura 16. Crecimiento, producción de PHA y consumo de sustrato en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 en medio MB bajo condiciones óptimas: pH 7 y temperatura 30°C.



A medida que se incrementa la biomasa, se puede observar un consumo continuo de la fuente de carbono (glucosa) y este consumo es mucho más pronunciado desde 0 hasta las 16 horas, desde aquí hasta las 24 horas el consumo es mínimo posteriormente hay un segundo consumo de sustrato hasta las 32 horas. Si se tiene en cuenta que a partir de las 28 horas en adelante ya no hay producción de polímero, aún hay consumo de glucosa, esto indica que posiblemente esta cepa esté produciendo algún tipo de metabolito secundario.

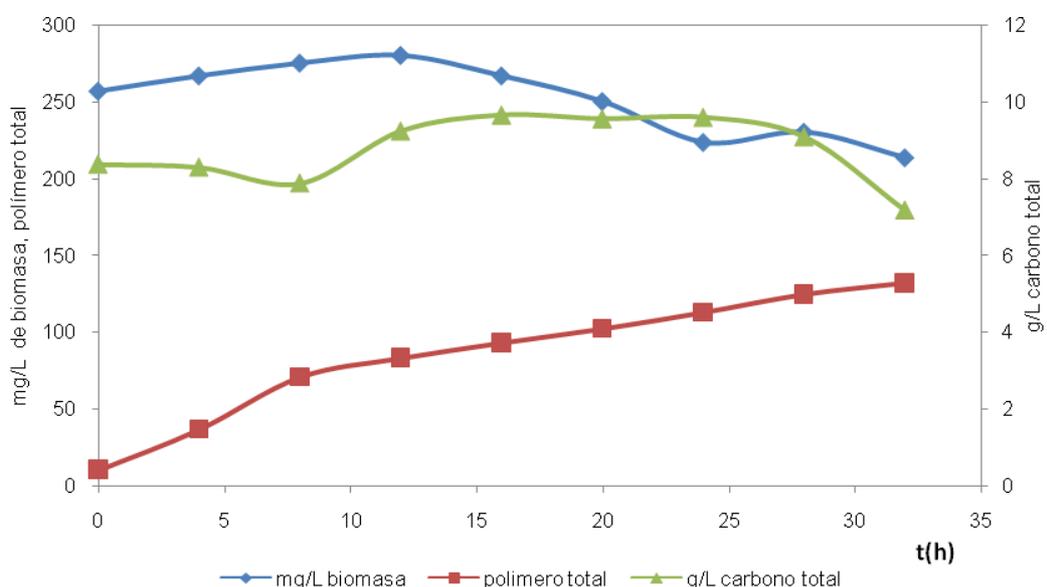
En general la glucosa es consumida por las bacterias para soportar el crecimiento bacteriano como también la síntesis del polímero. Por otro lado la curva de la síntesis del polímero indica que hubo un incremento constante en la producción de PHA desde el inicio de la fermentación hasta las 28 horas, que coincide con la fase de crecimiento exponencial de la bacteria en estudio. Según Gaden (1959) esto significa que en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 la síntesis del polímero está asociada al crecimiento.¹⁷³ Un comportamiento similar fue descrito por Fernández

¹⁷³ Gaden, E. I. Fermentation Process Kinetics. 1959. Vol 1. p. 413-429

(2006) quien menciona que en la cepa *Bacillus mycooides* FLB2 la síntesis de PHA también se encuentra asociada al crecimiento¹⁷⁴.

En el tratamiento con ácido butírico, la adición de ácido comenzó a partir de las 4 horas de incubación con el fin de asegurar el crecimiento bacteriano dentro del medio de cultivo, además, se lo adicionó gradualmente para evitar la inhibición del crecimiento debido a su toxicidad.¹⁷⁵

Figura 17. Crecimiento, producción de PHA y consumo de sustrato en la cepa *Bacillus mycooides* M17-2, en medio MB suplementado con ácido butírico, bajo condiciones óptimas: pH 7 y temperatura 30°C.



El efecto del ácido butírico sobre la producción de biomasa y síntesis del polímero en la cepa *B mycooides* M17-2 se puede apreciar en la figura 17. En esta se observa un ligero incremento en la producción de biomasa desde 0 hasta las 12 horas, superada esta fase la biomasa comienza a decrecer hasta las 32 horas. Por otro lado, mediante el método de Dubois¹⁷⁶ se pudo determinar la concentración de carbono total en el medio de cultivo, la cual depende de los carbonos aportados por la glucosa y por el ácido butírico. Como resultado de esta determinación se obtuvo la curva de carbono total que se muestra en la figura 17, en la cual se observa un consumo durante las primeras 8 horas, esto explica el incremento en la producción de biomasa y en la síntesis del polímero en este intervalo de tiempo, posteriormente, desde la 8 hasta las 16 horas el consumo disminuye ocasionando la acumulación de las fuentes de carbono en el medio de cultivo. Probablemente,

¹⁷⁴ Fernández, P. Tesis doctoral. Op. cit.

¹⁷⁵ Teh, J. S. Toxicity of Short-Chain Fatty Acids and Alcohols Towards *Cladosporium resinae*. 1974. Vol. 8. N° 5. p. 840-844.

¹⁷⁶ Dubois, M. Op. cit.

la acumulación se debe a la presencia de ácido butírico en el medio y es posiblemente la responsable del descenso en la síntesis de biomasa, considerando que existen evidencias que indican que el ácido butírico es un reactivo tóxico para diferentes bacterias.^{177,178}

Después de las 16 horas el consumo de carbono permanece constante hasta las 28 horas porque no se evidencia incremento en las concentraciones de las fuentes de carbono en la curva de carbono total, este comportamiento sugiere que existe un grupo de bacterias que se encuentra activo y este es el responsable de mantener constantes las concentraciones de las fuentes de carbono a pesar las adiciones periódicas de ácido butírico. Al parecer esta fracción de biomasa también es capaz de sintetizar PHA bajo estas condiciones de experimentación ya que en la curva de síntesis de polímero se aprecia una producción permanente desde el tiempo 0 hasta el final de la fermentación. Sin embargo, en esta curva se observan dos fases; una de máxima producción, desde 0 hasta las 8 horas donde además hay una síntesis rápida de polímero y otra fase mas lenta de síntesis desde las 8 hasta las 32 horas. En la primera fase, la máxima producción de polímero se debe al consumo de glucosa, pero a medida que se incrementa la concentración de ácido butírico la producción de PHA es más lenta en la segunda fase debido al efecto tóxico que este reactivo ejerce.

Como resultado, el tratamiento con ácido butírico como ya se describió, no favoreció el crecimiento celular ni la producción del polímero ya que la velocidad de crecimiento(μ)(tabla 10) fue demasiado baja en comparación con la velocidad de crecimiento en el tratamiento testigo, por lo tanto, el ácido butírico afecta negativamente el crecimiento bacteriano causando una mínima producción de PHA.

Doi (1990) reportó que cuando *Alcaligenes eutrophus* crece en un medio suplementado con ácido butírico como única fuente de carbono, esta produce una alta concentración del homopolímero PHB¹⁷⁹, en *Bacillus mycoides M17-2* se produjo un efecto contrario ya que se obtuvieron los valores mas bajos para biomasa y velocidad específica de crecimiento (μ). Además el polímero sintetizado fue el copolímero P(HB-HV) en muy baja concentración. De acuerdo a esto se puede decir que en esta cepa no existen ni los genes ni las enzimas necesarias para asimilar el ácido butírico de tal manera que pueda incorporarlo a la ruta metabólica de la síntesis del polímero.

