

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE  
POLIHIDROXIBUTIRATO PRODUCIDO POR *Bacillus megaterium* B2 A  
PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

**LILIANA LISETH LÓPEZ CALA  
ELIANA ROCIO PINZÓN CÁRDENAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2016**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE  
POLIHIDROXIBUTIRATO PRODUCIDO POR *Bacillus megaterium* B2 A  
PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

**LILIANA LISETH LÓPEZ CALA  
ELIANA ROCIO PINZÓN CÁRDENAS**

**Trabajo de investigación presentado como requisito  
para optar al título de Ingeniero Químico**

**Directora**

**Ph. D MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA  
Química, Ph. D.**

**Codirector (es)**

**CAROLINA GUZMÁN LUNA  
Microbióloga, Ph. D.**

**VÍCTOR ALEXIS LIZCANO GONZÁLEZ  
Ing. Químico**

**CENTRO DE ESTUDIOS E INVESTIGACIONES AMBIENTALES  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2016**

## **DEDICATORIA**

Inicialmente deseo dedicarle este proyecto a todos los que creyeron en mí, a toda la gente que me apoyo, a mis amigos y familiares y ha esta institución que me ha formado y en especial a mi Dios por darme la oportunidad y la dicha de la vida, por brindarme la inteligencia, sabiduría, paciencia, entendimiento y la capacidad para llevar a cabo mis estudios ya que sin él no lo hubiera podido lograr.

Para mi **MADRE** adorada Dora Cala, por compartir mis alegrías y mis llantos, por celebrar mis éxitos y ayudarme a superar los problemas, por tus rezos y tus sacrificios... **TE AMO y ERES MI EJEMPLO.**

Para mi **PADRE** querido Benjamín López, por tu paciencia, por tus palabras sabias y por tu apoyo.

Para mis hermanitas Laura Lorena y Dora Lisbeth que constantemente han estado hay apoyándome.

Para mi novio Noé Solano, por brindarme incondicionalmente tu cariño, una palabra de aliento cuando parecía que me iba a rendir, por ayudarme sin esperar nada a cambio y por tu comprensión en todo momento... **TE QUIERO**

Para mi compañera Eliana, por brindarme tu respeto y amistad, en haber compartido solidaridad, dificultades y alegrías, durante todo el proceso de nuestro trabajo de graduación y superando obstáculos para alcanzar un objetivo en común.

Para mí, porque esta tesis forma parte de una etapa de mi vida llena de recuerdo, especiales que me acompañaran siempre... **POR LOS RETOS FUTUROS!!!**

**Liliana Liseth López Cala**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Blanca Rosa y Jorge Elías, por darme la vida, el amor y el apoyo para superar cada obstáculo en este largo camino, por sus consejos, valores y motivación constante.*

*A mis hermanos, Miguel, Jorge y José Alejandro, por su apoyo, comprensión y compañía.*

*A mi tía Margarita, por ayudarme y acompañarme durante todo este proceso para llegar a la meta.*

*A mis Primos, Mónica, Astrid y Jaime, por su respaldo incondicional.*

*A toda mi familia, que es lo más valioso que Dios me ha dado.*

***Eliana Rocío Pinzón.***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por la vida, la familia, los amigos y la oportunidad de realizar este trabajo y llegar a este momento.

A la doctora Marianny Combariza por su confianza, por su apoyo y guía durante todo el proceso.

Al Ing. Víctor Lizcano, por su paciencia, disponibilidad y capacidad para orientarnos.

A la doctora Carolina Guzmán, por su contribución en el desarrollo de este trabajo.

A la Institución y a nuestros maestros por sus esfuerzos para formarnos como profesionales, y en general a todos los que de una u otra forma hicieron posible este trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION .....	17
1. METODOLOGÍA .....	27
1.1 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	27
1.2 FERMENTACIÓN .....	28
1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	28
1.3.1 Cuantificación de Biomasa.....	28
1.3.2 Cuantificación de PHB .....	28
1.4 EXTRACCIÓN .....	29
1.4.1 Lavado con agua destilada .....	30
1.4.2 Pretratamiento .....	30
1.4.3 Digestión .....	31
1.4.4 Tratamiento Térmico.....	31
1.4.5 Lavado con agua destilada .....	31
1.4.6 Lavado con solvente .....	32
1.4.7 Secado.....	32
1.5 CARACTERIZACIÓN DEL PHB .....	32
1.5.1 Caracterización mediante análisis termogravimétrico (TGA) .....	32
1.5.2 Caracterización mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	32
1.6 PRUEBAS PRELIMINARES .....	33
2. RESULTADOS.....	35
2.1 FERMENTACIÓN .....	35
2.2 EXTRACCION .....	35
2.2.1 Lavados con agua destilada .....	36
2.2.2 Pretratamientos.....	36
2.2.3 Digestión con SDS.....	37
2.2.4 Tratamiento Térmico.....	37
2.2.5 Lavados con agua destilada .....	37
2.2.6 Lavado con solvente .....	37

2.2.7 Secado.....	38
2.3 CARACTERIZACION DEL PHB .....	38
2.3.1 Caracterización mediante análisis termogravimétrico (TGA) .....	38
2.3.2 Caracterización mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	41
2.4 PRUEBAS PRELIMINARES .....	43
3. CONCLUSIONES .....	45
4. RECOMENDACIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	53

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Metodología de trabajo .....	27
Figura 2. Etapas propuestas de la metodología de extracción de PHB. ....	30
Figura 3. Pureza del PHB extraído. ....	36
Figura 4. Pellet después de 48 horas de secado. ....	38
Figura 5. Curvas de TGA para el patrón de PHB y PHB extraído. ....	39
Figura 6. Curva de DSC para el patrón de PHB. ....	41
Figura 7. Curva de DSC para el PHB extraído. ....	41
Figura 8. Pureza obtenida con microondas. ....	44
Figura 9. Pureza obtenida con ultrasonido. ....	44

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Pureza del PHB Extraído. ....	35
Tabla 2. Td para el patrón de PHB y PHB extraído. ....	40
Tabla 3. Resultados de DSC para el patrón de PHB y PHB extraído. ....	42

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Cuantificación de biomas y PHB durante la fermentación.....	54
Anexo C. Curvas de la derivada de TGA .....	59
Anexo D. Cálculo del grado de cristalinidad ( $X_c$ ) %:.....	61
Anexo E. Curvas de DSC para cada una de las muestras .....	63

## NOMENCLATURA

PHB	Polihidroxitirato	
PHAs	Polihidroxicanoatos	
SDS	Dodecil-sulfato de Sodio	
TGA	Análisis Termogravimétrico	
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido	
NaOH	Hidróxido de Sodio	
NaClO	Hipoclorito de Sodio	
EDTA	Ácido Etilendiaminotetra-acético	
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea	
T <sub>m</sub>	Temperatura de Fusión	
X <sub>c</sub>	Grado de cristalinidad	
T <sub>d</sub>	Temperatura de degradación	
UFC	Unidades Formadoras de Colonias	
LPS		Lipopolisacáridos

## RESUMEN

**TITULO:** EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE POLIHIDROXIBUTIRATO PRODUCIDO POR *Bacillus megaterium B2* A PARTIR DE GLICEROL CRUDO\*

**AUTORES:** LILIANA LISETH LÓPEZ CALA  
ELIANA ROCIO PINZÓN CÁRDENAS\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Polihidroxitirato, *Bacillus megaterium* extracción purificación caracterización

### CONTENIDO:

La contaminación ambiental causada por la acumulación de plásticos derivados del petróleo ha motivado la búsqueda de materiales biodegradables como los PHAs. El polihidroxitirato (PHB) es producido por diferentes microorganismos como *Bacillus megaterium*, a partir de fuentes de carbono baratas como el glicerol crudo. Uno de los aspectos claves en el proceso de producción es la extracción y purificación del polímero. En este trabajo se desarrolló una metodología de extracción de PHB producido por *Bacillus megaterium B2* a partir de glicerol crudo como única fuente de carbono utilizando dodecil-sulfato de sodio (SDS) como agente digestor y evaluando diferentes opciones de pretratamiento. Los ensayos realizados incluyeron: Un pretratamiento (sin pretratamiento, lisis asistida por ultrasonido, lisis celular con NaOH y NaClO) seguido de, digestión con SDS, tratamiento térmico, lavado con agua destilada, lavado con solvente y secado. El PHB extraído fue caracterizado mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). La mayor pureza del polímero se obtuvo utilizando NaClO como pretratamiento, adicionalmente se observó que, la etapa con mayor impacto en la extracción fue el lavado con agua destilada después del tratamiento térmico. Las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) y de degradación ( $T_d$ ) obtenidas para el PHB extraído están dentro del rango reportado en la literatura para este polímero.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-químicas. Escuela de Ingeniería Química.

Directora: COMBARIZA Marianny Yajaira Química, Ph D. Co-director: GUZMÁN LUNA Carolina Ph. D, LIZCANO Victor Alexis Ing. Químico.

## ABSTRACT

**TITLE:** EXTRACTION AND CHARACTERIZATION PHYSICOCHEMICAL POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCED BY *Bacillus megaterium* B2 FROM GLYCEROL RAW\*

**PROJECT'S AUTHORS:** LILIANA LISETH LÓPEZ CALA  
ELIANA ROCIO PINZÓN CÁRDENAS\*\*

**KEY WORDS:** Polyhydroxybutyrate, *Bacillus megaterium*, extraction, purification, characterization.

### CONTENTS:

Environmental pollution caused by the accumulation of petroleum-based plastics has aimed at finding of biodegradable materials such as PHAs. Polyhydroxybutyrate (PHB) is produced by various microorganisms as *Bacillus megaterium* from cheap carbon sources such as crude glycerol. One of the key aspects of the production process is the extraction and purification of the polymer. This paper presents a methodology for extracting PHB produced by *Bacillus megaterium* B2 evolved from crude glycerol as sole carbon source using dodecylsulfate sodium (SDS) and digesting agent, evaluating different pretreatment options and the contribution of each. Tests conducted included: A pretreatment (without pretreatment, power ultrasound lysis, cell lysis with NaOH and NaClO) followed, SDS digestion, heat treatment, washing with distilled water, solvent washing and drying. PHB extracted was characterized by thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). The higher purity of the polymer is obtained using NaClO as pretreatment, it is additionally noted that the stage with the greatest impact in the extraction was washed with distilled water after heat treatment. The melting temperatures ( $T_m$ ) and degradation ( $T_d$ ) obtained for PHB are extracted within the range reported in the literature for this polymer.

---

\* Work degree

\*\* Physical-chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Ph. D. YAJAIRA COMBARIZA Marianny. Co-director: Ph. D. GUZMÁN LUNA Carolina, Chemical engineering LIZCANO Victor Alexis.

## INTRODUCCION

Desde el siglo XIX los plásticos derivados del petróleo han ayudado a satisfacer necesidades del ser humano hasta el punto de convertirse en productos indispensables para la vida diaria moderna.<sup>1</sup> Los múltiples usos de los polímeros sintéticos se derivan de sus propiedades físicas como, elasticidad y flexibilidad y químicas como, resistencia a la corrosión y baja reactividad. Sin embargo, los plásticos generan impactos ambientales negativos,<sup>2</sup> como la emisión de gases con efecto invernadero (metano, dióxido de carbono y óxido nitroso), alto consumo energético durante su producción, su acumulación como residuos sólidos y el uso del petróleo para su producción, el cual es un recurso no renovable con reservas limitadas.<sup>3</sup>

La producción de plásticos a nivel mundial aumentó en 15 millones de toneladas del 2009 al 2010, lo que equivale a un aumento del 6%, la proyección para el 2015 era de 297 millones de toneladas.<sup>4</sup> Debido al incremento en la demanda de los materiales y a los impactos mencionados anteriormente, es necesario desarrollar materiales biodegradables que los puedan reemplazar.

Una alternativa atractiva para reemplazar los plásticos convencionales, son los biopolímeros tales como: poliésteres alifáticos (polihidroxicanoatos (PHAs)), polisacáridos o sus mezclas. Los PHAs son poliésteres de diversas unidades de hidroxialcanoatos, con propiedades similares a la de los polímeros sintéticos y con alta biodegradabilidad. Los PHAs se sintetizan por gran variedad de microorganismos empleando fuentes de carbono variadas (azúcares, alcoholes,

---

<sup>1</sup> MEDINA TINOCO, R. Plásticos Biodegradables. ¿Cómo ves?, 2005, p. 23-24

<sup>2</sup> RODRÍGUEZ CONTRERAS, A., KOLLER, M., MIRANDA DE SOUSA DIAS, M., CALAFELL MONFORT, M., BRAUNEGG, G., & MARQUÉS CALVO, M. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. En: *Journal of Applied Microbiology*, 2013, p. 1378-1381. ISSN 1364-5072, doi:10.1111/jam.12151

<sup>3</sup> MEDINA TINOCO, R., Op. Cit.

