

**BIOSÍNTESIS BACTERIANA DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE
GLICEROL CRUDO**

**RICHARD ALEXANDER BERMÚDEZ MÁRQUEZ
MARÍA CAROLINA ORDÓÑEZ FRANCO**

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

2014

**BIOSÍNTESIS BACTERIANA DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE
GLICEROL CRUDO**

**RICHARD ALEXANDER BERMÚDEZ MÁRQUEZ
MARÍA CAROLINA ORDÓÑEZ FRANCO**

**Trabajo de grado presentado para optar por el título de
ingeniero Químico**

Director:

**Ph. D. VIVIANA SÁNCHEZ TORRES
Ingeniera Química, Ph.D.**

Codirector:

**Ph. D. GUSTAVO E. RAMIREZ CABALLERO
Ingeniero Químico, Ph.D.**

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

2014

Dedicado,

A Dios por permitirme llegar hasta aquí.

A mis padres Ricardo y Norma por su confianza.

A mis hermanos Juan David y Estefanía por todos los momentos compartidos.

A Carolina por su inmenso apoyo.

A todos mis amigos y compañeros con los que tuve la oportunidad de compartir durante mi paso por la Universidad.

Richard

Dedicado,

A mis padres, por su amor, apoyo incondicional y orientación.

A Dios, por guiar mi camino y permitirme culminar esta etapa satisfactoriamente.

A mi hermano por ser un ejemplo y amigo.

A tata, por ser caricia y sonrisa en mi vida.

A mi familia, gracias por apoyar mi estudio y permitirme soñar.

A Richard, por alegrarme la vida y ser mi compañía.

A mis amigos y colegas, por su sincera amistad y apoyo.

Carolina

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander por brindarnos la formación en Ingeniería Química, espacios culturales y la oportunidad de conocer personas que aportaron a nuestro crecimiento personal y profesional.

Al grupo de investigación CINBIN y al grupo de Investigación en Polímeros por habernos acogido y brindado las herramientas para el desarrollo de este proyecto.

A los Doctores Viviana Sánchez y Gustavo E. Ramírez por haber confiado en nosotros y permitirnos hacer parte de este proyecto de investigación, brindándonos sus conocimientos, tiempo y dirección.

A la Bióloga Oriana Serna Danuta por su orientación y apoyo en todas las etapas del proyecto.

A la química Nathalia Bedoya Carvajal por el tiempo y disposición brindado en la instrucción del manejo de los equipos del laboratorio de polímeros.

Al ingeniero Guillermo Aceros del laboratorio del Centro Integrado de Laboratorios de Ingeniería Química (CLIQ), por su colaboración en el procesamiento de muestra para espectroscopia infrarrojo.

A la Ph.D. Martha Barajas por su asistencia en el procesamiento de muestras para análisis cromatográfico.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	16
1. MARCO TEORICO.....	16
1.1 Polihidroxicanoatos.....	16
1.2 Biosíntesis de PHAs	17
1.3 Ventajas y respuesta a la problemática.....	18
2. METODOLOGÍA	20
2.1 Cepas y condiciones de crecimiento	20
2.2 Crecimiento en MSMGC.....	21
2.3 Selección cualitativa	21
2.4 Cuantificación de PHAs	22
2.5 Caracterización de los PHAs	22
2.5.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	22
2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ...	22
2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	23
2.6 Consumo de Glicerol	23
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	25
3.1 Crecimiento en MSMGC.....	25
3.2 Selección cualitativa	26
3.3 Cuantificación del PHAs	27
3.4 Caracterización del PHAs.....	29