En el tratamiento con ácido propiónico, la adición de ácido al igual que con el ácido butírico se realizó a partir de las 4 horas para asegurar el crecimiento

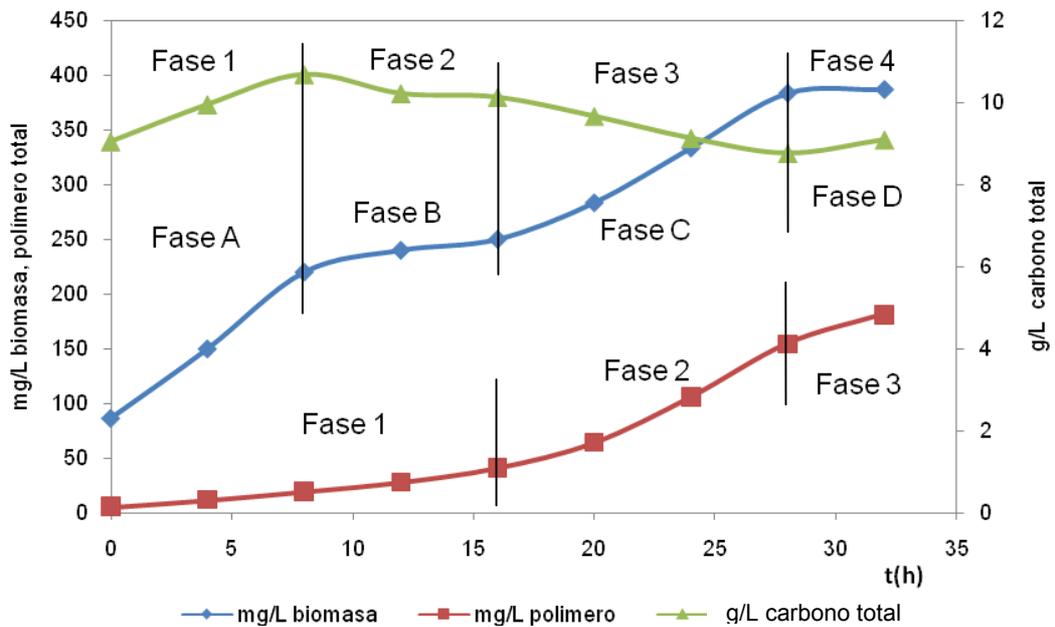
¹⁷⁷ Teh, J. S. Op. cit

¹⁷⁸ Du G, Si Y, Yu J. Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol. 23. 1613–7.

¹⁷⁹ Doi, Y., Segawa, A. Op. cit

bacteriano. Este se adicionó gradualmente en cantidades iguales cada 4 horas con el fin de evitar que se inhiba el crecimiento por el efecto tóxico causado por el ácido, y para que las bacterias se adapten lentamente al nuevo sustrato.

Figura 18. Crecimiento, producción de PHA y consumo de sustrato en la cepa *Bacillus mycoides* M17-2, en medio MB suplementado con ácido propiónico, bajo condiciones óptimas: pH 7 y temperatura 30°C.



Como se puede apreciar en la figura 18, la curva correspondiente a la producción de biomasa presenta 4 fases: La fase A desde 0 hasta las 8 horas corresponde a una primera fase de crecimiento exponencial donde la velocidad de crecimiento es máxima. La fase B desde 8 hasta las 16 horas se puede considerar la primera fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento tiende a ser 0 porque hay un ligero crecimiento celular. La fase C desde 16 hasta las 28 horas es la segunda fase de crecimiento exponencial donde nuevamente hay un evidente incremento de biomasa y la fase D desde 28 hasta 32 horas considerada la segunda fase estacionaria donde la producción de biomasa permanece constante lo que quiere decir que la velocidad de crecimiento es igual a cero. Este comportamiento así descrito corresponde a un crecimiento diáuxico¹⁸⁰, el cual es característico para microorganismos que crecen en presencia de dos fuentes de carbono es así como en la fase A se consume preferentemente la glucosa, la fase B es una fase de adaptación donde posiblemente se produce la síntesis de las enzimas que van a ser responsables de metabolizar el ácido propiónico. En la fase C el ácido

¹⁸⁰ Madigan, M., et al. op. cit. p. 219

propiónico posiblemente es utilizado para el crecimiento y para soportar el metabolismo microbiano. Finalmente la Fase D o segunda fase estacionaria ocurriría cuando hay acumulación de sustancias de desecho en el medio.

En la grafica 18 también se puede observar, el comportamiento de la curva de carbono total en donde igualmente se observan 4 fases; en la primera fase que comprende las 8 primeras horas hay un incremento de las concentraciones de carbono debido a la adición de ácido propiónico al medio, el cual no es consumido, en la segunda fase comprendida desde las 8 horas hasta las 16 horas se observa que hay una menor concentración de las fuentes de carbono comparada con la concentración observada a las 8 horas lo cual evidencia que hay consumo de las fuentes de carbono esto quiere decir que las bacterias se encuentran en un periodo de adaptación al ácido propiónico. En la siguiente fase desde las 16 horas hasta las 28 horas se observa que la curva del consumo de sustrato adquiere una mayor pendiente que en la fase anterior y que los niveles de concentración de las fuentes de carbono son marcadamente inferiores a las anteriores fases. Posteriormente desde las 28 horas hasta las 32 horas se observa que ya no existen variaciones en la concentración de las fuentes de carbono por lo tanto la velocidad de consumo tiende a ser cero. Por otro lado en la curva de producción de polímero se observan 3 fases. La primera fase comprende de 0 hasta las 16 horas donde se observa una síntesis constante de PHA. La segunda fase desde las 16 horas hasta las 28 horas donde se observa una pendiente con mayor grado de inclinación indicando que la velocidad de síntesis de PHA es mayor comparada con la velocidad de la fase anterior. Cabe resaltar que esta fase coincide con la segunda fase (fase C) de crecimiento exponencial de producción de biomasa y también coincide con la segunda fase de consumo de sustrato. Por ultimo se observa una tercera fase de 28 a las 32 horas donde la velocidad de síntesis de PHA disminuye debido a que el crecimiento celular entra a su fase estacionaria.

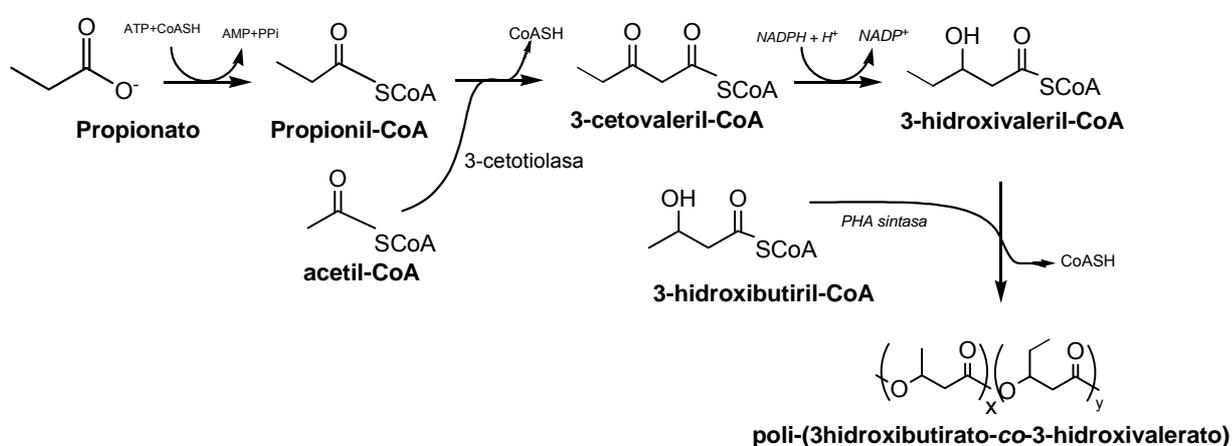
Considerando que en la curva de síntesis de polímero la mayor velocidad de síntesis se produce en la segunda fase entre las 16 y 28 horas y que este periodo coincide con la segunda fase (Fase C) de crecimiento exponencial de producción de biomasa y a su vez con la mayor velocidad de consumo de sustrato se puede afirmar que la síntesis del polímero en esta fase se encuentra soportada tanto por el consumo de glucosa como de ácido propiónico. Este comportamiento indica que el ácido propiónico después de la primera fase de adaptación (Fase B) es metabolizado en propionil-CoA¹⁸¹ e incorporado en la síntesis del copolímero, de manera que a partir de él se sintetiza la fracción 3HV. Esto se comprueba con el cromatograma de la figura 22, que corresponde al polímero obtenido después que la cepa *B mycoides M17-2* se cultivó en medio MB suplementado con ácido

¹⁸¹ Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labeled acetate and propionate. 1987. Vol.20. p. 2988–2991.

propiónico. En el se observa el incremento de la fracción 3-HV respecto al 3-HB. Por lo anterior se puede afirmar que en *B mycoides M17-2* se produce la enzima específica para metabolizar el ácido propiónico y transformarlo en precursor de la fracción 3HV del copolímero.

Existen muy pocas bacterias que puedan metabolizar propionil-CoA para producir 3-HV como unidad monomérica del copolímero P(HB-HV) como por ejemplo *Alcaligenes eutrophus*¹⁸², *Rhodopseudomonas palustris*¹⁸³ y *Nostoc muscorum*¹⁸⁴,..