<sup>4</sup> LUNT, J. and ASOCIATES. Marketplace Opportunities for Integration of Biobased and Conventional Plastics. 6. 2014

etc.),<sup>5</sup> en condiciones de exceso y con limitaciones de uno o varios nutrientes. Los PHAs se acumulan intracelularmente alcanzado hasta un 90% del peso seco de las células.<sup>6</sup>

El polihidroxitirato (PHB) es el PHA más estudiado y de mayor producción actualmente, cuenta con propiedades termoplásticas y mecánicas parecidas a algunos plásticos como el polipropileno, con la diferencia de éste último en que se degrada completamente sin dejar ningún residuo indeseable.<sup>7</sup> El PHB promete ayudar a solucionar problemas con relación al medio ambiente y la administración de residuos sólidos.<sup>8</sup> La acumulación de estos polímeros es considerada como una estrategia de las bacterias para aumentar su supervivencia en un entorno cambiante ya que se acumulan como una reserva de carbono y energía.<sup>9</sup>

Existen más de 75 microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos aptos para almacenar PHB intracelularmente en forma de gránulos. Sin embargo aunque las bacterias Gram-negativas alcanzan altas acumulaciones, estas pueden ser desventajosas para las aplicaciones biomédicas debido a que poseen lipopolisacáridos (LPS), que se pueden extraer junto con el PHA en las etapas de purificación. Los LPS actúan como endotoxinas y puede causar reacciones

---

<sup>5</sup> RODRÍGUEZ CONTRERAS, A., KOLLER, M., MIRANDA DE SOUSA DIAS, M., CALAFELL MONFORT, M., BRAUNEGG, G., & MARQUÉS CALVO, M., Op. Cit.

<sup>6</sup> REDDY, C., GHAI, R. R. y KALIA, V. Polyhydroxyalcanoates: an overview. En: Bioresource Technology 87, 2003, p. 137-146.

<sup>7</sup> PATEL, Martin. MARSCHIEDER-WEIDEMANN, Frank. SCHLEICH, Joachim. HÜSING, Bärbel y ANGERER, Gerhard. Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe. Technical Report EUR, 22103, 2005.

<sup>8</sup> LOPEZ, J., NARANJO, J., HIGUITA, J., CUBITTO, M., CARDONA, C., and VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a New Isolated Bacillus megaterium Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Eng, 2012, p. 250-258.

<sup>9</sup> BHAGOWATI, P., PRADHAN, S., DASH, H. R., y DAS, S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by Bacillus spp. En: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1-8. 2015. doi:10.1080/09168451.2015.1034651

inmunológicas.<sup>10,11</sup> En contraste las bacterias Gram-positivas carecen de estas endotoxinas pero poseen una capa de peptidoglicano mucho más gruesa que hace su pared celular más resistente.<sup>12</sup> Entre las bacterias Gram-positivas se destacan las cepas de *Bacillus*, por tener un rápido crecimiento, metabolizar varios sustratos, soportar altas presiones osmóticas y altas temperaturas.<sup>13</sup> *Bacillus* fue el primer género Gram-positiva identificado capaz de almacenar PHAs en condiciones de limitación de nutrientes en diversas fuentes de carbono refinadas.

El principal inconveniente en la producción de PHB a nivel industrial es el costo de la fuente de carbono, ya que oscila del 25-45% de los costos totales de producción,<sup>14</sup> por lo que surge la necesidad de encontrar fuentes de carbono más baratas, como los residuos agrícolas o industriales para la producción del biopolímero. El glicerol crudo, es uno de los principales subproductos generado durante la producción de biodiesel, y representa una alternativa para este problema,<sup>15</sup> ya que en promedio se obtiene un 10% en peso de glicerol durante la producción del biodiesel convirtiéndolo actualmente en un desecho, debido a que el exceso ha causado una disminución importante del precio en el mercado.<sup>16</sup>

---

<sup>10</sup> FACCINI, D., RECH, R., SECCHI, A., CARDOZO, N., y AYUB, M. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Conventional Plastics*, 2013, p. 420-425.

<sup>11</sup> VALAPPIL, S. P., BOCCACCINI, A. R., BUCKE, C. y ROY, I. POLYHYDROXYALKANOATES in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 2007, p. 1-17. doi:10.1007/s10482-006-9095-5

<sup>12</sup> MARTINEZ DE TEJADA, G., SÁNCHEZ-GÓMEZ, S., KOWALSKI, I. K., ANDRÄ, J., SCHÜRHOHL, T., HORNEF, M. y BRANDENBURG, K. Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. *NIH-PA Author Manuscript*, 2012, p. 1121-1130.

<sup>13</sup> LOPEZ, J., NARANJO, J., HIGUITA, J., CUBITTO, M., CARDONA, C., and VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. *En: Biotechnology and Bioprocess Eng*, 2012, p. 250-258.

<sup>14</sup> NATH, A., DIXIT, M., BANDILLA, A., CHAVDA, S. y DESAI, A. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *En: Bioresource Technology*, 99, 2008, p. 5747-5755. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.017

<sup>15</sup> LOPEZ, J., NARANJO, J., HIGUITA, J., CUBITTO, M., CARDONA, C., and VILLAR, M., *Op. Cit.*

<sup>16</sup> POSADA, J. A., NARANJO, J. M., LÓPEZ, J. A., HIGUITA, J. C., & CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *En: Process Biochemistry*, 46, 2011, p. 310- 317. doi:10.1016/j.procbio.2010.09.003

El Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM) ha realizado diferentes trabajos en la investigación sobre la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus megaterium* a partir de glicerol residuo de la industria de biodiesel como única fuente de carbono. Se han estudiado las variables óptimas de cultivo para la producción de PHB alcanzando concentraciones de 1,20 g/L utilizando un biorreactor de 7,5L. Estos resultados demuestran el potencial de *Bacillus megaterium* como productor de PHB utilizando glicerol como fuente de carbono.<sup>17</sup>

Como complemento con los estudios realizados por Moreno *et. al* 2015 se debe realizar un estudio en la extracción del PHB teniendo en cuenta que es un aspecto clave en el proceso de producción,<sup>18</sup> pues para mantener la competitividad, la extracción debe ser de bajo costo,<sup>19</sup> debe garantizar la pureza y recuperación del PHB con el mínimo impacto ambiental. La extracción se lleva a cabo generalmente en dos fases, en la primera se debe destruir la membrana celular y en la segunda separar el PHB de la biomasa residual. Se han desarrollado diversos métodos de extracción del biopolímero dentro de los cuales se encuentra la extracción con solventes, digestión química o enzimática, y la extracción y digestión simultánea.<sup>20</sup>

El uso de solventes para la extracción de PHB es uno de los métodos más antiguos y de mayor uso. El solvente modifica la permeabilidad de la membrana celular y extrae el PHB. Los solventes más utilizados son hidrocarburos clorados

---

<sup>17</sup> MORENO, P., YAÑEZ, C., MEDEIROS, N., ESCALANTE, H., COMBARIZA, M. y GUZMAN, C. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology*, 32, 2015, p. 682-689.

<sup>18</sup> LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y.-H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1 blue. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 2011, p. 240-246. doi:10.1016/j.jtice.2010.08.001

<sup>19</sup> JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). En: *Biochemical Engineering Journal*, 39, 2008, p. 15-27. doi:10.1016/j.bej.2007.11.029

<sup>20</sup> KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. En: *Biotechnology Letters*, 25, 2003, p. 55-59.

(cloroformo, 1,2.dicloroetano, cloruro de metilo), carbonatos cíclicos (carbonato de propileno y etileno), que se caracterizan por dar un producto con alta pureza y no degradar el biopolímero.<sup>21</sup> La clave para elegir el solvente más adecuado es la solubilidad del PHB en éste. La recuperación del polímero se realiza mediante precipitación o evaporación del solvente.<sup>22</sup> A pesar de las ventajas de la técnica, el uso de estas sustancias contradice el aspecto medioambiental del biopolímero debido a su alta toxicidad y la excesiva cantidad en que se requieren.<sup>23</sup>

Por otra parte, la digestión es un método que permite destruir componentes de la membrana celular como lípidos, carbohidratos, proteínas y enzimas mediante diferentes productos químicos, por ejemplo, compuestos alcalinos, hipoclorito de sodio, dodecil-sulfato de sodio (SDS), ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), soluciones enzimáticas, aunque el costo de esta última es mayor que el de cualquier otro método. Cada sustancia puede digerir diferentes partes del microorganismo.<sup>24</sup> El hipoclorito de sodio provoca en la mayoría de casos degradaciones severas de PHB lo que resulta en la reducción del peso molecular en un 50%.<sup>25</sup> Para evitar esto se ha planteado el uso de hipoclorito de sodio con cloroformo, sin embargo este aún no es rentable.<sup>26</sup> En este proceso el PHB se disuelve inicialmente en el cloroformo, el cual lo protege de la degradación,<sup>27</sup> otra solución a este inconveniente es utilizar una solución diluida de NaClO.<sup>28</sup>

---

<sup>21</sup> JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). En: Biochemical Engineering Journal, 39, 2008, p. 15-27. doi:10.1016/j.bej.2007.11.029

<sup>22</sup> LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y.-H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant Escherichia coli XL1 blue. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 2011, p. 240-246. doi:10.1016/j.jtice.2010.08.001

<sup>23</sup> KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of Ralstonia eutropha by direct addition of sodium dodecyl sulfate. En: Biotechnology Letters, 25, 2003, p. 55-59.

<sup>24</sup> LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y. H., Op. Cit.

<sup>25</sup> JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S., Op. Cit.

<sup>26</sup> LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y. H., Op. Cit.

<sup>27</sup> JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S., Op. Cit.

<sup>28</sup> SEI KWANG, Hahn; YONG KEUN, Chang y SANG YUP, Lee. Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in Alcaligenes eutrophus and Recombinant Escherichia coli. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 61, 1995, p. 34-39.

El uso de detergentes degrada componentes de la membrana celular dejando intacto el PHB. Un método optimizado a base de detergente podría dar un alto rendimiento de recuperación y ser aplicado a cualquier PHA independientemente de la composición del monómero además de ser más seguro para el medio ambiente que los disolventes halogenados. Sin embargo, los métodos basados en surfactantes, implican en muchos casos el uso de otros agentes tales como el hipoclorito e hidróxido de sodio, además una alta dosis de tensoactivo lo cual aumenta el costo de recuperación y puede causar problemas en el tratamiento de aguas residuales.<sup>29</sup> Así mismo el porcentaje de pureza que se obtiene depende de la cantidad de biopolímero que esté almacenado en las células.<sup>30</sup>

En este aspecto, Yang y colaboradores<sup>31</sup> reportaron purezas del 95% para la purificación del PHA producido por la cepa *Ralstonia eutropha* empleando 5% (p/v) de SDS y tiempo de incubación de 3-6 horas, por otra parte Kim<sup>32</sup> aplicando SDS directamente al caldo de cultivo en una relación superior a 0,4 (p/p) obtuvo una pureza mayor al 95% para *Ralstonia eutropha*. Finalmente, Lo y colaboradores,<sup>33</sup> alcanzaron 99% de pureza para la cepa *E.coli* utilizando digestiones con SDS y NaOH. Es interesante observar que las investigaciones para la aplicación de este método se han centrado en la producción con bacterias Gram negativas, siendo poca la información en la literatura sobre la aplicación en cepas Gram positivas

---

<sup>29</sup> SEI KWANG, Hahn; YONG KEUN, Chang y SANG YUP, Lee. Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 61, 1995, p. 34-39.

<sup>30</sup> THAKOR, N., LU"TKKE-EVERSLOH, T. y STEINBU"CHEL, A. Application of the BPEC Pathway for Large-Scale Biotechnological Production of Poly(3-Mercaptopropionate) by Recombinant *Escherichia coli*, Including a Novel In Situ Isolation Method. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 71, 2005, p. 835-841. doi:10.1128/AEM.71.2.835-841.2005

<sup>31</sup> YANG, Y.-H., BRIGHAM, C., WILLIS, L., RHA, C. y SINSKEY, A. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). En: Biotechnol Lett, 2011. doi:10.1007/s10529-010-0513-4

<sup>32</sup> KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. En: Biotechnology Letters, 25, 2003, p. 55-59.