3.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	29
3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	31
3.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	32
3.5 Consumo de Glicerol	33
BIBLIOGRAFÍA.....	35
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto STEM de células <i>Cupriavidus-necator</i> que albergan PHAs.....	16
Figura 2. Estructura de los PHAs.....	17
Figura 3. Condiciones de crecimiento.....	20
Figura 4. Asimilación de las cuatro cepas del glicerol crudo en un medio mínimo de sales a 30°C y 180 rpm.....	25
Figura 5. Tinción rojo de nilo en medio sólido con concentración de 1µg/ml.....	26
Figura 6. Tinción con Rojo de Nilo en medio líquido con concentración de 3.1µg/ml.....	27
Figura 7. Pérdida de peso de una muestra de <i>R. meliloti</i> en MSMGC en el séptimo día (Linea azul), y el programa de temperatura utilizado (línea verde).	28
Figura 8. . Porcentaje de acumulación de PHAs en cuatro diferentes medios de cultivo de <i>R. meliloti</i>	29
Figura 9. Espectrometría infrarrojo de tres muestras de <i>R. meliloti</i> cultivadas en medio LB (rojo), MSMGC (Azul oscuro) y MSMN2 (Azul claro).	30
Figura 10. Cromatograma de una muestra de <i>R. meliloti</i> en MSMGC.....	31
Figura 11. Termograma de una muestra de <i>R. meliloti</i> en MSMGC	32
Figura 12. Asimilación de glicerol para la producción de PHAs en <i>R. meliloti</i> en tres distintos medios	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL GLICEROL CRUDO.....	37
ANEXO B. TINCIÓN ROJO DE NILO.....	38
ANEXO C. ANÁLISIS TERMO GRAVIMÉTRICO.....	39
ANEXO D. METODOLOGÍA DE METANÓLISIS	40
ANEXO E. MÉTODO DE ANÁLISIS GC-MS	42
ANEXO F. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA EN EL DSC	43
ANEXO G. CURVAS DE CALIBRACIÓN	44

RESUMEN

TÍTULO: BIOSINTESIS BACTERIANA DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL CRUDO*

AUTORES:

Richard Alexander Bermúdez Márquez

María Carolina Ordóñez Franco**

PALABRAS CLAVE: Polihidroxicanoatos, Poli-3-hidroxitirato, Glicerol, Cuantificación, Caracterización.

DESCRIPCIÓN:

Los bioplásticos se muestran como una alternativa direccionada a la disminución de los residuos y la contaminación, siendo los polihidroxicanoatos (PHAs) clasificados como bioplásticos sintetizados por vía biotecnológica. El glicerol crudo ha perdido valor comercial debido al incremento en la producción de biocombustibles, generando un problema de disposición. El objetivo principal de este proyecto fue aprovechar el glicerol crudo obtenido como residuo de la industria del biodiesel como sustrato para la producción de PHAs. Se seleccionó cualitativamente una cepa bacteriana productora de PHAs, se cuantificó y finalmente se caracterizó el PHAs intracelular evaluando las propiedades térmicas y su composición. Se determinó la presencia de Poli-3-Polihidroxitirato (PHB) mediante las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FITR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se demostró el aprovechamiento del glicerol crudo por la *R. meliloti* con un porcentaje máximo de acumulación en el séptimo día de 45.04%, porcentaje mayor al obtenido utilizando glicerol puro, utilizando la balanza termogravimétrica (TGA) y un rendimiento del 75%, estimado mediante cromatografía líquida (HPLC). Los análisis realizados en este trabajo fueron llevados a cabo intracelularmente aplicando metodologías sencillas, aportando así la adaptación del método a las condiciones disponibles en la UIS.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Codirector: Ph.D. Gustavo E. Ramírez Caballero

ABSTRACT

TITLE: BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES BIOSYNTESIS FROM WASTE GLYCEROL *

AUTHORS:

Richard Alexander Bermúdez Márquez

María Carolina Ordóñez Franco**

KEY WORDS: Polyhydroxyalkanoates, poly-3-hydroxybutyrate, glycerol, Quantification, Characterization

DESCRIPTION:

Bioplastics are shown as an alternative directed to the reduction of waste and pollution, being the polyhydroxyalkanoates (PHAs) classified as bioplastics synthesized through biotechnology. Crude glycerol has lost market value due to increased biofuel production, creating a disposal problem. The main objective of this project was to exploit the crude glycerol obtained as a residue from the biodiesel industry as a substrate for the production of PHAs. Qualitatively was selected a bacterial strain producer of PHAs, was quantified and finally was characterized by assessing the intracellular PHA thermal properties and its composition. The presence of poly-3-Polyhydroxybutyrate (PHB) was determined by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) techniques. The use of crude glycerol by *R. meliloti* with a maximum rate of accumulation in the seventh day of 45.04%, percentage higher than that obtained using pure glycerol, using the thermogravimetric analysis (TGA) and 75% yield, estimated by liquid chromatography (HPLC). The analyses made in this paper were performed using simple methodologies intracellularly, thereby providing the adaptation of the method to the available conditions at UIS.