Figura 19. Ácido propiónico como precursor de la fracción valerato



Según los datos obtenidos en esta investigación se puede plantear que la cepa *Bacillus mycoides M17-2* asimila el ácido propiónico y lo incorpora a la ruta metabólica de la síntesis del polímero en forma de propionil-CoA de manera que reacciona con la acetil-CoA proveniente de la degradación de la glucosa para producir 3-cetovaleril-CoA sobre el cual actúa una 3-cetotiolasa y produce 3-hidroxicetovaleril-CoA que se polimeriza con la 3-hidroxiacetil-CoA por la acción de la PHB polimerasa y así producir el copolímero poli(3-hidroxiacetil-CoA-co-3-hidroxicetovaleril-CoA) (figura 19)

Es así como la propionil-CoA proveniente del ácido propiónico da origen a la fracción 3-hidroxicetovalerato del copolímero, esta misma ruta metabólica se ha establecido para *Alcaligenes eutrophus*¹⁸⁵ cuando creció en un medio suplementado con ácido propiónico.

¹⁸² Doi, Y. et al. Op cit.

¹⁸³ Mukhopadhyay, M., et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Rhodopseudomonas palustris SP5212*. 2005. p. 765–769.

¹⁸⁴ Mallick, N., et al. Process optimization for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-co-polymer production by *Nostoc muscorum*. 2007. Vol.37. p. 125–130

¹⁸⁵ Steinbüchel, A. 1991. Op. cit.

Pese a que el ácido propiónico afecta el crecimiento celular y la síntesis de PHA, el hecho que pueda ser transformado en precursor de una unidad monomérica del copolímero, disminuye de cierto modo su efecto tóxico, por lo tanto se puede sugerir que la bacteria utiliza la síntesis de la fracción 3-HV como una vía de detoxificación

El incremento de la fracción 3-HV del copolímero producido por la cepa *B. mycooides* M17-2 en el tratamiento con ácido propiónico, es un resultado de gran importancia biotecnológica ya que a través de los diferentes tratamientos en esta cepa se logró manipular la síntesis del copolímero por adición de un ácido graso de cadena corta al medio de cultivo, cabe señalar que Marchessault y colaboradores (2004) plantean que al incrementar la fracción HV en el copolímero se modifican sus propiedades físicas como por el ejemplo el punto de fusión, que disminuye con el incremento de la fracción HV, logrando ser más bajo que la temperatura de degradación de manera que el polímero puede ser fundido sin sufrir degradación térmica. También la temperatura de transición vítrea disminuye lo cual permite la manipulación del polímero a bajas temperaturas disminuyendo su carácter quebradizo, así mismo los módulos de flexión decrecen mejorando la flexibilidad.¹⁸⁶

Con el mejoramiento de estas propiedades se amplía el rango de aplicaciones del copolímero^{187,188}, esto abre las puertas a futuras investigaciones encaminadas a la obtención de polímeros con propiedades físicas mejoradas, y a la manipulación de la expresión de genes, entre otras.

4.3. ANALISIS DEL COPOLÍMERO POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)

4.3.1. Identificación del polímero por espectroscopia infrarroja (IR). La espectroscopia infrarroja es una técnica química de rutina utilizada para el estudio de la estructura molecular, pero también se ha aplicado para el estudio la evolución de poblaciones bacterianas intactas. El espectro obtenido de esta manera refleja la composición bioquímica total de las células. En este tipo de análisis químico, las bandas observadas en el espectro reflejan los compuestos celulares que se encuentran en mayor concentración, tales como, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.^{189,190}

¹⁸⁶ Marchessault, R. and Yu, G. Crystallization and material properties of polyhydroxyalkanoates. 2004. p. 157–248.

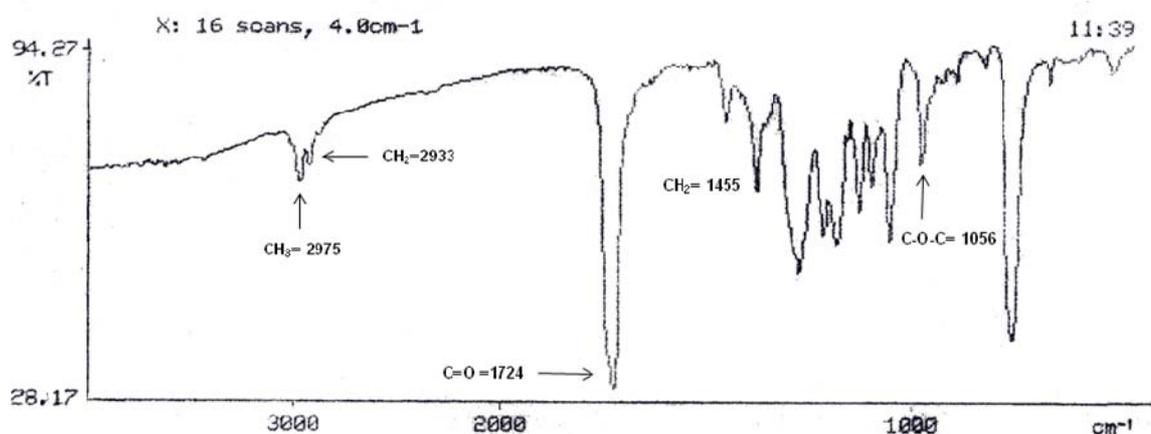
¹⁸⁷ Khanna, S., and Srivastava.,A. Op. cit

¹⁸⁸ William, D. Materials Derived from Biomass/Biodegradable Materials. 1992. Vol. 89, p. 839-842

¹⁸⁹ Curk, M. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. 1994. Vol. 123. p. 241-248.

¹⁹⁰ Goodacre, R., E. M. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. 1996. Vol. 140. p. 233-239.

Figura 20. Espectro Infrarrojo del PHA producido por la cepa *B. mycooides* M17-2 obtenido después de la fermentación en medio MB + ácido propiónico.



En la figura 20 se observa el espectro infrarrojo del copolímero poli(3HB-3HV) obtenido por la cepa *B. mycooides* M17-2 cuando creció en medio MB suplementado con ácido propiónico. En este espectro no se observan bandas de los grupos N-H, C=N, P=O que son grupos funcionales aportados por proteínas, proteínas fosforiladas, lípidos y ácidos nucleicos, por lo cual se descarta la presencia de estas macromoléculas en la muestra analizada. Por otra parte, se aprecian bandas características del carbono carbonílico de $\nu_{C=O} = 1724.5 \text{ cm}^{-1}$ y del grupo C-O-C de $\nu_{C-O-C} = 1056, 1124 \text{ y } 1295 \text{ cm}^{-1}$, así como otras CH_2 y CH_3 $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 1455$, que se identifican con grupos asociados a la cadena alifática. Estas bandas son semejantes a las reportadas para el PHB producido por otros microorganismos.¹⁹¹

Espectros similares se obtuvieron para el PHA producido por *B. mycooides* M17-2 cuando creció en el tratamiento testigo y en el tratamiento con ácido butírico donde se observan las mismas bandas características de los PHAs.