<sup>33</sup> LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y.-H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1 blue. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 2011, p. 240-246. doi:10.1016/j.jtice.2010.08.001

como lo es *Bacillus megaterium*. Por esta razón se hace necesario estudiar la técnica para evaluar su aplicabilidad en nuestro proceso, ya que como se ha mencionado anteriormente el espesor de la pared celular de las bacterias Gram positivas dificulta el proceso de extracción.<sup>34</sup>

La extracción por digestión del PHB se realiza en diferentes etapas: pretratamiento, digestión con SDS, tratamiento térmico, lavados con agua y solvente. Cada etapa tiene un efecto específico sobre la membrana celular. El propósito de la etapa de pretratamiento es promover la disrupción celular<sup>35</sup> y facilitar la liberación del PHB, logrando así un aumento en el rendimiento de la extracción. Entre los pretratamientos más usados se encuentran el método asistido con ultrasonido donde los procesos de cavitación acústica promueven el rompimiento de la pared celular, por otra parte, compuestos como el NaOH y el NaClO también se emplean porque promueven una lisis celular efectiva.<sup>36</sup> En la etapa de digestión con SDS se rompe la membrana celular mediante alteración de la bicapa lipídica lo que hace que aumente el volumen de la célula. Durante este proceso se generan micelas de SDS y fosfolípidos y el PHB se libera.<sup>37</sup> La degradación de PHB causada por la digestión es prácticamente insignificante. El método de digestión con SDS es un método muy conveniente, eficaz y económico que se puede aplicar fácilmente a los cultivos con alta densidad celular.<sup>38</sup>

---

<sup>34</sup> WU, Q., HUANG, H., HU, G., CHEN, J., HO, K. y CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, p. 111-118.

<sup>35</sup> JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *En: Biochemical Engineering Journal*, 39, 2008, p. 15-27. doi:10.1016/j.bej.2007.11.029

<sup>36</sup> DOBROTH, Z. T., WU, S., COATS, E. R., y McDONALD, A. G. (). Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *En: Bioresource Technology*, 102, 2011, p. 3352-3359. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.053

<sup>37</sup> JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S., Op. Cit.

<sup>38</sup> KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *En: Biotechnology Letters*, 25, 2003, p. 55-59.

Otras etapas esenciales en el tratamiento son; el tratamiento térmico el cual ayuda a romper la célula y a mejorar la pureza del polímero recuperado debido al cambio drástico de la temperatura (90°C),<sup>39,40</sup> y finalmente las etapas de lavado con agua o solventes como el etanol que ayudan a eliminar restos de material celular como proteínas y glucógeno aumentando la pureza del PHB.<sup>41</sup>

Una vez extraído el polímero, es importante estudiar sus propiedades térmicas ya que estas características determinan su procesabilidad y aplicación. Dentro de las propiedades más estudiadas están la temperatura y entalpía de fusión ( $T_m$  y  $\Delta H_m$  respectivamente) que determinan el estado morfológico del biopolímero. La diferencia entre la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y la temperatura de descomposición ( $T_d$ ) define el rango para el procesamiento de un polímero.<sup>42</sup> Por otra parte la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es un parámetro importante al momento de determinar la aplicabilidad del material.<sup>43</sup> Entre las técnicas más comunes para la caracterización térmica del polímero están: la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC *Differential Scanning Calorimetry*) y el Análisis Termogravimétrico (TGA *Thermogravimetric Analysis*).

El DSC, es una técnica experimental que ayuda a calcular la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia cuando es sometida a una temperatura constante

---

<sup>39</sup> LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y.-H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1 blue. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 2011, p. 240-246. doi:10.1016/j.jtice.2010.08.001

<sup>40</sup> KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *En: Biotechnology Letters*, 25, 2003, p. 55-59.

<sup>41</sup> YANG, Y.-H., BRIGHAM, C., WILLIS, L., RHA, C. y SINSKEY, A. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *En: Biotechnol Lett*, 2011. doi:10.1007/s10529-010-0513-4

<sup>42</sup> ROHINI, D., PHADNIS, S. y RAWAL, S. K. Synthesis and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. *En: Indian Journal of Biotechnology*, 5, 2006, p. 276-283.

<sup>43</sup> VALAPPIL, S., MISRA, S., BOCCACCINI, A., KESHAVARZ, T., BUCKE, C. y ROY, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *En: Journal of Biotechnology*, 2007, p. 251-258. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.03.013

durante un tiempo determinado. También permite determinar las medidas de capacidad calorífica aparente (fenómenos de relajación estructural), temperaturas características de formación o de transición tales como: transición vítrea, transición ferro-paramagnética, cristalización, transformaciones polimórficas, punto de fusión, punto de ebullición, sublimación, descomposición, isomerización entre otras.<sup>44,45</sup> En general en esta técnica se puede observar la estabilidad térmica y la cinética de cristalización de los materiales, así como la caracterización completa de sus transiciones. Para el análisis DSC se dispone de dos cápsulas, una de ellas con la muestra a analizar y la otra generalmente vacía es llamada cápsula de referencia. En la medición se detecta cualquier diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia y se corrige de tal forma que las temperaturas en ambas cápsulas se mantengan igual.<sup>46</sup>

Por otro parte el TGA es una técnica de análisis térmico que permite estudiar el patrón de descomposición y la estabilidad térmica de los polímeros como una función del incremento de la temperatura (velocidad de calentamiento constante) o como una función del tiempo (temperatura constante) en una atmósfera controlada. Específicamente el TGA se usa para determinar la pérdida o ganancia de masa debido a la descomposición u oxidación, o la pérdida de volátiles (tales como la humedad). Las aplicaciones más comunes de TGA son: la caracterización de materiales a través del análisis de los patrones de descomposición característicos, el estudio de los mecanismos de degradación y la determinación del contenido orgánico e inorgánico de una muestra (por ejemplo, cenizas).<sup>47</sup>

---

<sup>44</sup> YEZZA, A., HALASZ, A., LEVADOUX, W. y HAWARI, J. (). Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. En: Appl Microbiol Biotechnol, 77, 2007, p. 269-274. doi:10.1007/s00253-007-1158-7

<sup>45</sup> SURINACH, S., BARO, M., BORDAS, S., CLAVAGUERA, N. y CLAVAGUERA-MORA, M. T. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. En: BOL. SOC. ESP. CERAM. VIDR, 31, 1992, p. 11-17.

<sup>46</sup> *Ibíd.*

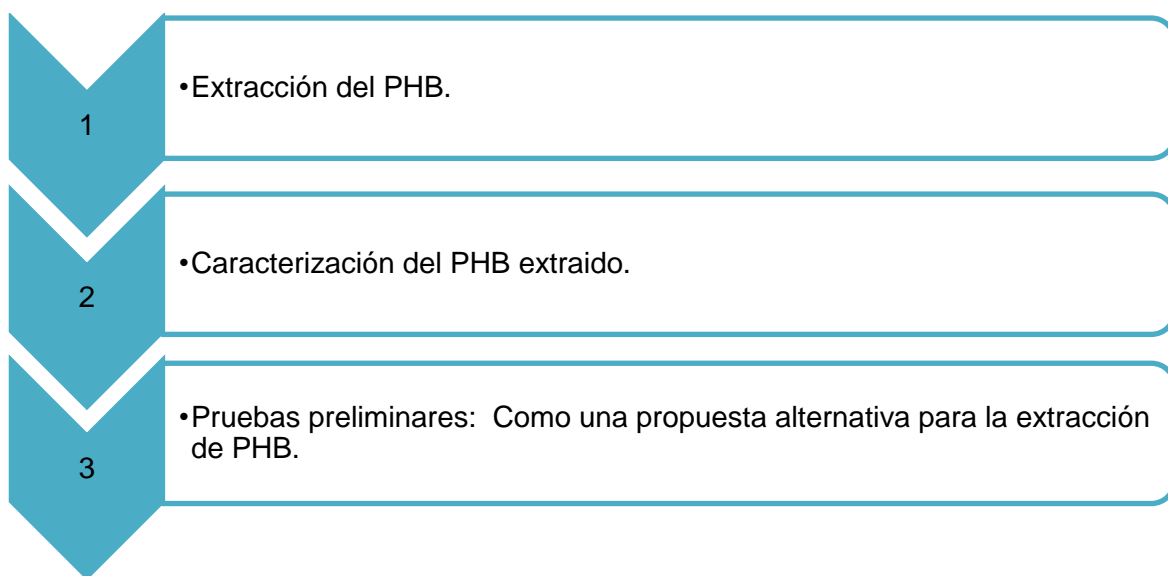
<sup>47</sup> SHARMA, P. y BAJAJ, B. K. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, p. 241-248. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.008

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente el objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología de extracción de PHB producido por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo como única fuente de carbono. La extracción se realizó utilizando dodecil-sulfato de sodio (SDS) como agente digestor y la caracterización fisicoquímica del PHB recuperado se hizo mediante DSC y TGA. Como objetivos específicos se realizó la evaluación de diferentes opciones de pretratamiento previas a la digestión con dodecil-sulfato de sodio (SDS) y la determinación de la contribución de cada una de las etapas implementadas en la metodología de extracción. Para la caracterización fisicoquímica del PHB extraído se determinaron la temperatura de degradación ( $T_d$ ), temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_m$ ), grado de cristalinidad ( $X_c$ ), mediante las técnicas de Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría diferencial de Barrido (DSC) respectivamente.

## 1. METODOLOGÍA

La metodología de trabajo consistió en tres etapas principales como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Metodología de trabajo



### 1.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

Los reactivos empleados fueron grado analítico. El glicerol crudo empleado fue obtenido de una empresa Colombiana productora de Biodiesel. Los cultivos bacterianos se realizaron en un biorreactor BioFlo® / CelliGen® 115 (Eppendorf). Las digestiones y cultivos de preinóculos se realizaron en un agitador orbital Unimax 1010 acoplado a un sistema Inkubator 1000 (Heidolph). El pretratamiento con sonicación se llevó a cabo en un equipo Branson 3510 (Branson Ultrasonic Cleaning Baths). La cuantificación de PHB se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido UltiMate 3000 Rapid Separation LC Systems (Thermo Scientific Dionex). Las pruebas térmicas de DSC y TGA se realizaron en un equipo Discovery series DSC (TA instruments) y Discovery series TGA (TA instruments) respectivamente.

## 1.2 FERMENTACIÓN

Se realizaron cultivos de *B. megaterium* B2 en un biorreactor de 7.5 L con un volumen inicial de trabajo de 4 L a 34°C, pH de 7 y agitación de 400 rpm, en un proceso batch utilizando glicerol crudo como única fuente de carbono. Los sustratos limitantes del proceso son el oxígeno y la fuente de carbono. Para la alimentación continua se utilizó glicerol a 484 g/L y nitrógeno de 18 g/L, siguiendo la metodología descrita en Moreno.<sup>48</sup> Se realizó un seguimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) con el fin de determinar posible contaminación del cultivo, la concentración de biomasa, PHB y glicerol.

## 1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

**1.3.1 Cuantificación de Biomasa.** Para la cuantificación de biomasa se tomó un volumen entre 18 ml y 15 ml de muestra, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos en tubos previamente pesados. El sedimento celular se secó en un horno a 80 °C durante 12 horas. Posteriormente se pesó y se calculó la concentración de biomasa en g/L.

**1.3.2 Cuantificación de PHB.** Para la cuantificación del PHB, se recolectaron 2 ml de muestra que se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se liofilizó y posteriormente se realizó una hidrólisis ácida a las células en 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al 98% durante 20 minutos a 96°C para convertir el PHB a ácido crotónico. Las muestras se diluyeron 50 veces con una solución de agua H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 M), seguido de filtración con membranas de PVDF (0,47 μm). En paralelo se procesó un PHB estándar certificado de Sigma-Aldrich. Todas las muestras se mantuvieron a 4°C y luego se analizaron mediante HPLC. Las

---

<sup>48</sup> MORENO, P., YAÑEZ, C., MEDEIROS, N., ESCALANTE, H., COMBARIZA, M. y GUZMAN, C. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology*, 32, 2015, p. 682-689.

mediciones se realizaron bajo un régimen de elución isocrática usando un H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 M) en solución acuosa como fase móvil, un caudal de 0,6 ml/min, y un volumen de inyección de 10  $\mu$ l. La columna y el detector se mantuvieron a 65°C y 35°C, respectivamente.<sup>49</sup>

#### 1.4 EXTRACCIÓN

Empleada en el proceso de extracción de PHB se basó en los trabajos presentados por Kim, *et. al.*,<sup>50</sup> Strazzullo, *et al.*,<sup>51</sup> y Naheed, *et .al.*,<sup>52</sup> como se ilustra Figura 2.

---

<sup>49</sup> MORENO, P., YAÑEZ, C., MEDEIROS, N., ESCALANTE, H., COMBARIZA, M. y GUZMAN, C. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *En: New Biotechnology*, 32, 2015, p. 682-689.

<sup>50</sup> KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *En: Biotechnology Letters*, 25, 2003, p. 55-59.

<sup>51</sup> STRAZZULLO, G., GAMBACORTA, A., VELLA, F. M., IMMIRZ, B., ROMANO, I., CALANDRELLI, V. y NICOLAUS, B. Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of *Halomonas campaniensis*. *En: World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2008, p. 1513-1519. doi:10.1007/s11274-007-9637-7

<sup>52</sup> NAHEED, N., JAMIL, N., HASNAIN, S. y ABBAS, G. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae* bacterium sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. *En: African Journal of Biotechnology*, 11, 2012, p. 3321-3332. doi:10.5897/AJB11.1405

Figura 2. Etapas propuestas de la metodología de extracción de PHB.