* Research project

** Faculty of physicochemical engineering. School of Chemical Engineering. Directors: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Co-director: Ph.D. Gustavo E. Ramírez Caballero

LISTA DE ABREVIATURAS

MSMGP	medio mínimo de sales con glicerol puro
MSMGC	medio mínimo de sales con glicerol crudo
MSMN2	medio mínimo de sales rico en nitrógeno
LB	medio Luria Bertani
PHAs	Polihidroxicanoatos
PHB	Poli-3-hidroxibutirato

INTRODUCCIÓN

Los plásticos son conocidos por ser un extenso grupo de materiales orgánicos, los cuales poseen como elemento principal el carbono, además del oxígeno, nitrógeno e hidrógeno [1]. Estructuralmente los plásticos están conformados por cadenas poliméricas, el ejemplo más común es el polietileno derivado del petróleo a partir de la polimerización del eteno. Debido a su lenta descomposición, el uso intensivo de éstos ha llevado a la acumulación de desechos difíciles de manejar, un pequeño porcentaje es incinerado y otra parte es reciclada, sin embargo estas acciones no son suficientes para contener la acumulación de residuos plásticos, sin mencionar que la incineración de estos conlleva a la liberación de gases tóxicos a la atmósfera [2].

Los bioplásticos se muestran como una alternativa direccionada a la disminución de los residuos y la contaminación debido a que su obtención puede ser a partir de recursos renovables o desechos, además de contar con propiedades como biocompatibilidad y biodegradabilidad. Pueden ser clasificados en tres tipos; bioplásticos procedentes de recursos renovables, polímeros biodegradables sintéticos y bioplásticos sintetizados por vía biotecnológica, esta última clasificación incluye los polihidroxialcanoatos (PHAs) [3]. Este biopolímero es un producto microbiano, que puede ser biosintetizado por una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas [4], además el sustrato usado como fuente de carbono para el crecimiento puede ser un material orgánico de desecho que no representa valor comercial y contribuye a la disminución de costos en la disposición y tratamiento de desechos.

Con este trabajo se busca aprovechar el glicerol crudo obtenido como residuo de la industria del biodiesel como sustrato para la producción de PHAs. Se seleccionó cualitativamente una cepa bacteriana productora de PHAs, se estandarizó su

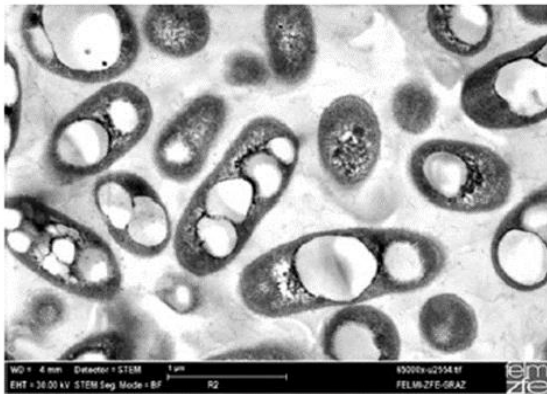
metodología de cultivo y finalmente se caracterizó el PHAs intracelular evaluando las propiedades térmicas y su composición.

1. MARCO TEORICO

1.1 Polihidroxicanoatos

Los PHAs son sintetizados por una variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos que los acumulan como reservas de carbono y energía en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma microbiano como se puede apreciar en la Figura 1. Se producen cuando el medio de cultivo se encuentra desbalanceado con limitación de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio y/o oxígeno y con exceso de carbono [5]. Las investigaciones sobre el proceso de acumulación indican que la producción del polímero puede llegar a representar hasta el 90% del peso total de materia seca en la célula [6].