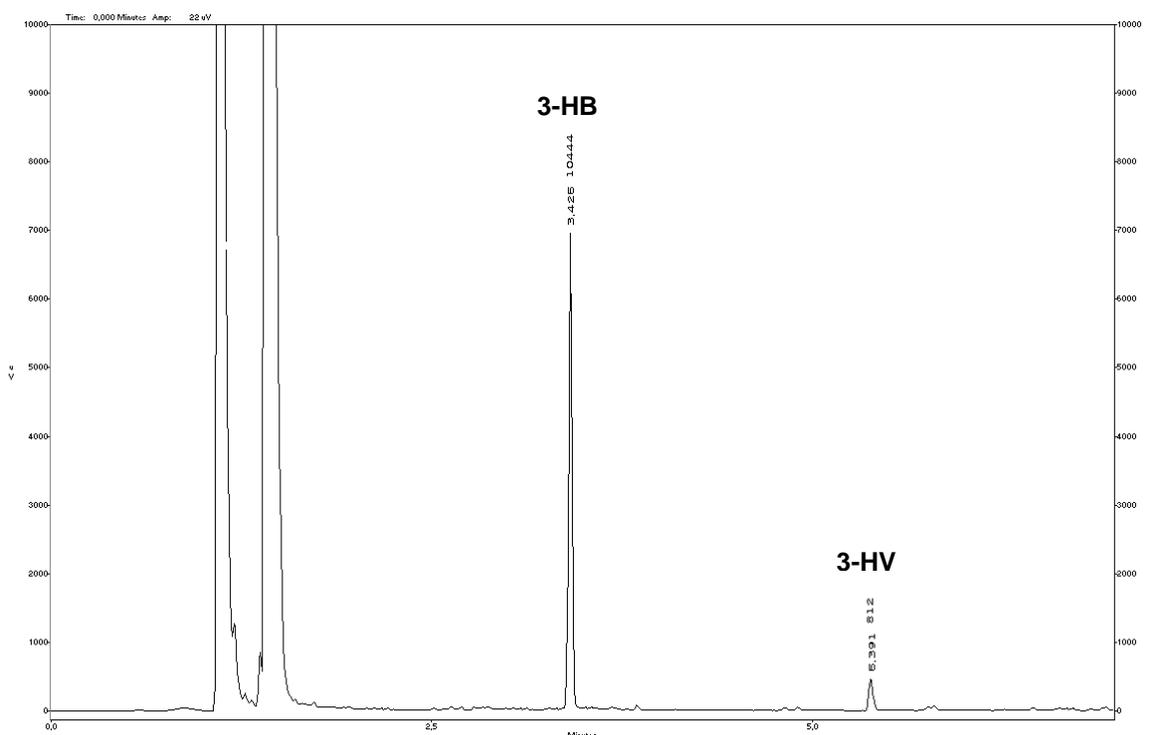
4.3.2. Identificación del polímero por cromatografía de gases (GC). Un cromatograma del copolímero comercial (patrón) fue utilizado para comparar los tiempos de retención de los derivados metilados que conforman el PHA obtenido en cada tratamiento. En el cual el ester de metilo del ácido 3-Hidroxi-butírico presentó un tiempo de retención promedio de 3.420 minutos con un intervalo de confianza que oscila entre 3.416 y 3.425 minutos mientras que el ester metílico del ácido 3-Hidroxi-valérico presentó un tiempo de retención promedio de 5.395 minutos y un intervalo de confianza entre 5.391 y 5.400 minutos.

El polímero producido en el tratamiento testigo (figura 21) mostró que el ester de metilo del ácido 3-Hidroxi-butírico presentó un tiempo de retención promedio de

¹⁹¹ Hon, K., et al. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by fourier transform infrared spectroscopy. 1999. Vol. 51. p. 523-526.

3.425 minutos y el ester de metilo del ácido Hidroxivalerico presentó un tiempo de retención promedio de 5.391 minutos. Estos tiempos de retención están dentro de los intervalos de confianza del patrón por lo tanto se puede decir que lo tiempos de retención de los picos coinciden. Además esto demuestra que la cepa *B. mycooides* M17-2 produce el copolímero P(3-HB-3HV), en una proporción aproximada de 95%HB y 5%HV (figura 21).

Figura 21. Cromatograma del copolímero obtenido de la fermentación en medio basal

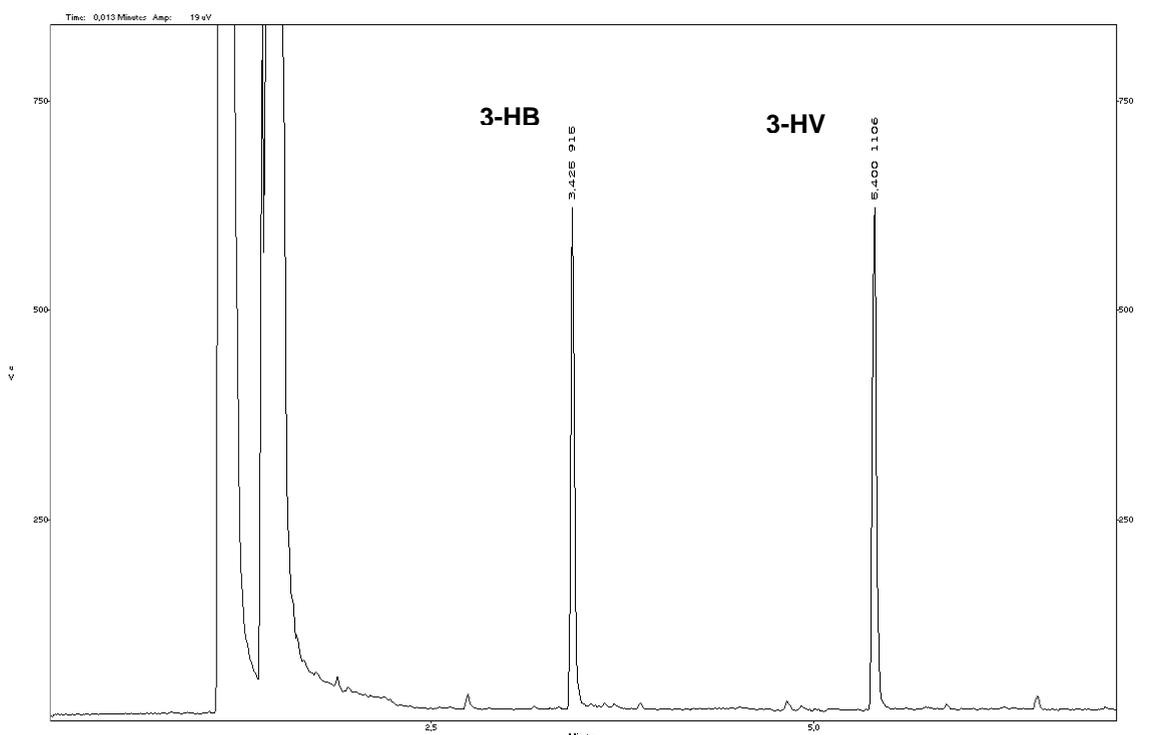


En el tratamiento con ácido butírico el cromatograma obtenido para el copolímero mostró dos picos muy pequeños, uno correspondiente al ester de metilo del ácido 3-Hidroxibutírico con un tiempo de retención promedio de 3.420 minutos y otro correspondiente al ácido 3-Hidroxivalérico que presentó un tiempo de retención promedio de 5.395 minutos. Estos tiempos de retención también están dentro del intervalo de confianza de los derivados metilados del copolímero comercial ya mencionados.

Por otro lado el polímero obtenido en el tratamiento con ácido propiónico presentó 2 picos de área considerable a tiempos de retención promedio de 3.420 y 5.395 correspondientes a los esteres de metilo del ácido 3-Hidroxibutirico y del ácido 3-Hidroxivalerico respectivamente (figura 22). Estos tiempos de retención también coinciden con los tiempos de los derivados metilados del copolímero comercial. Lo particular en este cromatograma y en general en este tratamiento, es que la

fracción 3-HV se incrementa respecto a la fracción 3-HB. Normalmente en medio MB la relación de HB:HV del copolímero producido por la cepa M17-2 es de 95:5 (figura 21), mientras que en el tratamiento con ácido propiónico esta relación cambió a 50:50, esto quiere decir que adicionando ácido propiónico al medio de cultivo en esta cepa la fracción 3-HV se incrementa de un 5% a un 50%.

Figura 22. Cromatograma del copolímero obtenido de la fermentación en medio basal más ácido propiónico



4.3.3. Identificación por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). La identificación por CG-MS se realizó con el propósito de verificar si los picos de los cromatogramas del polímero obtenido después de la cinética en los tratamientos testigo, ácido butírico y ácido propiónico, correspondían a los ésteres metílicos de los ácidos 3-hidroxi-butírico y 3-hidroxi-valérico. Los espectros obtenidos de dichos ésteres metílicos presentaron perfiles de fragmentación similares entre sí, luego se compararon con los espectros de los ésteres metílicos de la mezcla certificada de copolímero obteniendo un alto grado de coincidencia en el patrón de fragmentación de masas.

En la interpretación de los espectros de masas obtenidos se estudiaron las respectivas rutas de fragmentación, típicas para los diferentes metil ésteres de ácidos grasos (FAME's). Como los constituyentes del polímero son ácidos grasos hidroxilados de cadena corta, sufren una ruta de fragmentación similar.

Las figuras 23 y 24 muestran los espectros de masas obtenidos para los correspondientes ésteres metílicos de los ácidos 3-hidroxi-butírico y 3-hidroxi-valérico correspondientes al polímero obtenido en la fermentación en MB suplementado con ácido propiónico. En los espectros de masas de cada éster se pueden observar los iones resultantes de las fragmentaciones típicas para este tipo de compuestos como el ión molecular M^+-1 de $m/z=117$ para el metil éster del ácido 3HB y $m/z=131$ para el metil éster del ácido 3HV y otras fragmentaciones correspondientes a la pérdida del radical CH_3O^* para el metil éster del ácido 3HB y el radical CH_3^* para el metil éster del ácido 3HV, a la formación de $[C_4H_7O_2]^+$ ($m/z=87$) para el metil éster del ácido 3HB y $[C_5H_9O_3]^+$ ($m/z=117$) para el metil éster del ácido 3HV; al reordenamiento McLafferty $[C_3H_6O_2]^+$ ($m/z=74$) y el ión pico base $[C_2H_3O]^+$ ($m/z=43$) para ambos ésteres metílicos.