Las etapas del proceso se describen a continuación:

**1.4.1 Lavado con agua destilada.** Después de la fermentación, la biomasa se recolectó por centrifugación para posteriormente realizar dos lavados con agua destilada. Para cada lavado se resuspendió la biomasa en un volumen de agua igual al original y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm y 4°C.

**1.4.2 Pretratamiento.** Para la etapa de pretratamiento se evaluaron cuatro condiciones: sin pretratamiento, lisis asistida por ultrasonido, lisis celular con NaOH y NaClO.

Sin pretratamiento: posterior a los lavados la biomasa se llevó directamente a digestión con SDS.

Extracción asistida por ultrasonido: la biomasa se resuspendió en vasos de precipitado y se sonó durante 20 minutos con una frecuencia de 42 kHz.

Lisis con NaOH: la biomasa se resuspendió en un volumen igual al original en una solución 1M de NaOH y se agitó durante 10 minutos a 125 rpm y 50°C.

Lisis con NaClO: la biomasa se resuspendió en un volumen igual al original en una solución 6% v/v de NaClO y se agitó durante 10 minutos a 125 rpm y 50°C.

**1.4.3 Digestión.** Las muestras sin pretratamiento se resuspendieron en vasos de precipitado en un volumen igual al original, las muestras sometidas a ultrasonido pasaron directamente a la digestión, mientras que las muestras de lisis de NaOH y NaClO se centrifugaron y se lavaron una vez con agua destilada para retirar los agentes químicos. Durante esta etapa las muestras se sometieron a digestión con SDS (1 g SDS/ 1 g Biomasa húmeda) durante 180 minutos a 150 rpm y 30°C, en un agitador orbital.

**1.4.4 Tratamiento Térmico.** Luego de realizar la digestión con SDS, todas las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico a 121°C durante 20 minutos en autoclave.

**1.4.5 Lavado con agua destilada.** Posteriormente al tratamiento térmico se realizaron dos lavados con agua destilada. Para cada lavado se resuspendió la biomasa en un volumen de agua igual al original y se centrifugó a 6000 rpm y 4°C, con el fin de retirar los restos celulares de la bacteria.

**1.4.6 Lavado con solvente.** Previamente se realizaron ensayos con diferentes tiempos de acción del etanol, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos y 12 horas. La biomasa fue suspendida en una solución de etanol con una concentración de 70% p/p y se dejó en agitación a temperatura ambiente y 150 rpm. El tiempo para el cual se obtuvo mayor pureza, fue seleccionado como condición para esta etapa.

**1.4.7 Secado.** El PHB recuperado se secó en un horno durante 48 horas a 60°C.

## **1.5 CARACTERIZACIÓN DEL PHB**

Para la caracterización fisicoquímica se realizaron los siguientes procedimientos analíticos:

**1.5.1 Caracterización mediante análisis termogravimétrico (TGA).** La temperatura de degradación ( $T_d$ ) del biopolímero fue determinada mediante este método. El procedimiento incluye tomar aproximadamente 20 mg de PHB extraído y pulverizado en una cápsula de aluminio, para las mediciones se utilizó atmósfera de Nitrógeno a razón de 40 ml/min, realizando un calentamiento de 25 a 500°C con una velocidad constante de 10°C/min.<sup>53</sup>

**1.5.2 Caracterización mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).** La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_m$ ), y grado de cristalinidad ( $X_c$ ) se determinaron mediante DSC. El procedimiento incluye tomar aproximadamente 15 mg de PHB extraído y pulverizado, los cuales se introdujeron en una cápsula de aluminio. Inicialmente se hizo calentamiento de 25 a 250°C para borrar el historial térmico del material, posteriormente se realizó un enfriamiento de 250 a -20°C y finalmente un nuevo calentamiento de -20 a 250°C para la respectiva determinación de las transiciones térmicas. Todos los

---

<sup>53</sup> KOLLER, M., BONA, R., BRAUNEGG, G., HERMANN, C., HORVAT, P., KROUTIL y M. VARILA, P. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. En: Biomacromolecules, 6, 2005, p. 561-565.

procedimientos se realizaron con una variación de temperatura de 10 °C/min.<sup>54</sup> Para el cálculo del grado de cristalinidad se utilizó lo siguiente ecuación:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ}$$

Donde  $\Delta H_m$  corresponde a la entalpía de fusión de la muestra obtenida por DSC. La entalpía de fusión,  $\Delta H_m^\circ$  para el PHB 100% cristalino, de acuerdo con la literatura es igual a  $146 \frac{J}{g}$ .<sup>55</sup>

## 1.6 PRUEBAS PRELIMINARES

Como alternativas de extracción se evaluaron adicionalmente con microondas y ultrasonido de alta frecuencia. La radiación electromagnética de microondas genera calentamiento localizado y causa ruptura de la membrana celular,<sup>56</sup> por otra parte las ondas mecánicas del ultrasonido generan cavitación acústica que pueden crear regiones de alta presión y temperatura en solución que son suficientes para dañar la pared celular de los microorganismos debido a la fuerza de cizallamiento que se genera.<sup>57</sup> Los dos tratamientos se aplicaron a dos muestras diferentes: directamente a la biomasa resuspendida después de los dos lavados iniciales y a la biomasa agregando SDS en relación 1 g de SDS/1 g de biomasa.

---

<sup>54</sup> DOBROTH, Z. T., WU, S., COATS, E. R., y McDONALD, A. G. (). Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *En: Bioresource Technology*, 102, 2011, p. 3352-3359. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.053

<sup>55</sup> SADI, R. K., FECHINE, G. J. y DEMARQUETTE, N. R. Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*, 95, 1995, p. 2318-2327. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.09.003

<sup>56</sup> UQUICHE, Edgar. , JERÉZ, Marcia. Y ORTÍZ, Jaime. Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (Gevuina avellana Mol). *En: Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, vol: 9, p.495-500.

<sup>57</sup> TABATABAIE, F. MORTAZAVI, A. Studying the Effects of Ultrasound Shock on Cell Wall Permeability and Survival of Some LAB in Milk. *En: World Applied Sciences Journal*, 3, 2008, p.119-121.

Las condiciones para el microondas (Accelerated Reaction System, Model MARS) fueron: potencia 100 W, temperatura de 21°C durante 15 minutos para las muestras con y sin SDS. Las muestras se resuspendieron en 25 mL de agua destilada.

Para el ultrasonido (SONICS VCX 750) se usó un sensor 220, con un 40% de frecuencia durante 10 minutos y pulsaciones 1:1. La muestras se resuspendieron en 100 mL de agua destilada en vasos de precipitado de 250 mL.

## 2. RESULTADOS

### 2.1 FERMENTACIÓN

Al finalizar las 11 horas de fermentación los valores obtenidos para la concentración de PHB y biomasa fueron de 0,89 g/L y 2,27 g/L, respectivamente.

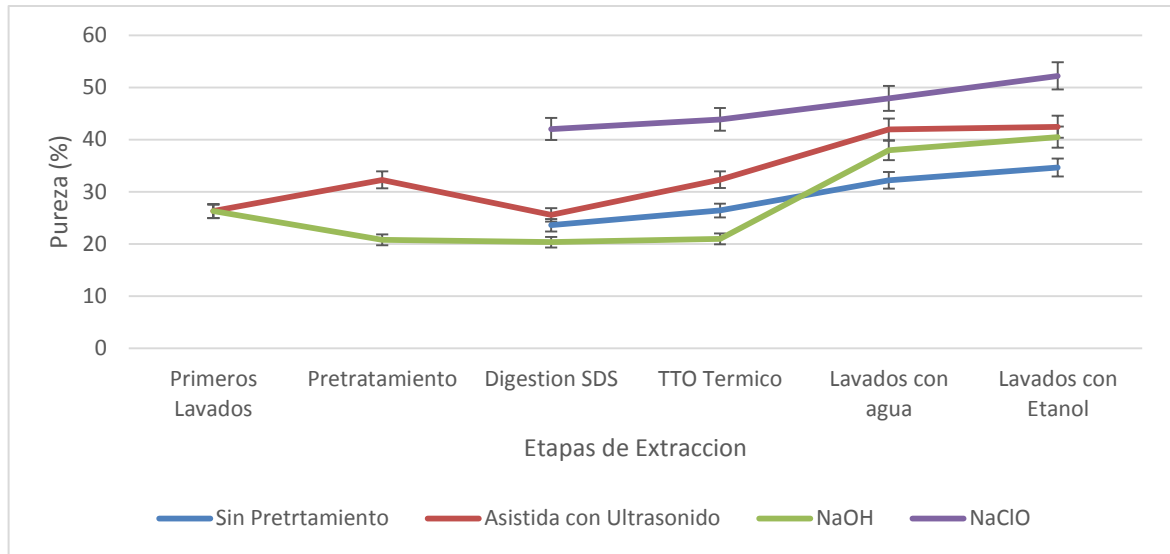
### 2.2 EXTRACCION

Los resultados de la pureza (%) obtenidos para los diferentes ensayos de extracción se encuentran resumidos en la Tabla 1 y Figura 3.

Tabla 1. Pureza del PHB Extraído.

Pretratamiento	Sin pretratamiento	Asistida con ultrasonido	NaOH	NaClO
Etapa	% Pureza	% Pureza	% Pureza	% Pureza
<b>Primeros Lavados</b>	26,29			
<b>Pretratamiento</b>	-----	32,27	20,80	No se detectó PHB
<b>Digestión</b>	23,59	25,58	20,35	42,03
<b>Tratamiento térmico</b>	26,40	32,32	20,95	43,87
<b>Lavados con agua</b>	32,18	41,96	37,93	47,91
<b>Lavados con etanol</b>	34,65	42,45	40,48	52,22

Figura 3. Pureza del PHB extraído.



Como se puede observar la pureza fue aumentando a medida que progresa el proceso de extracción. Cada etapa del proceso afectó en forma diferente el resultado, de forma que al final del procedimiento se alcanzaron purezas entre 34,65% para el proceso sin pretratamiento y 52,22% para el proceso donde se utilizó NaClO como pretratamiento. Para los procesos donde se utilizó NaOH y tratamiento con ultrasonido se obtuvieron purezas intermedias de 40,48% y 42,45% respectivamente. A continuación se realiza un análisis detallado de cada una de las etapas implementadas.

**2.2.1 Lavados con agua destilada.** En esta etapa se obtuvo una pureza de 26,29% la cual fue tomada como pureza inicial para cada uno de los ensayos realizados en el proceso de extracción

**2.2.2 Pretratamientos.** El pretratamiento con el cual se alcanzó mayor pureza fue el asistido con baño de ultrasonido, alcanzando un 32,27% lo cual indica mayor lisis celular en comparación con un 20,80% cuando se aplica NaOH. La disminución en la pureza cuando se aplica NaOH puede ser debida a la

precipitación de este junto con la biomasa. Cuando se usó hipoclorito de sodio no se detectó PHB.

**2.2.3 Digestión con SDS.** En la etapa de digestión se alcanzaron purezas de 23,59% para el proceso sin pretratamiento, 25,58% para el tratamiento con ultrasonido, 20,35% para el tratamiento con NaOH y 42,03% cuando se usa NaClO. Como se puede observar hay una disminución de 6,67% en la pureza en el tratamiento con ultrasonido respecto a la obtenida en la etapa anterior, mientras que para el proceso sin pretratamiento es del 2,60%. Esta disminución en la pureza posiblemente se debe a que parte del SDS precipita junto con la biomasa aumentando la masa total. Para el proceso con NaOH no se observa un cambio significativo en la pureza.

**2.2.4 Tratamiento Térmico.** En esta etapa el mayor incremento en la pureza se logró para el tratamiento con ultrasonido siendo este de 6,74 % alcanzando una pureza de 32,32%. Para los otros pretratamientos se alcanzaron purezas de 20,95% para NaOH, 43,87% para NaClO y 26,40% para el cual no se usó pretratamiento.

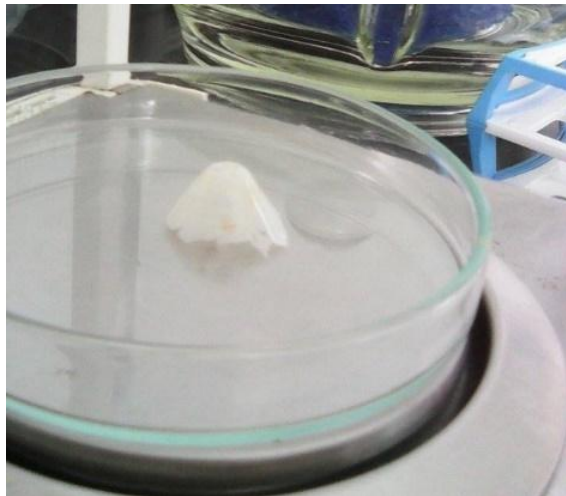
**2.2.5 Lavados con agua destilada.** En esta etapa el máximo aumento en la pureza se obtuvo para el tratamiento con NaOH con un valor de 16,98% alcanzando una pureza de 37,93%, para el tratamiento con ultrasonido se alcanzó un 41,96% de pureza, el tratamiento sin pretratamiento logro un 32,18% de pureza, por ultimo para el tratamiento con NaClO se obtuvo un 47,91% de pureza. En general esta etapa logro aumentos significativos para todos los tratamientos, aunque un poco menos significativo para el tratamiento con NaClO.