Figura 1. Foto STEM de células *Cupriavidus-necator* que albergan PHAs

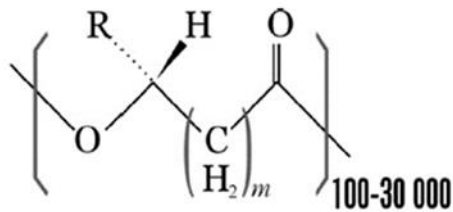


Fuente: [7]

Los tipos más comunes de PHAs son llamados de cadena corta y pueden contener monómeros de entre 2 a 5 átomos de carbono [8], estos son termoplásticos y semicristalinos, y los de cadena media de 6 a 12 átomos de carbono son más elásticos. La Figura 2 representa la estructura de los PHAs. Entre los homopolímeros, los más importantes son el Polihidroxibutirato (PHB) con $R = CH_3$, el polihidroxivalerato (PHV), con $R = CH_3CH_2$, y el polihidroxihexanoato (PHHx),

con $R = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$. La inclusión de los anteriores monómero permite obtener copolímeros, tales como el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) [P(3HB-co-3HV)], el cual fue producido comercialmente con el nombre de BioPol TM por Bio Zeneca Products [9]. Este polímero es renovable y biocompatible por lo que su uso es promisorio en la medicina y el campo farmacéutico [10].

Figura 2. Estructura de los PHAs



Fuente: [11]

1.2 Biosíntesis de PHAs

La biología de los PHAs es bastante compleja, debido a que la acumulación de PHAs al interior de la célula es controlada por muchos genes que codifican pluralidad de enzimas que indirecta o directamente están involucradas con la síntesis de PHAs. Se conocen 8 rutas metabólicas diferentes para la biosíntesis de PHAs [12], la ruta más estudiada consiste en reacciones catalizadas por 3 enzimas [13], la β -ketiolasa, NADPH-dependiente acetoacetyl-CoA reductasa, y PHAs sintasa, codificadas respectivamente por los genes *phaA*, *phaB*, y *phaC* [14]. Un factor importante en la producción de PHAs es la concentración de sustrato para la PHAs sintetasa, ya que este puede determinar la masa molecular y la composición del biopolíester, aunque también influye la presencia de despolimerasas, esterases o lipasas que puedan hidrolizar el polímero ya acumulado [15]. Vale la pena resaltar la importancia de las rutas metabólicas ya que a partir de estrategias basadas en la biología sintética se pueden construir rutas de síntesis para una amplia gama de productos químicos incluso no naturales que incorporadas con éxito tendrán un

significativo impacto en las propiedades del bioplástico, generando una mejor relevancia en la industria y la viabilidad comercial de los PHAs [16].

La estequiometría de los PHAs favorece su biodegradabilidad, son fácilmente degradables en distintos ambientes por variedades de bacterias y hongos [10]. Los PHAs son sustitutos atractivos de los poliésteres de origen petroquímico. En la naturaleza, los microorganismos son capaces de degradarlos hasta dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias, y hasta metano en condiciones anaerobias, por acción de las enzimas PHAs despolimerasas, sin la formación de productos tóxicos [15].

Cepas de *Rhizobium* spp. tienen la capacidad de acumular desde 27% hasta el 57% de biopolímero en biomasa, entre estas *R. meliloti* produce más PHAs que las demás especies *Rhizobium* spp., alrededor del 55% de su biomasa [17]. En medio de crecimiento manitol la *R. meliloti* sintetizó un biopolímero de composición 99 mol% PHB y 1 mol% PHV, acumulando 57% de su biomasa [18]. En cepas de *R. meliloti* modificadas genéticamente para favorecer la producción de PHAs se han alcanzado porcentajes de acumulación alrededor de 61 % [19]. Se han realizado experimentos para el aprovechamiento de residuos agrícolas como la cáscara de arroz como suplemento nutritivo que favorecieran el crecimiento celular y la calidad del polímero obtenido a partir de *R. meliloti*, pero no se evidenció una diferencia notable en la producción de biopolímero en las concentraciones trabajadas, 20% y 40% de cáscara de arroz fresca, en un medio de producción de polímero [20]

1.3 Ventajas y respuesta a la problemática

Existe una gran cantidad de microorganismos capaces de degradar los PHAs de los cuales 330 ya han sido aislados e identificados: 154 bacterias, 77 estreptomicetos y 99 hongos [15]. Este biopolímero se ha posicionado como una alternativa biotecnológica bastante importante debido a sus propiedades como plásticos biodegradables y similitud a los plásticos convencionales [22].