Figura 23. Espectro de masas del éster metílico del ácido 3-Hidroxi-butírico obtenido en medio MB suplementado con Ácido propiónico

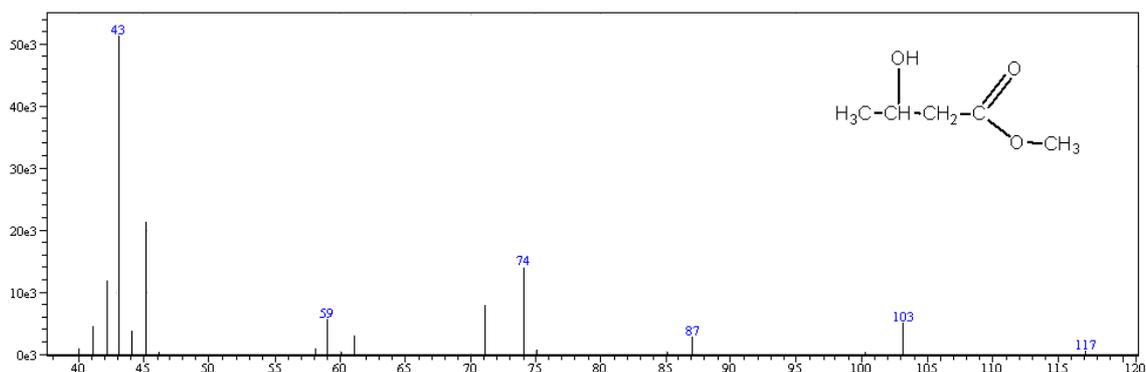
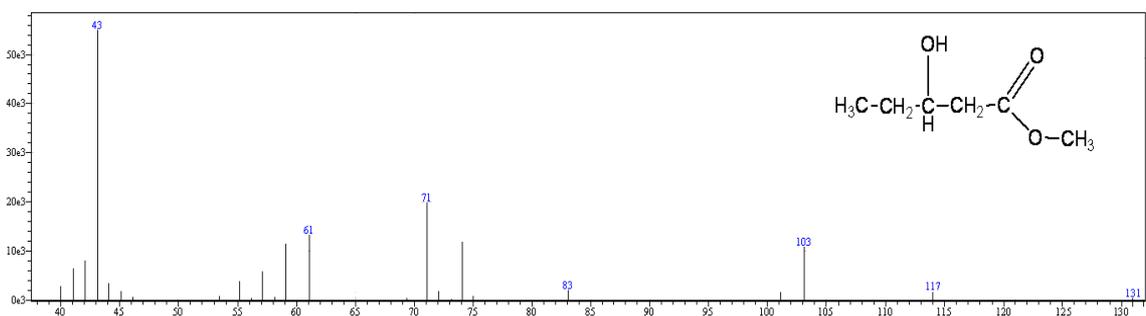


Figura 24. Espectro de masas del éster metílico del ácido 3-Hidroxi-valérico obtenido en medio MB suplementado con Ácido propiónico



Las posibles rutas de fragmentación de los ésteres metílicos del ácido 3-hidroxi-butírico y 3-Hidroxi-valérico se presentan en las figuras 25 y 26

Figura 25. Posibles rutas de fragmentación para el ester metílico del ácido 3-hidroxi-butírico

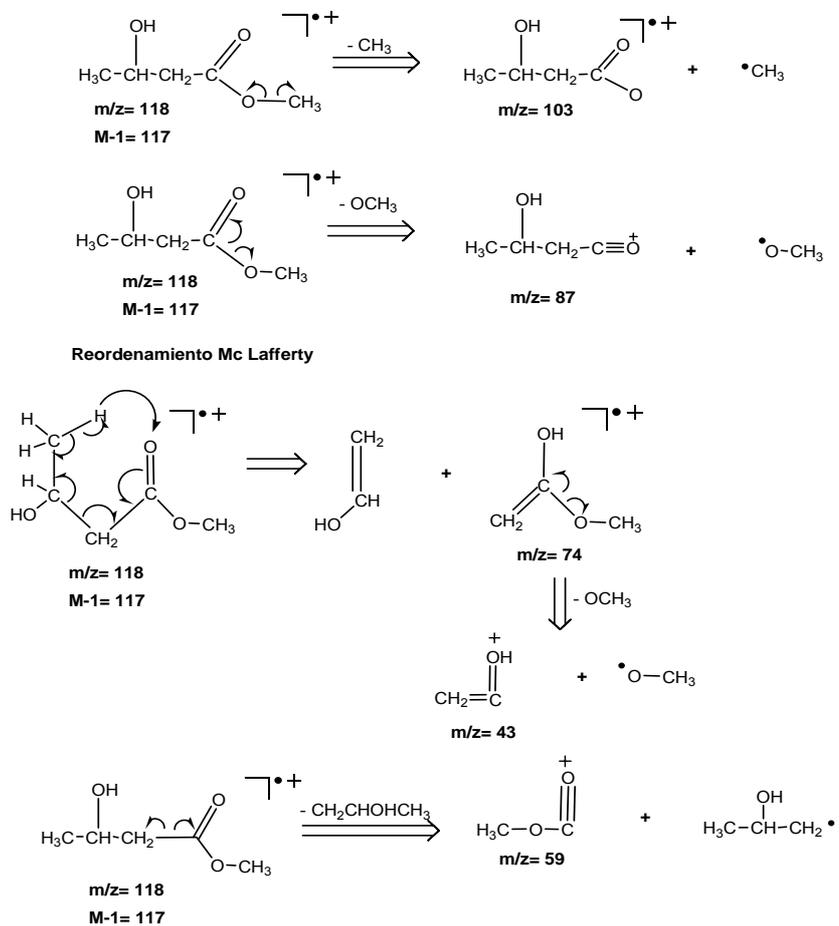
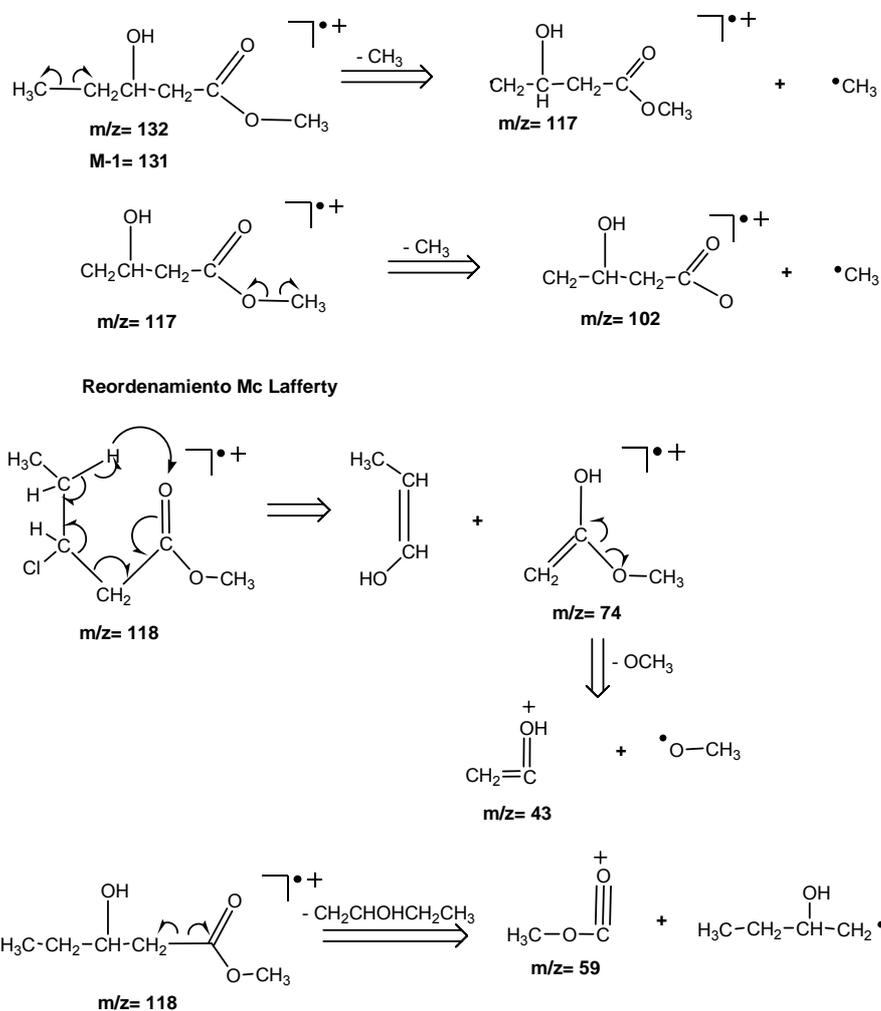


Figura 26. Posibles rutas de fragmentación para el ester metílico del ácido 3-hidroxi-valérico



Después del análisis de los espectros de masas y las rutas de fragmentación se puede afirmar que el copolímero obtenido en el tratamiento con ácido propiónico esta constituido por unidades de 3-Hidroxi-butarato y 3-Hidroxi-valerato.