**2.2.6 Lavado con solvente.** El mayor aumento para esta etapa se logró en el tratamiento con NaClO obteniendo un valor de 4,04% alcanzando una pureza de 52,22%. Para los demás tratamientos los valores alcanzados de pureza fueron de

40,48% para NaOH, 42,45% para el tratamiento con ultrasonido y 34,65% para el tratamiento donde no se utilizó pretratamiento.

**2.2.7 Secado.** Después de 48 horas de secado se obtuvo el pellet como se muestra en la figura 4.

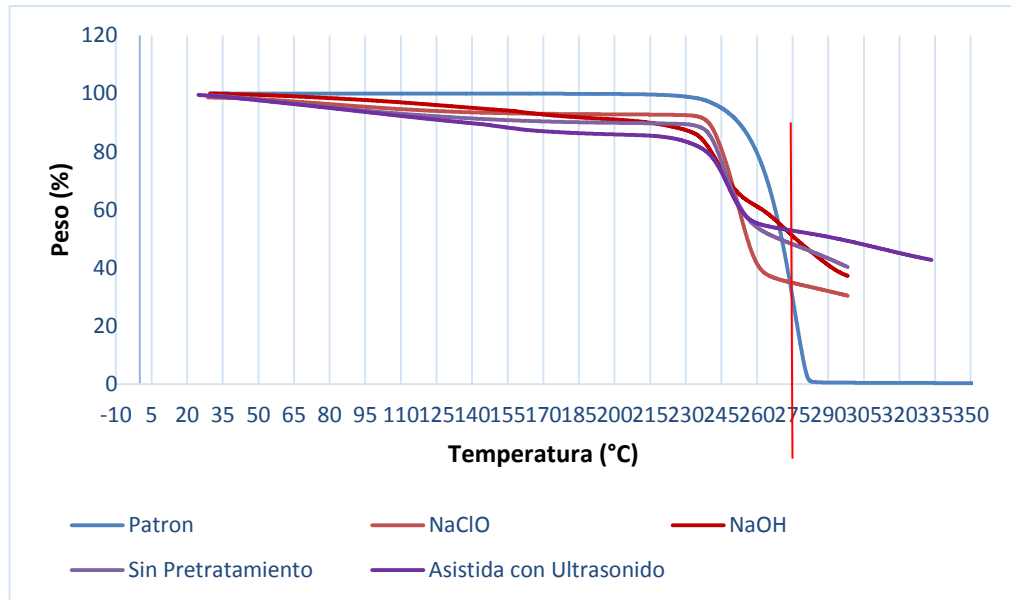
Figura 4. Pellet después de 48 horas de secado.



## 2.3 CARACTERIZACION DEL PHB

**2.3.1 Caracterización mediante análisis termogravimétrico (TGA).** Las curvas de TGA obtenidas para el patrón de PHB y PHB extraído se muestran en la figura 5.

Figura 5. Curvas de TGA para el patrón de PHB y PHB extraído.



En la curva obtenida para el patrón de PHB, se observó que la degradación térmica inicia alrededor de los 230°C, de la misma forma se puede notar que el material se descompone totalmente por encima de los 280°C. Con la ayuda de la curva de la primera derivada se halló que la degradación de PHB es a los 275,7°C.

La curva obtenida para la muestra con pretratamiento de NaClO, muestra una inestabilidad térmica a partir de los 233 °C a los 267 °C, en este rango ocurre una degradación de 55% de la masa de la muestra y presenta una  $Td$  de 252,537 °C.

De la misma forma para la muestra purificada con pretratamiento de ultrasonido, se observa una inestabilidad térmica de 220°C hasta los 256°C degradándose aproximadamente un 29% de la masa y presenta una  $Td$  de 247,651°C.

La curva obtenida para la muestra purificada sin pretratamiento presenta una mayor degradación térmica en el rango de 230°C a 260°C, con una degradación del 40% de la masa y una  $Td$  de 246,339°C.

Finalmente la curva obtenida para la muestra purificada mediante pretratamiento de NaOH muestra una degradación térmica considerable entre los 235°C y los 255°C, degradándose un 27% de la muestra, siendo la  $T_d$  a los 243,738°C.

Las curvas para cada una de las diferentes muestras comparadas con la curva para el PHB puro, muestran un cambio en la tasa de degradación y un residuo que no se degrada, aun después de los 285°C, lo anterior está relacionado con las impurezas que aún están presentes, como peptidoglicanos. EL PHB contenido en las muestras se degrada a una menor temperatura que el PHB de referencia, esto puede indicar un menor peso molecular, ya que la temperatura de fusión de los polímeros aumenta al incrementar el peso molecular, siendo este uno de los factores más importantes que afecta las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del material.<sup>58</sup>

La medida de  $T_d$  para el Patrón de PHB y las diferentes muestras de PHB extraído se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2.  $T_d$  para el patrón de PHB y PHB extraído.

Muestra	Pureza (%)	$T_d$ (°C)
<b>Patrón PHB</b>	100	276,629
<b>Sin Pretratamiento</b>	26	246,339
<b>Asistido con ultrasonido</b>	42	247,651
<b>NaOH</b>	22	243,738
<b>NaClO</b>	45	252,537

La  $T_d$  para las diferentes muestras de PHB están dentro del rango encontrado por Rohini<sup>59</sup> entre 225°C y 270°C para el PHB recuperado. Las gráficas de la

<sup>58</sup> YEZZA, A., HALASZ, A., LEVADOUX, W. y HAWARI, J. (). Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. En: *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 2007, p. 269-274. doi:10.1007/s00253-007-1158-7

<sup>59</sup> ROHINI, D., PHADNIS, S. y RAWAL, S. K. Synthesis and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. En: *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 2006, p. 276-283.

derivada de cada una de las muestras de las cuales se obtuvo la se encuentran  $T_d$  en el Anexo 4.

**2.3.2 Caracterización mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).** La curva de DSC obtenida para el patrón de PHB y las curvas obtenidas para las diferentes muestras de PHB extraído y purificado se muestra en las figuras 6 y 7 respectivamente.

Figura 6. Curva de DSC para el patrón de PHB.

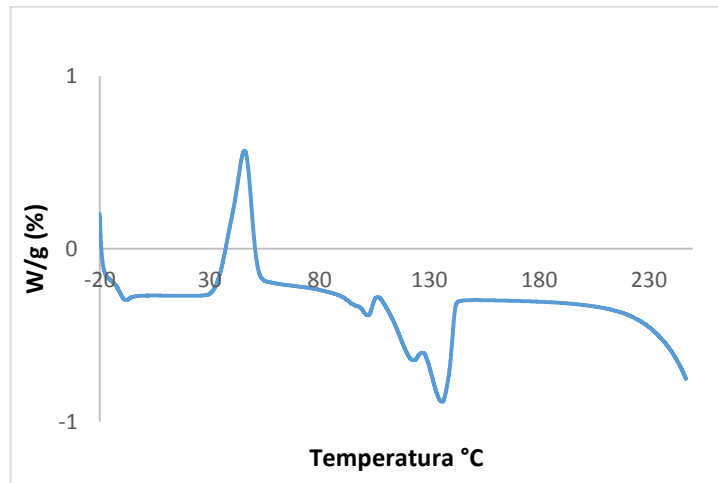
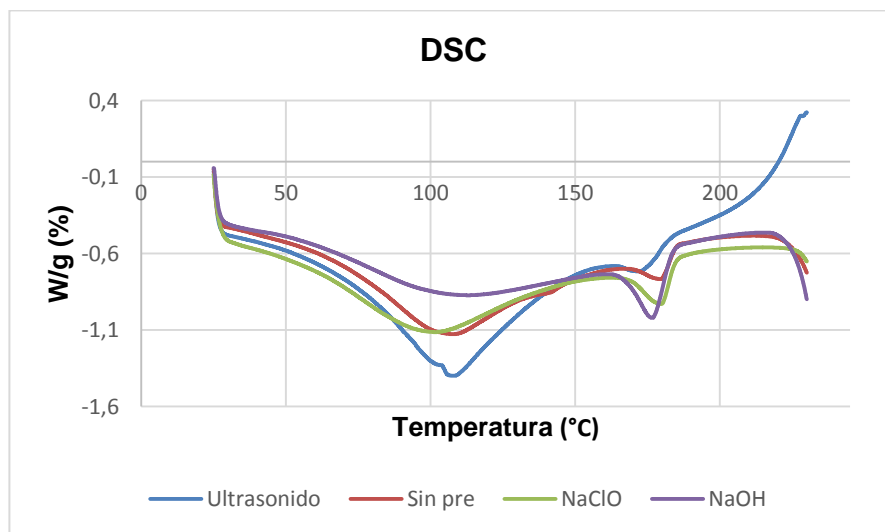


Figura 7. Curva de DSC para el PHB extraído.



Inicialmente las muestras fueron calentadas desde los 25°C hasta los 260°C con el fin de borrar la historia térmica del material, durante este proceso se observaron diferentes variaciones entálpicas, presentándose una degradación del material. Los resultados obtenidos a partir de las curvas de DSC para todos los ensayos realizados se encuentran resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de DSC para el patrón de PHB y PHB extraído.

<b>Muestra</b>	<b><i>T<sub>m</sub></i> (°C)</b>	<b><i>(X<sub>c</sub>)</i> %</b>	<b><i>T<sub>g</sub></i> (°C)</b>
<b>Patrón PHB</b>	136	66,41	-12
<b>Sin pretratamiento</b>	180,03	5,21	---
<b>Asistida con ultrasonido</b>	175,62	4,89	15-25
<b>NaOH</b>	177,08	13,56	15-25
<b>NaClO</b>	179,37	11,60	---

El porcentaje de cristalinidad ( $X_c$ ) del PHB extraído fue muy inferior al rango reportado en la literatura (52-70) %.<sup>60,61,62,63</sup> Entre las cuatro técnicas de extracción utilizadas los métodos de NaOH y NaClO dieron los valores más altos de cristalinidad (11-14) %, en comparación con los métodos sin pretratamiento y asistido con ultrasonido (4,8-5,3) %. En el Anexo 5 se encuentran los valores utilizados para el cálculo de los respectivos valores de cristalinidad.

<sup>60</sup> CHIQUETTO MACHADO, M. L. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero biodegradável poli-3-hidroxi-butirato (PHB) e de compósitos PHB/PÓ de madeira. Tesis Doctoral, Sao Paulo, 2008

<sup>61</sup> FORMOLO GARCIA, M. Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa, Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2006

<sup>62</sup> VALAPPIL, S., MISRA, S., BOCCACCINI, A., KESHAVARZ, T., BUCKE, C. y ROY, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. En: Journal of Biotechnology, 2007, p. 251-258. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.03.013

<sup>63</sup> YEZZA, A., HALASZ, A., LEVADOUX, W. y HAWARI, J. (). Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. En: Appl Microbiol Biotechnol, 77, 2007, p. 269-274. doi:10.1007/s00253-007-1158-7

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) obtenida para el PHB extraído varía desde los 175°C a los 180°C para todas las muestras, independientemente del pretratamiento utilizado durante el proceso de extracción. Los valores de  $T_m$  están dentro del rango encontrado en la literatura 143°C a 180°C.<sup>64, 65, 66, 67, 68, 69, 70</sup> La temperatura de cristalización ( $T_g$ ) solo fue posible determinarla para la muestra asistida con ultrasonido y NaOH en el rango de 15°C a 25°C, estando por encima del rango reportado en la literatura (-2 -10)°C y la  $T_g$  del PHB comercial.

Las curvas de DCS para cada una de las muestras de las cuales se tomaron los valores de  $T_m$ ,  $\Delta H_m$  y  $T_g$  se encuentran en el anexo 6.

## 2.4 PRUEBAS PRELIMINARES

En la Figura 8 y Figura 9 se muestran los resultados para la pruebas de extracción con microondas y ultrasonido respectivamente.

---

<sup>64</sup> CHIQUETTO, Op. Cit.

<sup>65</sup> FORMOLO, Op. Cit.

<sup>66</sup> VALAPPIL, S., MISRA, S., BOCCACCINI, A., KESHAVARZ, T., BUCKE, C. y ROY, I., Op. Cit.