5. CONCLUSIONES

Se determinó que la temperatura es uno de los factores que influye en el crecimiento celular y la síntesis del polímero producido por la cepa *Bacillus mycooides M17-2*, de manera que la mayor producción para estas variables se obtuvo cuando el medio inoculado se incubó a una temperatura de 30°C obteniéndose una producción de biomasa de 333.67 mg/L y 121.488 mg/L de PHA. A temperaturas inferiores o superiores a este valor la producción de biomasa y síntesis de PHA disminuyen considerablemente.

Se estableció que el pH también afecta el crecimiento celular y la síntesis de polímero de la cepa en estudio. Cabe destacar que a pH 7 se obtuvieron las mayores producciones tanto de biomasa (410 mg/L) como de PHA (100,13 mg/L) y a medida que el pH del medio disminuye la producción de biomasa y PHA también disminuyen.

En la cepa *Bacillus mycooides M17-2* el ácido butírico ejerce un efecto tóxico porque inhibe el crecimiento microbiano y la síntesis de PHA considerando que los valores de biomasa y PHA obtenidos en medios de cultivo suplementados con ácido butírico son marcadamente inferiores comparados con los datos obtenidos en medios de cultivo sin ácido butírico.

En la cepa *Bacillus mycooides M17-2*, el ácido propiónico ejerce un efecto negativo en la producción de biomasa y síntesis de polímero, sin embargo este efecto no es tan marcado como el efecto del ácido butírico.

Cuando la cepa *Bacillus Mycooides M17-2* se cultivó en un medio MB suplementado con ácido propiónico, se obtuvo el copolímero poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) con un incremento en la fracción 3-HV de 5% a un 50%, por lo cual se modificaron las proporciones de las unidades monoméricas del copolímero.

Con la cinética de crecimiento realizada en los diferentes medios de cultivos se pudo establecer que en *Bacillus Mycooides M17-2* la síntesis del copolímero se encuentra asociada al crecimiento

Cuando *Bacillus Mycooides M17-2* crece en un medio de cultivo suplementado con ácido propiónico este microorganismo presenta un crecimiento diauxico, en el cual la segunda fase de crecimiento exponencial concuerda con la mayor velocidad de síntesis de polímero

6. RECOMENDACIONES

Evaluar la síntesis de PHA a diferentes concentraciones de ácido propiónico y establecer los intervalos de adición con el fin eliminar el efecto tóxico del ácido propiónico e incrementar la producción de biomasa.

Establecer las propiedades físicas del copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato 50:50) producido por la cepa *Bacillus mycooides M17-2* cuando crece en un medio suplementado con propionato.

Evaluar la producción de PHA en la cepa *Bacillus mycooides M17-2* con fuentes de carbono y nitrógeno renovables, económicas y fáciles de adquirir como melaza, harina de quinua, suero de leche, entre otras.

Optimizar las concentraciones de los sustratos y las condiciones de aireación en el medio de cultivo para favorecer la producción de PHA a gran escala

BIBLIOGRAFIA

ALLTHECH ASSOCIATES GC. Education. Quantitation Methods In GC. 1998.

ANDERSON, A. et al. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates; *Microbiol.Rev.*1990. Vol 54. N°4. p. 540-572.

ANDERSON, A. J. et al. The production of polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources,. *In* E. A. Dawes (ed.), Novel biodegradable microbial polymers. 1990. Vol. 186. p. 119–129.

ASENJO, J. A. et al. Effect of Single Nutrient limitation on Poly- β -hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 1995. Vol.46 N°5. p. 497-502.

BAATH, E. Adaptation of Soil Bacterial Communities to Prevailing pH in Different Soils. 1996. p. 227-237.

BARKER, R. The bactericidal action of low molecular weight compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 1964. Vol. 27. p. 213-220

BARBOSA, M. Producción De Poli- β -Hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Revista de la Facultad de Ciencias-Pontificia Universidad Javeriana.* 2005. Vol.10 N°1. p. 45-54

BARBUZZI, T., et al. Microbial Synthesis of Poly(3-Hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from Fatty Acids. Identification of Higher Monomer Units and Structural Characterization. *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 10. p. 35-41.

BERLANGA, M., MONTERO, T. Rapid spectrofluorometric screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology.* 2006. Vol. 9. p. 95-102.

BORAH B, THAKUR P. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly--hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol.* 2002. Vol. 92. p. 776–83.

BRANDL, H., Fuller, R. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(b-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. Vol. 54. p. 1977–1982.

BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., AND GENSER, K. Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters From Renewable Resources. Physiological and Engineering Aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998. Vol. 65. p. 127-161.

BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology* 1978. Vol. 6. p. 29-37.

BRUSSELS BIOTECH, GALÁCTICA SA, “ Biopolymers as viable alternatives to common plastic materials”.2004.

BURDON, K. L. Fatty Material In Bacteria And Fungi Revealed By Staining Dried, Fixed Slide Preparations. *J. Bact.* 1946. Vol. 52. p. 665-678.

BYROM, D. Polyhydroxyalkanoates. En: Mobley DP, editor. *Plastics from microbes. microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Munich. Hanser; 1994. p. 5–33.

BYROM D. Production of Poly- β -hydroxybutyrate. Poly- β -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiol.* 1992, Rev. 103. p. 247-250.

CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. *Q. J. Microsc. Sci.* 1947. Vol. 88. p. 383-392.

CARBALLO, M., et al. Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos por cepas bacterianas marinas. *Revista Biológica*. 2003. Vol. 17. Nº 1. p. 36-42.

CHEN, G., et al. Microbial production of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Prog. Natl. Sci.* 2000. Vol. 10. p. 843-850.

CHUNG, Y. J., et al. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. *J. Ferment. Bioeng.*1997. Vol. 83. p. 492–495.

CURK, M. C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. Vol. 123. p. 241-248

DE ALMEIDA, A., RUIZ, J. A. Bioplásticos. una alternativa ecológica. *Revista Química Viva*. 2004. Nº 3. p. 1-10

DE KONING, G. Physical properties of bacterial poly- β -hydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology*. 1995. Vol. 41 Nº 1. p. 303-309.

DEMICHELI, M, "Plásticos biodegradables a partir de fuentes renovables ". 2001. *IPTS* . Vol 10. p. 5

DOI, Y., et al. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol.* 1992. Rev. 103. p. 103-108.

DOI, Y., SEGAWA, A. Production of biodegradable Copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. In. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, Dawes, E. A. (ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 1990. p. 37-48.

DOI, Y., M. KUNIOKA. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-labeled acetate and propionate. *Macromolecules*. 1987. Vol. 20. p. 2988–2991.

DU, G. and YU, J. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*. mcl-poly-3-hydroxyalkanoates) synthesis versus oxidation. *Process Biochem.* 2002. Vol 38. p. 325-332.

DU G, Si Y, Yu J. Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol Lett.* 2001. Vol. 23. p. 1613–7.

DUBOIS, M., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956. Vol. 28. p. 350-356.

FERNÁNDEZ, P., et al. Influencia de Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Crecimiento Bacteriano y Síntesis de Polihidroxialcanoato de una Cepa de *Bacillus mycoides* FLB2. *Revista del centro de estudios en Salud UDENAR*. 2006. Vol. 1. N° 7. p. 34-42

FERNÁNDEZ, 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(3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato 95:5). Tesis Doctoral. Universidad de la Habana. Cuba. 2006.

FIDLER, S. y DENNIS, D. Polyhydroxyalkanoate Production in Recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1992. Vol. 103. p. 231-236.

FUKUI, T. and DOI. Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* 1998. Vol 180. p. 667–673.