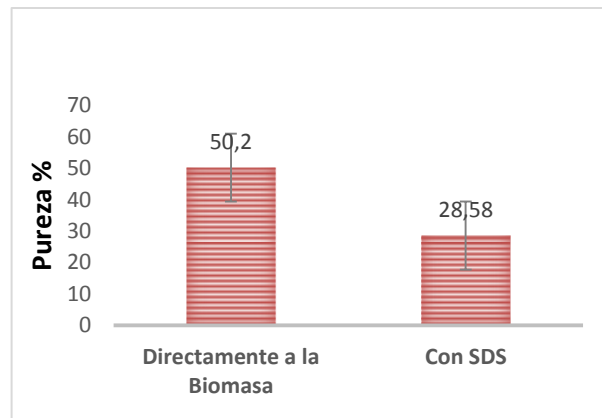
<sup>67</sup> YEZZA, A., HALASZ, A., LEVADOUX, W. y HAWARI, J., Op. Cit.

<sup>68</sup> ROHINI, D., PHADNIS, S. y RAWAL, S. K. Synthesis and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. En: Indian Journal of Biotechnology, 5, 2006, p. 276-283.

<sup>69</sup> MOTHE, G., SCHNORPFEIL, C. y ACKERMANN, J.-U. Production of PHB from Crude Glycerol. *Eng. Life Sci*, 2007, p. 475-479. doi:10.1002/elsc.200620210

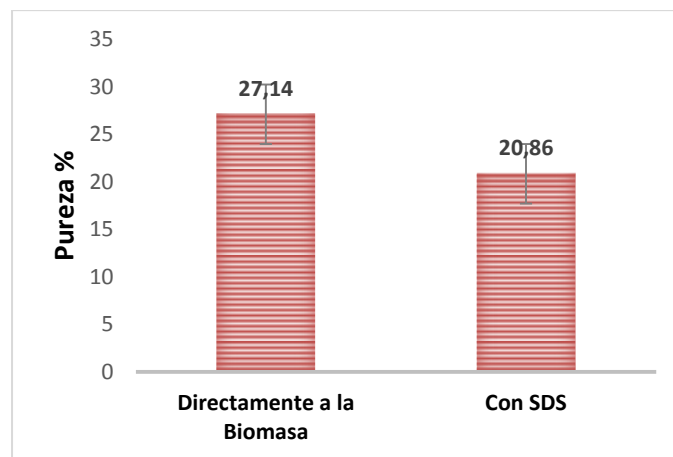
<sup>70</sup> FERNÁNDEZ NASCIMENTO, Jeffer. Estudo da Processabilidade e da Caracterizacao do poli (ácido 3-hidroxibutírico) -PHB Obtido a Partir de Cana-de-Acucar. Dissertacao de Mestrado, Universidad Estadual de Campinas, Engenharia Química, Sao Paulo, 2001.

Figura 8. Pureza obtenida con microondas.



Al aplicar microondas se obtuvo una pureza de 50,2% cuando se aplica la radiación directamente a la biomasa y solo un 28,58% cuando se usa con SDS, lo que indica que el SDS inhibe la acción del microondas sobre la pared celular. De acuerdo con estos resultados cabe resaltar que con extracción asistida por microondas aplicada directamente a la biomasa se logran resultados comparables con los alcanzados después de los pasos de extracción con SDS.

Figura 9. Pureza obtenida con ultrasonido.



Cuando se aplicó ultrasonido no se observó cambio significativo en la pureza para ninguna de las dos muestras.

### 3. CONCLUSIONES

- Los mejores resultados de pureza para la metodología de extracción de PHB producido por *Bacillus megaterium* B2 a partir de glicerol crudo como única fuente de carbono, utilizando dodecil-sulfato de sodio (SDS) como agente digestor se lograron utilizando una solución de NaClO como pretratamiento.
- La etapa de pretratamiento influyó positivamente en la pureza del PHB, ya que las purezas finales siempre superiores cuando se aplicó algún tipo de pretratamiento en comparación con la extracción donde no se aplicó ningún pretratamiento.
- Los valores de  $T_d$  y  $T_m$  determinados mediante TGA y DSC para el PHB extraído fueron de 240°C y 180 °C respectivamente, estos valores son comparables con los reportados en la literatura, y definen el rango de procesabilidad del polímero.

#### 4. RECOMENDACIONES

- Debido a los buenos resultados obtenidos, para el método de extracción con microondas, se recomienda continuar la investigación del mismo debido a la fácil aplicación de este método, buscando obtener PHB con purezas superiores.
- Se recomienda aplicar la caracterización fisicoquímica del polihidroxibutirato extraído, a parámetros como el peso molecular promedio ( $M_n$ ) el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ), mediante las técnicas de permeación en gel (GPC) y MALDI-TOF.

## BIBLIOGRAFÍA

BHAGOWATI, P., PRADHAN, S., DASH, H. R., y DAS, S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. En: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1-8. 2015. doi:10.1080/09168451.2015.1034651

CHIQUELTO MACHADO, M. L. Estudo das propriedades mecánicas e térmicas do polímero biodegradável poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/PÓ de madeira. Tesis Doctoral, Sao Paulo, 2008

DOBROTH, Z. T., WU, S., COATS, E. R., y McDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. En: *Bioresource Technology*, 102, 2011, p. 3352-3359. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.053

FACCINI, D., RECH, R., SECCHI, A., CARDOZO, N., y AYUB, M. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Conventional Plastics*, 2013, p. 420-425.

FERNÁNDEZ NASCIMENTO, Jeffer. Estudo da Processabilidade e da Caracterizacao do poli (ácido 3-hidroxibutírico) -PHB Obtido a Partir de Cana-de-Acucar. Dissertacao de Mestrado, Universidad Estadual de Campinas, Engenharia Química, Sao Paulo, 2001.

FORMOLO GARCIA, M. Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos , Universidade Federal de Santa, Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2006

JACQUEL, N., LO, C.-W., WEI, Y.-H., WU, H.-S. y WANG, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). En: Biochemical Engineering Journal, 39, 2008, p. 15-27. doi:10.1016/j.bej.2007.11.029

KIM, M., CHO, K.-S., RYU, H. W., LEE, E. y CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. En: Biotechnology Letters, 25, 2003, p. 55-59.

KOLLER, M., BONA, R., BRAUNEGG, G., HERMANN, C., HORVAT, P., KROUTIL y M. VARILA, P. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. En: Biomacromolecules, 6, 2005, p. 561-565.

LO, C.-W., WU, H.-S. y WEI, Y.-H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1 blue. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 2011, p. 240-246. doi:10.1016/j.jtice.2010.08.001

LOPEZ, J., NARANJO, J., HIGUITA, J., CUBITTO, M., CARDONA, C., and VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. En: Biotechnology and Bioprocess Eng, 2012, p. 250-258.

LUNT, J. AND ASOCIATES. Marketplace Opportunities for Integration of Biobased and Conventional Plastics. 6. 2014

MARTINEZ DE TEJADA, G., SÁNCHEZ-GÓMEZ, S., KOWALSKI, I. K., ANDRÄ, J., SCHÜRHOLZ, T., HORNEF, M. y BRANDENBURG, K. Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. NIH-PA Author Manuscript, 2012, p. 1121-1130.

MEDINA TINOCO, R. Plásticos Biodegradables. ¿Cómo ves?, 2005, p. 23-24.

MORENO, P., YAÑEZ, C., MEDEIROS, N., ESCALANTE, H., COMBARIZA, M. y GUZMAN, C. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. En: *New Biotechnology*, 32, 2015, p. 682-689.

MOTHES, G., SCHNORPFEIL, C. y ACKERMANN, J.-U. Production of PHB from Crude Glycerol. *Eng. Life Sci*, 2007, p. 475-479. doi:10.1002/elsc.200620210

NAHEED, N., JAMIL, N., HASNAIN, S. y ABBAS, G. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae* bacterium sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. En: *African Journal of Biotechnology*, 11, 2012, p. 3321-3332. doi:10.5897/AJB11.1405

NATH, A., DIXIT, M., BANDILLA, A., CHAVDA, S. y DESAI, A. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. En: *Bioresource Technology*, 99, 2008, p. 5747-5755. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.017

PATEL, Martin. MARSCHIEDER-WEIDEMANN, Frank. SCHLEICH, Joachim. HÜSING, Bärbel y ANGERER, Gerhard. Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe. Technical Report EUR, 22103, 2005.

POSADA, J. A., NARANJO, J. M., LÓPEZ, J. A., HIGUITA, J. C., & CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. En: *Process Biochemistry*, 46, 2011, p. 310- 317. doi:10.1016/j.procbio.2010.09.003

REDDY, C., GHAI, R. R. y KALIA, V. Polyhydroxyalkanoates: an overview. En: Bioresource Technology 87, 2003, p. 137-146.

RODRÍGUEZ CONTRERAS, A., KOLLER, M., MIRANDA DE SOUSA DIAS, M., CALAFELL MONFORT, M., BRAUNEGG, G., & MARQUÉS CALVO, M. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. En: Journal of Applied Microbiology, 2013, p. 1378-1381. ISSN 1364-5072, doi:10.1111/jam.12151

ROHINI, D., PHADNIS, S. y RAWAL, S. K. Synthesis and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. En: Indian Journal of Biotechnology, 5, 2006, p. 276-283.

SADI, R. K., FECHINE, G. J. y DEMARQUETTE, N. R. Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate). Polymer Degradation and Stability, 95, 1995, p. 2318-2327. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.09.003

SEI KWANG, Hahn; YONG KEUN, Chang y SANG YUP, Lee. Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 61, 1995, p. 34-39.

SHARMA, P. y BAJAJ, B. K. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, p. 241-248. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.008

STRAZZULLO, G., GAMBACORTA, A., VELLA, F. M., IMMIRZ, B., ROMANO, I., CALANDRELLI, V. y NICOLAUS, B. Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of

Halomonas campaniensis. En: World J Microbiol Biotechnol, 24, 2008, p. 1513-1519. doi:10.1007/s11274-007-9637-7

SURIÑACH, S., BARO, M., BORDAS, S., CLAVAGUERA, N. y CLAVAGUERA-MORA, M. T. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. En: BOL. SOC. ESP. CERAM. VIDR, 31, 1992, p. 11-17.

TABATABAIE, F. MORTAZAVI, A. Studying the Effects of Ultrasound Shock on Cell Wall Permeability and Survival of Some LAB in Milk. En: World Applied Sciences Journal, 3, 2008, p.119-121.

THAKOR, N., LU"KE-EVERSLOH, T. y STEINBU"CHEL, A. Application of the BPEC Pathway for Large-Scale Biotechnological Production of Poly(3-Mercaptopropionate) by Recombinant Escherichia coli, Including a Novel In Situ Isolation Method. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 71, 2005, p. 835-841. doi:10.1128/AEM.71.2.835-841.2005

VALAPPIL, S. P., BOCCACCINI, A. R., BUCKE, C. y ROY, I. POLYHYDROXYALKANOATES in Gram-positive bacteria: insights from the genera Bacillus and Streptomyces. Antonie van Leeuwenhoek, 91, 2007, p. 1-17. doi:10.1007/s10482-006-9095-5

VALAPPIL, S., MISRA, S., BOCCACCINI, A., KESHAVARZ, T., BUCKE, C. y ROY, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised Bacillus cereus SPV. En: Journal of Biotechnology, 2007, p. 251-258. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.03.013

UQUICHE, Edgar. , JERÉZ, Marcia. Y ORTÍZ, Jaime. Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from

Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol). En: Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, vol: 9, p.495-500.

WU, Q., HUANG, H., HU, G., CHEN, J., HO, K. y CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, p. 111-118.

YANG, Y.-H., BRIGHAM, C., WILLIS, L., RHA, C. y SINSKEY, A. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). En: *Biotechnol Lett*, 2011. doi:10.1007/s10529-010-0513-4

YEZZA, A., HALASZ, A., LEVADOUX, W. y HAWARI, J. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. En: *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 2007, p. 269-274. doi:10.1007/s00253-007-1158-7

# **ANEXOS**

## Anexo A. Cuantificación de biomas y PHB durante la fermentación

Los valores tenidos en cuenta para la cuantificación de biomasa durante la fermentación se presentan en la siguiente tabla:

Cuantificación de biomasa

Biomasa				
Tiempo	Peso seco tubos (g)	Peso seco Tubo + biomasa (g)	Volumen (ml)	Concentración biomasa (g/L)
t3	10,8662	10,8696	15	0,22667
t4	9,9189	9,9214	12	0,20833
t5	9,7391	9,744	16	0,30625
t6	9,7196	9,7331	16	0,84375
t7	10,8973	10,9264	17	1,71176
t8	9,7049	9,7408	16	2,24375
t9	10,8872	10,9212	15	2,26667
t10	10,9244	10,9607	16	2,26875
t11	11,1188	11,1596	18	2,26667
<b>Preinóculo</b>	10,945	10,9507	14	0,40714

La cuantificación de PHB se hizo con una curva de calibración del patrón de PHB, los datos tomados para dicha curva y cuantificación de PHB durante la fermentación se muestran en la siguiente tabla:

Datos curva de calibración y concentración PHB

Concentración Real (g/l)	Área	Muestras	Áreas	PHB (g/L)
<b>0</b>	0	t3	1,65	0,0343
<b>0,13</b>	7,56	t4	5,168	0,0626
<b>0,65</b>	39,47	t5	14,809	0,1403
<b>1,3</b>	74,955	t6	30,797	0,2691
<b>1,95</b>	116,04	t7	51,106	0,4328
<b>2,6</b>	153,901	t8	80,084	0,6663
<b>3,25</b>	194,987	t9	100,464	0,8305
<b>3,9</b>	247,293	t10	100,216	0,8285
		t11	107,862	0,8901

## Anexo B. Cuantificación de Biomasa y PHB durante el proceso de extracción

Cuantificación de biomasa, PHB y pureza durante cada una de las etapas para cada uno de los procesos de extracción realizados.

Valores para el cálculo de biomasa, PHB y pureza para los dos primeros lavados

Pesos inicial (g)	Volume n (ml)	Peso tubo +Pellet (g)	Peso pellet (g)	Concentración n (g/l)	Concentración HPLC (g/l)	Pureza (%)
10,8023	50	10,9994	0,1971	3,942	0,7693	19,5153
10,8569		10,9987	0,1418	2,836		27,1260
10,9078		11,0271	0,1193	2,386		32,2419

Valores para el cálculo de biomasa, PHB y pureza durante el proceso de extracción sin pretratamiento.

Digestión SDS						
Peso inicial (g)	Volumen (ml)	Peso tubo +Pellet (g)	Peso pellet (g)	Concentración (g/l)	Concentración HPLC (g/l)	Pureza (%)
10,8862	50	11,0594	0,1732	3,464	0,8135	23,4854
10,8271		10,9889	0,1618	3,236		25,1401
10,8271		11,0108	0,1837	3,674		22,1430
Tratamiento térmico						
10,8583	50	10,9935	0,1352	0,1341	0,7456	27,5749
10,9118		11,0467	0,1349	0,1335		27,6362
10,8902		11,0457	0,1555	0,1451		23,9751
Lavados con agua destilada						
10,8885	50	10,9785	0,09	1,8	0,6498	36,1033
10,8752		10,9989	0,1237	2,474		26,2676
10,9152		11,0103	0,0951	1,902		34,1672
Lavados con etanol						
10,7982	45	10,8951	0,0969	2,153333333	0,7411	34,4184
10,9014	47,5	11,0111	0,1097	2,309473684		32,0914
10,831	45	10,9201	0,0891	1,98		37,4314

Valores para el cálculo de biomasa, PHB y pureza durante el proceso de extracción asistido con ultrasonido

<b>Pretratamiento</b>						
<b>Pesos inicial (g)</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Peso tubo +Pellet (g)</b>	<b>Peso pellet (g)</b>	<b>Concentración (g/l)</b>	<b>Concentración HPLC (g/l)</b>	<b>Pureza (%)</b>
10,8957	50	10,9898	0,0941	1,882	0,6291	33,4252
10,8203		10,9214	0,1011	2,022		31,1109
10,7952		10,8927	0,0975	1,95		32,2596
<b>Digestión con SDS</b>						
10,7288	50	10,8541	0,1253	2,506	0,6508	25,9693
9,5341	47,5	9,6587	0,1246	2,6231		24,8095
10,8372	47,5	10,9563	0,1191	2,5074		25,9552
<b>Tratamiento térmico</b>						
10,9121	45	11,0298	0,1177	2,6155	0,8417	32,1803
10,8644	45	10,977	0,1126	2,5022		33,6379
10,8683	45	10,9899	0,1216	2,7022		31,1482
<b>Lavados con agua</b>						
10,8195	50	10,9155	0,096	1,92	0,7499	39,0586
10,9401		11,0281	0,088	1,76		42,6094
10,798		10,8828	0,0848	1,696		44,2173
<b>Lavados con etanol</b>						
10,9274	48	10,9933	0,0659	1,3729	0,7034	51,2354
10,9537	47,5	11,0438	0,0901	1,8968		37,0837
10,888	47,5	10,9519	0,0639	1,3452		52,2886
9,7793	47,5	9,8712	0,0919	1,9347		36,3574
10,875	47,5	10,9697	0,0947	1,9937		35,2824

Valores para el cálculo de biomasa, PHB y pureza durante el proceso de extracción con NaOH

<b>Pretratamiento</b>						
<b>Pesos inicial (g)</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Peso tubo +Pellet (g)</b>	<b>Peso pellet (g)</b>	<b>Concentración (g/l)</b>	<b>Concentración HPLC (g/l)</b>	<b>Pureza (%)</b>
11,1386	50	11,3215	0,1829	3,658	0,7269	19,87048
9,588		9,7509	0,1629	3,258		22,3101
11,0232		11,2032	0,18	3,6		20,1906
<b>Digestión SDS</b>						
10,9709	50	11,1332	0,1623	3,246	0,8042	24,7753
10,3074	47,5	10,4585	0,1511	3,1810		25,2811
10,8751	47,5	11,0292	0,1541	3,2442		24,7889
<b>Tratamiento térmico</b>						
10,9709	50	11,1332	0,1623	3,246	0,8042	24,7753
10,3074	47,5	10,4585	0,1511	3,1810		25,2812
10,8751	47,5	11,0292	0,1541	3,2442		24,7889
<b>Lavados con agua destilada</b>						
9,8234		9,9367	0,1133	2,266		41,2727
10,8027		10,9471	0,1444	2,888		32,3836
11,1736		11,2901	0,1165	2,33		40,1390
<b>Lavados con etanol</b>						
10,834	45	10,9213	0,0873	1,94	0,8469	43,6544
10,9228	47,5	11,0411	0,1183	2,4905		34,0047
10,9505	50	11,0473	0,0968	1,936		43,7446

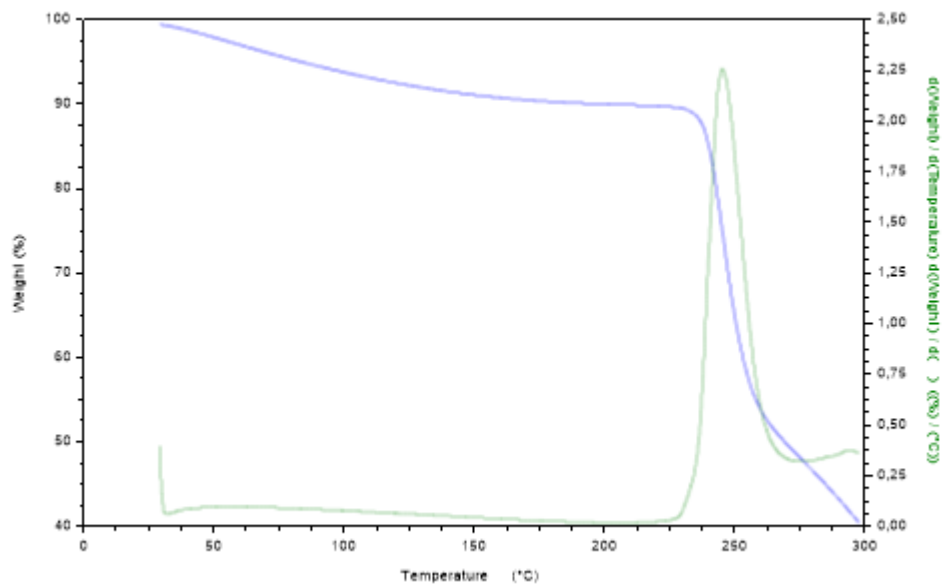
Valores para el cálculo de biomasa, PHB y pureza durante el proceso de extracción con NaClO

<b>Pretratamiento</b>						
<b>Pesos inicial (g)</b>	<b>Volume n (ml)</b>	<b>Peso tubo +Pellet (g)</b>	<b>Peso pellet (g)</b>	<b>Concentración (g/l)</b>	<b>Concentración HPLC (g/l)</b>	<b>Pureza (%)</b>
10,8459	50	10,9294	0,0835	1,67	0,0210	1,25495
10,889		10,9787	0,0897	1,794		1,16815
10,8898		10,9908	0,101	2,02		1,03746
<b>Digestión con SDS</b>						
10,7771	50	10,8549	0,0778	1,556	0,6228	40,0270
9,7447		9,8299	0,0852	1,704		36,5505
10,8318		10,8947	0,0629	1,258		49,5088
<b>Tratamiento térmico</b>						
9,8135	50	9,8544	0,0409	0,818	0,3498	42,7622
10,874	50	10,9139	0,0399	0,798		43,8339
10,8603	47,5	10,8972	0,0369	0,7768		45,0278
<b>Lavados con agua destilada</b>						
10,8812	50	10,9402	0,059	1,18	0,5810	49,2395
10,8884		10,9532	0,0648	1,296		44,83225
10,8976		10,9561	0,0585	1,17		49,6603
<b>Lavados con etanol</b>						
10,8051	47,5	10,8586	0,0535	1,1263	0,6912	61,3668
10,8051	47,5	10,8694	0,0643	1,3537		51,0595
10,8051	47,5	10,8793	0,0742	1,5621		44,2469

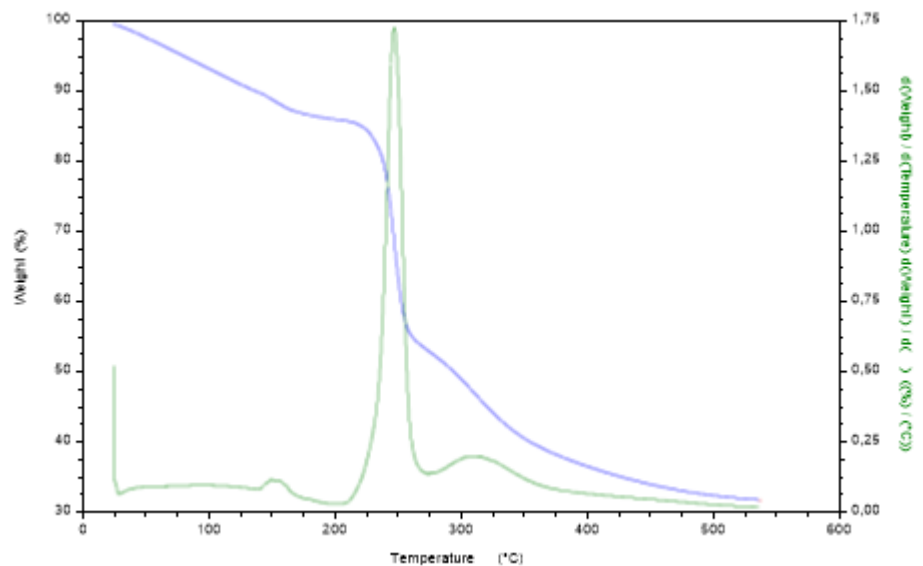
## Anexo C. Curvas de la derivada de TGA

Las curvas de la derivada de TGA, de las cuales se tomó el valor de  $T_d$  para cada una de las muestras de PHB extraído se muestra a continuación.