GADEN, E. I. Fermentation Process Kinetics. *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.* 1959. Vol 1. p. 413-429

GALEGO, N. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as a composite biomaterials. *Polym. Test.* 2000. Vol 19. p. 485-492.

GODOY, F. Poly- β -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. *Lett Appl Microbiol.* 2003. Vol. 36. p. 315-20.

GOODACRE, R. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. Vol 140. p. 233-239

GORENFLO, V., STEINBÜCHEL, A. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999. Vol. 51. p. 765-772.

GREEN, P. et al. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acids β -oxidación inhibited *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol. 133. N° 43. p. 4-7

HAHN, S. K., et al. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology.* 1995. Vol. 61. N° 1. p. 34-39.

HARVEY, R., MAYBERRY, N. Effect of Growth Conditions and Staining Procedure upon the Subsurface Transport and Attachment Behaviors of a Groundwater Protist, *Appl. Env. Microbiol.* 2002. Vol. 68. p. 1872-1881.

HENRYSSON, T. Influence of the endogenous storage lipid poly- β -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting ethanotrophic mixed cultures. *Appl. Environ Microbiol.* 1993. Vol. 59. p. 1602-1606.

HESELNANN RPX. Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. *J Microbiol Methods.* 1999. Vol.35. p. 111–119.

HIDALGO, W. Y ZAMBRANO, J.C. Aislamiento de Bacterias Nativas Productoras de Polihidroxialcanoatos PHAs Presentes en Suelos de la Región Andina del Departamento de Nariño. Tesis. Universidad de Nariño , 2005.

HOLMES P. A. Biologically produced PHA polymers and copolymers. En. *Developments in crystalline polymers*, Bassett DC (ed), Elsevier, London. 1988. Vol 2. p. 1-65.

HOLMES, P.A. y LIM, G.B. 1990. U.S. Patent 4,910,145

HON, K., et al. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbial Biotechnology*. 1999. Vol. 51. p. 523-526.

HORI, K., et al. Effects of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. *Biotechnol. Lett.* 1994. Vol. 16. p. 709-714.

HUIJBERTS, G. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. p. 536-544.

HUIJBERTS GNM, VAN DER WAL H, Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. *Biotechnol Tech.* 1994. Vol. 8. p. 187-192.

INSUASTY, B., ZULUAGA, F. Analisis Orgánico y Espectral. *Facultad de Ciencias, Univesidad del Valle*. 2000, 119-149.

JAN, S. et. al. Quantitative ¹H NMR spectroscopy analysis of the poly (3-hydroxyalkanoate) extracted from *Rhizobium meliloti* cells; *J. Chim. Phys.* 1995. Vol. 92. p. 1793-1796.

JAN, S. et. al.. ¹H MNR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass; *Enzyme Microb. Technol.* 1996. Vol. 18. p. 195-201.

JENDROSSEK, D., A. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996. Vol. 46. p. 451-463.

KANSIZ, M. Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(b-hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. p. 3415-3420.

KARR D. B, WATERS J. K,. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion highpressure liquid chromatography and UV detection. *Appl Environ Microbiol.* 1983, Vol. 46. p.1339-44.

KESSLER, B. and B. WITHOLT. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.* 2001. Vol. 86. p.97-104.

KHANNA, S., AND SRIVASTAVA, A. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005. Vol. 40. p. 607-619.

KIM, B., et al. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fedbatch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*. 1994. Vol. 43. p. 892–898.

KWANG, S.; CHANG, Y. Optimization of Microbial Poly (3-hydroxybutyrate) recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*. 1994. Vol. 44. No 2. p. 256-261

LAGEVEEN, R. G. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. effect of substrates on formation and composition of poly(*R*)-3-hydroxyalkanoates and poly(*R*)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. Vol. 54. p. 2924–2932.

LAW, J. H., AND SLEPECKY. Assay of poly-3-hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 1961. Vol. 82. p. 33-36.

LEE, S. Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. 1996a. Vol. 14. p. 431-438.

LEE SY. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 1996b. Vol. 49. p. 1-14.

LEMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polimerization de 1 acide β -hidroxibutiric; *Bull Soc. Chem. Biol*, París. 1926. Vol. 8. p. 7770-7782

LEMOS, P., SERAFIM, L. Metabolic Pathway for Propionate Utilization by Phosphorus-Accumulating Organisms in Activated Sludge. ¹³C Labeling and In Vivo Nuclear Magnetic Resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. N° 1. p. 241-251.

LERCH, G. La experimentación de las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-técnica. La Habana. Capítulo 16. Análisis de Varianza. Clasificación triple. 1977. p. 251-277.

LÓPEZ, N. I. et al. Detection of reserve polymer synthesis in natural bacterial populations; *FEMS Microb. Ecol.* 1997. Vol. 22. p. 129-136.

LUTKE-EVERSLOH, T., A. STEINBUCHER. Identification of a new class of biopolymer, bacterial synthesis of a sulfurcontaining polymer with thioester linkages. *Microbiology*. 2001. Vol. 147. p. 11–19.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. Brock Microbiología de los Microorganismos. 10ª edición. Ed. Pearson. Madrid. p. 219

MADISON, L Y HUISMAN, G. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates). From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999. Vol. 63. N° 1. p. 21-53.

MALLICK N et al. Process optimization for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-co-polymer production by *Nostoc muscorum*. *Biochemical Engineering Journal*. 2007. Vol.37. p. 125–130

MARCHESSAULT, R.H. AND YU, G.-E. Crystallization and material properties of polyhydroxyalkanoates. En *Biopolymers* ed. Steinbüchel, A. 2004. p. 157–248.

MARTINEZ, J., et al. Producción de PHA en bacterias diazotrofas. I Influencia de la aereacion en la Síntesis de Poli- β - hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*, cepa 7.1. *Revista Biológica*. 2004. Vol. 18. N°1. p. 87-89

MAYER, F. Structural aspects of poly- β -hydroxybutyrate granules, En. Schlegel H. G.; A. Steinbüchel (eds.). *Bacterial polyhydroxyalkanoates poly- β -hydroxyalcanoic acid*. 1992. p. 265-268

MERGAERT J. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. Vol. 59. p. 3233-3238.

MOSKOWITZ, G. and MERRICK. Metabolism of poly-B-hydroxybutyrate. Enzymatic synthesis of D-(-)- β -hydroxybutyryl Coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*; *Biochemistry*. 1989. Vol. 8. p. 2748-2755.

MUKHOPADHYAY, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Rhodopseudomonas palustris* SP5212. *World J Microbiol Biotechnol.* 2005. Vol. 21. p. 765–769.

MURRAY, ROBERT., GRANNER, DARYL. Harper's Illustrated Biochemistry. 26^a Edicion. Ed. MacGrawHill. United States of America. 2003. p. 63-64.

NARENDRANATH, N. V., POWER, R. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71. p. 2239-2243.

NAUMANN, D. Microbiological characterisation by FTIR spectroscopy. *Nature* 1991. Vol. 351. p. 81–82.

OJUMU, T.V., YU, J. and SOLOMON, B. O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer (Minireview). *African Journal of Biotechnology*. 2004. Vol. 3. N° 1. p. 18-24.

OSTLE, A. G., Y J. G. HOLT. Nile blue A as a fluorescent strain for poly- β -hydroxybutyrate; *Appl. Environ. Microbiol.* 1982. Vol. 44. p. 238-241

PAGE, W. J. Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* Strain UWD in Beet Molasses Culture, *FEMS Microbiology Reviews*. 1992. Vol. 103. p. 149-158.

PAGE, W., AND TENOVE, J. Quantitation of Poly- β -Hydroxybutyrate by Fluorescence of Bacteria and Granules Stained with Nile Blue. *Biotech. Tech.* 1996. Vol. 10. N° 1. p. 215-217.

POIRIER, Y., et al. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol.* 1995. Vol. 13. p. 142-150.

RAMSAY, J. Separation of PHA from microbial biomass and its intracellular and extracellular biodegradation. *Memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial*. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. 2000.

RAMSAY, J. A., et al. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*. 1994. Vol. 8. p. 589-594.

REHM, B., KRÜGER, and STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. p. 24044–24051.

REVOL, J. F. et. al.,. High- resolution electron microscopy of poly(β -hydroxybutyrate); *Polymer*. 1989. Vol. 30. p. 1973-1976.

RIIS, V., MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr.* 1988. Vol. 445. p. 285-289.

RUBINSON, K., AND RUBINSON, J. *Química Analítica Contemporánea*. 1 ed. México. Pearson Education. 2000. p. 434-440.

SAITO, Y., DOI, Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas aeruginosa* AO-232 from ¹³C-labeled acetate and propionate. *Int. J. Biol. Macromol.* 1993. Vol. 15. p. 287-292.