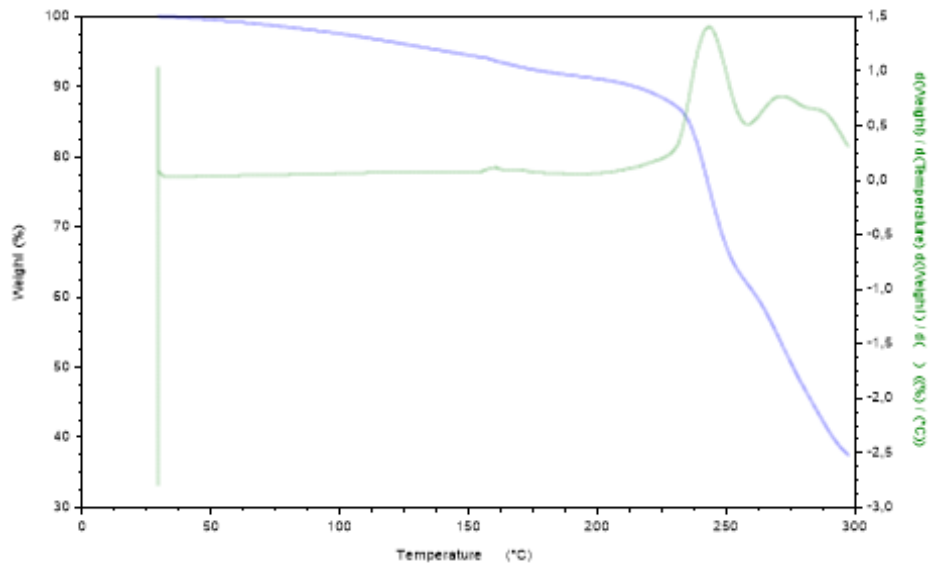
*TGA para la muestra de extracción sin pretratamiento*



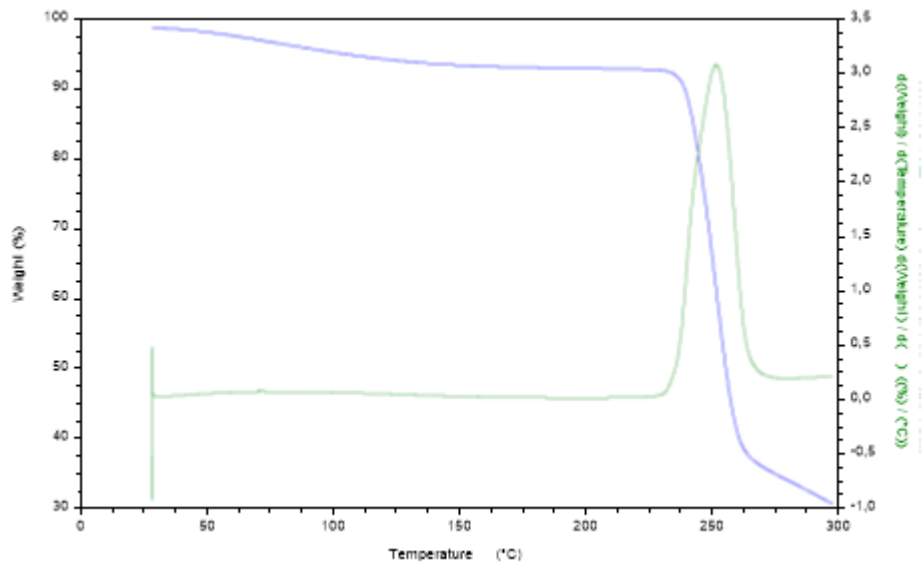
*TGA para la muestra de extracción asistida con ultrasonido*



### TGA para la muestra de extracción con NaOH



### TGA para la muestra de extracción con NaClO



#### Anexo D. Cálculo del grado de cristalinidad (Xc) %:

Para el cálculo del grado de cristalinidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$Xc = \frac{\Delta Hm}{\Delta Hm^\circ}$$

$$\Delta Hm^\circ = 146 \frac{J}{g} .$$

Calculo del grado de cristalinidad para cada una de las etapas.

##### ✓ Sin pretratamiento

$$\Delta Hm = 7.606 \frac{J}{g}$$

$$Xc = \frac{\Delta Hm}{\Delta Hm^\circ} = \frac{7,606 \frac{J}{g}}{146 \frac{J}{g}} = 5,21\%$$

##### ✓ Asistida con ultrasonido

$$\Delta Hm = 7,148 \frac{J}{g}$$

$$Xc = \frac{\Delta Hm}{\Delta Hm^\circ} = \frac{7.148 \frac{J}{g}}{146 \frac{J}{g}} = 4,896\%$$

✓ NaOH

$$\Delta H_m = 19,80 \frac{J}{g}$$

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ} = \frac{19,80 \frac{J}{g}}{146 \frac{J}{g}} = 13,56\%$$

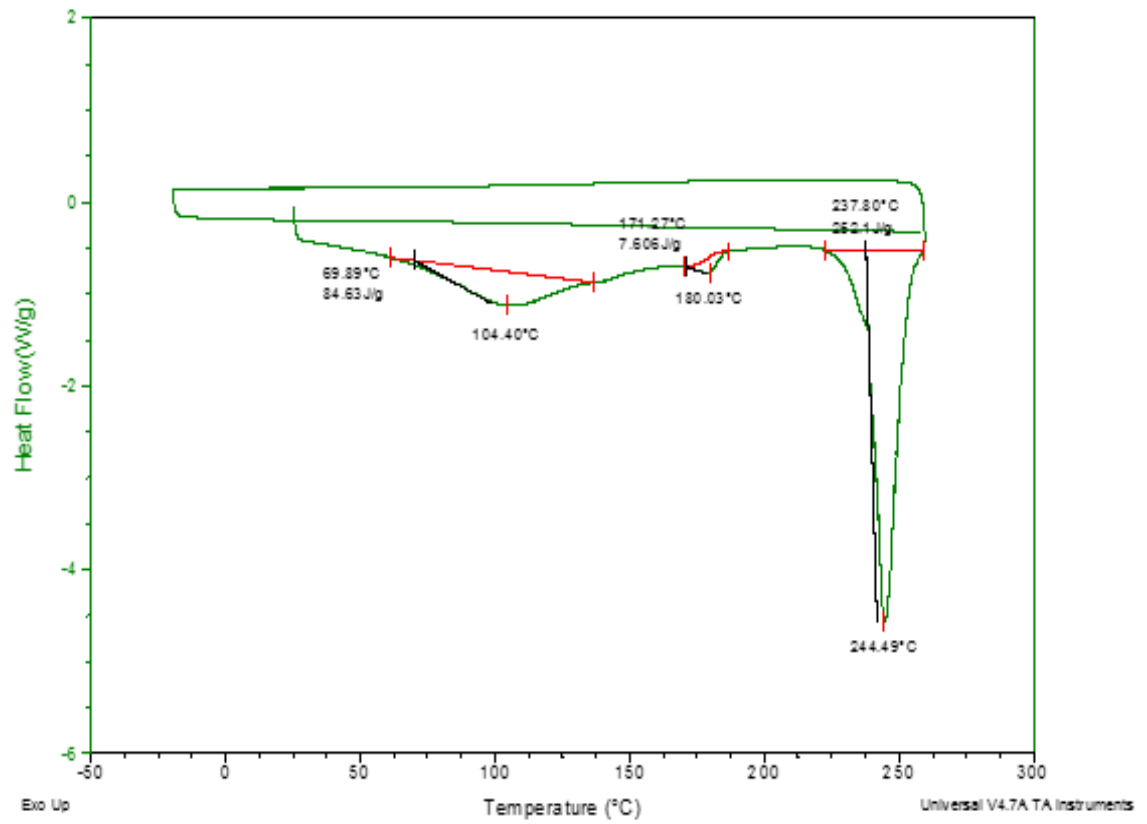
✓ NaClO

$$\Delta H_m = 16,94 \frac{J}{g}$$

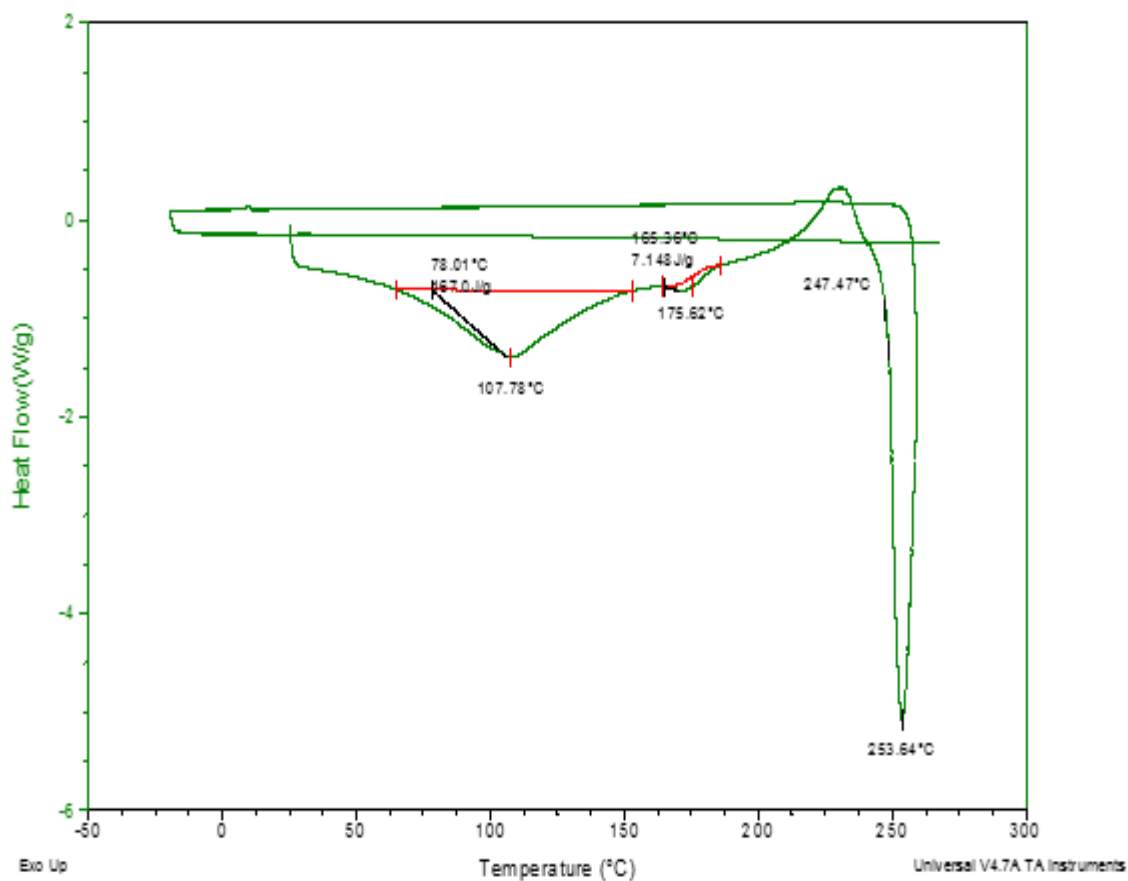
$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ} = \frac{16,94 \frac{J}{g}}{146 \frac{J}{g}} = 11,60\%$$

## Anexo E. Curvas de DSC para cada una de las muestras

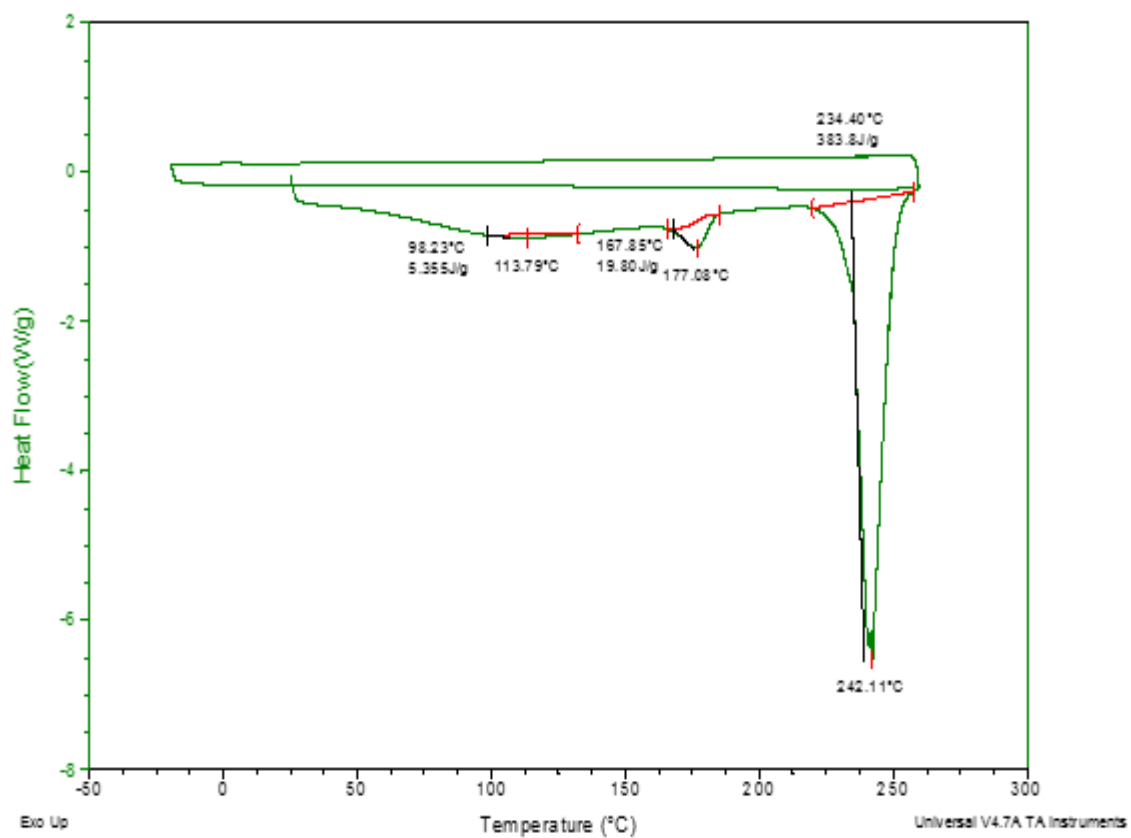
DSC para la muestra de extracción sin pretratamiento



# DSC para la muestra de extracción asistida con ultrasonido



# DSC para la muestra de extracción con NaOH



# DSC para la muestra de extracción con NaClO