SARUUL P., SRIENC, F., Production of a Biodegradable Plastic Polymer, Poly- β -Hydroxybutyrate, in Transgenic Alfalfa. *Crop Science*. 2002. Vol. 42. p. 919-927.

SCHEMBRI, M., A., et al. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* 1995. Vol. 177. p. 4501-4507.

SCHOLZ, C. Poly(b-hydroxyalkanoates) as potential biomedical materials. an overview. In. (Ed.) Scholz C, Gross RA. *Polymers from renewable resources – biopolymers and biocatalysis*. 2000, ACS series 764, p. 328-334.

SHIMIZU, H. Control of Molecular Weight Distribution and Mole Fraction in Poly(-D(-)-3-hydroxyalkanoates) (PHA) Production by *Alcaligenes eutrophus*. In. *Biodegradable Plastics and Polymers*, Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Elsevier Science B.V., New York. 1994. p. 365-372.

SUZUKI, T., et al. Control of molecular weight of poly-b-hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988. Vol. 27. p. 487-491.

SILVA C., GOMÉZ, L., PRIEFERT G., STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate-Producing Strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and Analysis of a Mutant Accumulating a Copolyester with Higher 3-Hydroxyvalerate Content. *Appl. Envir. Microbiol.* 2002. Vol. 68. P. 271-279.

SODIAN, R. Early *in vivo* experience with tissue- engineered trileaflet heart valves. *Circulation*. 2000.102(Suppl.3):III22-29.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In.(Ed.) Byrom D Biomaterials. novel materials from biological sources. Stockton, New York. 1991. p. 124-213.

STEINBÜCHEL, A. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolymer by *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993. Vol. 39. p. 443-449.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. Vol 128. P. 219-228.

STEINBÜCHEL, A. PHB and Other Polyhydroxyalkanoic Acids. In. *Biotechnology*, Rehm, H. J. and Reed, G. (eds.), VCH, New York. 1996. p. 403-464.

STHAL, P AND KLUG, M. Characterization And Differentiation Of Filamentous Fungi Basedon Fatty Acid Composition. Pensylvania. *Applied and Enviromental Microbiology*.1996. Vol. 62. p. 4136-4146.

STOREY, F. R. Syntesis and fabrication of completely absorbable composites for biomaterials; En biomateriales. Tockton Press, Inc., New York. 1991. p. 123-214.

SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y. Synthesis and properties of polyhydroxyalkanoates. biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 2000. Vol. 25. p. 1503-1555.

TAKEDA, M., et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a mutant of *Sphaerotilus natans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. Vol.44. p.37-42

TEH, J. S. Toxicity of Short-Chain Fatty Acids and Alcohols Towards *Cladosporium resinae*. *Appl. Microbiol.*1974. Vol. 28. N° 5. p. 840-844.

TIMM, A. and A. STEINBÜCHEL. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. Vol. 56. p. 3360–3367.

TSUCHIKURA, K. 'BIOPOL' Properties and Processing. In. *Biodegradable Plastics and Polymers*, Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Elsevier Science B.V., New York. 1994. p. 362-364.

URAKAMI, T., YASHIMA, K. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. p. 3970-3976.

VALENTIN, H., et al. Identifi-cation of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. Vol. 40. p. 710-716.

WANG F, LEE SY. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl Environ Microbiol.* 1997. Vol. 63. p. 3703–3706.

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

WILLIAM D. LUZIER, 'Materials Derived from Biomass/Biodegradable Materials,' National Academy of Sciences.1992. Vol. 89. p. 839-842.

WILLIAMS, D. R. et al. Production of a co-polyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid by *Rhodococcus ruber*. biosynthetic considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. Vol. 40. p. 717–723.

WILLIAMSON, D., and WILKINSON JF. The isolation and estimation of the poly-3-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* 1958. Vol. 19. p. 198–209.

WITHOLT, B. Bacterial Nutrition [online] “sine loco”. s.n. [cited on January 2004]. p. 2-8. Available from internet.<www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/Capitulo09/capitulo09.pdf.>

YAMANE, T., FUKUNAGA, M., AND LEE, Y. W. Increase PHB productivity by High-Cell-Density Fed-batch Culture of *Alcaligenes latus*, a Growth-Associated PHB Producer. *Biotechnol. and Bioeng.* 1996. Vol. 50. p. 197-202.

YU, H. et al. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch cultura of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. 1997. p. 28-32

YU J. Production of PHA from starch wastewater via organic acids. *J. Biotechnol.* 2001. Vol. 86. p. 105-112.

YÜKSEKDAĞ Z., et al. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology.* 2004. Vol. 3. N° 1. p. 63-66.

ZAGREBA, J., SAVENKOV, AND M. GINOVSKA. IR-spectrophotometric control of chemical composition of microbial biomass, 1990. p. 139–147. *In* Microbial conversions—fundamentals and application aspects. Zinatre, Riga, Latvia.

ZHANG, H., et al. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. Vol. 60. p. 1198–1205.

ANEXOS

Anexo A. Pruebas Duncan para cada grupo de datos de biomasa y PHA obtenido en la evaluación del efecto del pH y la temperatura

Tabla del contraste múltiple de rangos para la producción de biomasa en la evaluación de temperatura.

Metodo: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos homogeneos
T3=35°C	3	263,333	X
T1=19°C	3	296,667	X
T2=30°C	3	333,667	X Mejor tratamiento

Tabla del contraste múltiple de rangos para la producción de PHA en la evaluación de temperatura.

Meodod: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos homogeneos
T3=35°C	3	25,48	X
T1=19°C	3	93,9767	X
T2=30°C	3	121,487	X Mejor tratamiento

Tabla del contraste múltiple de rangos para la producción de biomasa en la evaluación de pH.

Metodo: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos homogeneos
pH=6.0	3	266,667	X
pH=6.5	3	310,0	X
pH=7.0	3	410,0	X Mejor tratamiento

Tabla del contraste múltiple de rangos para la producción de PHA en la evaluación de pH.

Metodo: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos Homogeneos
pH=6.0	3	21,9933	X
pH=6.5	3	83,62	X
pH=7.0	3	100,127	X
			Mejor tratamiento

Anexo B. Pruebas Duncan para cada grupo de datos de Biomasa y PHA obtenido en la evaluación del efecto de ácidos grasos de cadena corta

Tabla de rangos múltiples para determinación de biomasa en los tratamientos: Testigo, Ácido Butírico y Acido propiónico

Metodo: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos homogeneos
Butirato	3	43,3333	X
Propionato	3	300,0	X
Testigo	3	663,667	X

Tabla de rangos múltiples para determinación de PHA en los tratamientos: Testigo, Ácido Butírico y Acido propiónico

Metodo: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos homogeneos
Butirato	3	3,97767	X
Propionato	3	35,305	X
Testigo	3	91,5203	X

Anexo C. Cuantificación del copolímero poli-(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

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 explican esta relación son

Derivado metilado del ácido butírico

$$y = 6,0929x - 37,260$$

con $R^2 = 0,9987$

Derivado metilado del ácido valérico

$$y = 6,0909x - 19,955$$

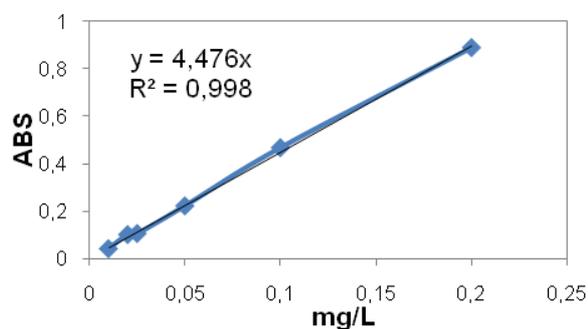
con $R^2 = 0,9988$

Las ecuaciones tienen un coeficiente de determinación (R^2) relativamente alto lo indica que tienen un alto grado de confiabilidad.

Por medio de la pendiente de la recta asociada a cada ecuación se determinó el factor de respuesta (Rf) por lo tanto se estima que el factor de respuesta para la cuantificación de los metil ésteres 3HB y 3HV corresponden a 6,0929 y 6,0909 respectivamente.

Anexo D. Curva de calibración obtenida mediante el método de Dubois para la cuantificación de carbono total.

Concentración mg/l	Absorbancia
0,01	0,0402
0,02	0,0994
0,025	0,1042
0,05	0,2206
0,1	0,4658
0,2	0,8872



Anexo E. Diagrama de flujo de la metodología