El incremento en la producción de biocombustibles en muchas áreas del mundo debido a los elevados costos en los combustibles fósiles y la búsqueda de recursos energéticos con menor impacto ambiental, ha llevado al glicerol crudo, un subproducto del proceso en la obtención del biodiesel a desplomar su valor comercial y consecuentemente generar un problema de disposición de residuos [23]. Aunque este puede ser purificado por medio de destilación de alto vacío [24], para su utilización en la industria farmacéutica, cosmética entre otras, conlleva un costo elevado en su purificación que no puede ser recuperado en el mercado. De esta manera la aplicación del glicerol crudo como materia prima para la elaboración de otros compuestos, en este caso en la producción de biopolímeros, no solo mejora la viabilidad económica de la elaboración de biodiesel sino también disminuye la huella ambiental del mismo.

Otras de las ventajas que presentan los PHAs son:

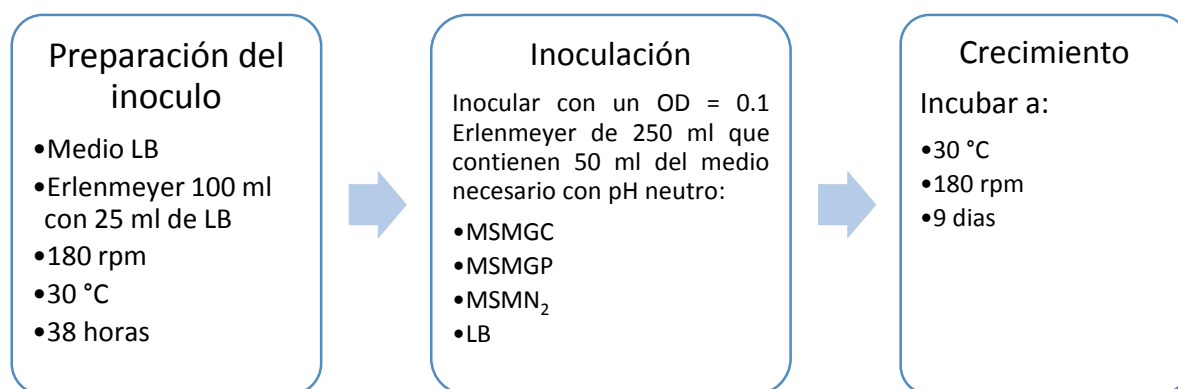
- Los PHAs no contribuyen a la crisis de los vertederos al contrario de los plásticos convencionales gracias a su biodegradabilidad.
- Debido a que los PHAs son desarrollados a partir de recursos renovables, en su producción no se requieren de recursos fósiles o minerales.
- El flujo de carbono que se da en la síntesis y biodegradación de los biopolímeros es balanceada, lo que no representa una contribución para el calentamiento global.
- En el campo medico los PHAs presentan mayor biocompatibilidad comparado con los plásticos convencionales [25].

2. METODOLOGÍA

2.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Cuatro cepas bacterianas (*Rhizobium meliloti*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas putida*) posibles productoras de PHAs se obtuvieron en colaboración con Pennsylvania State University. Para cada cepa, se prepararon precultivos por duplicado a partir de colonias individuales, a 30 °C, 180 rpm durante 38 horas usando 25 ml de medio Luria Bertani (LB) [26]. En los experimentos de producción de PHAs se utilizaron diferentes medios de cultivo: medio mínimo de sales [27] con glicerol crudo como fuente de carbono (MSMGC), medio mínimo de sales con glicerol puro (MSMGP), medio mínimo de sales con una concentración 10 veces mayor de nitrógeno (MSMN₂) y LB. Los cultivos se realizaron por duplicado a 30 °C y 180 rpm en un baño de María con agitación TECHNE TSBS40 durante 9 días en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio, procedimiento resumido en la Figura 3.

Figura 3. Condiciones de crecimiento



2.2 Crecimiento en MSMGC

Con el fin de asegurar la capacidad de las cepas de asimilar el glicerol crudo como fuente de carbono, se tomaron las cuatro cepas y se monitoreó su crecimiento midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO) usando un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25.

Las cepas fueron cultivadas a partir de colonias individuales y por duplicado en medio líquido MSMGC en tubos de ensayo de 12 ml a diferentes concentraciones de glicerol 2, 5 y 10 (g/L) y pH 7.0, se mantuvo la temperatura en 30°C y 180 rpm en un baño de María con agitación TECHNE TSBS40. Los tiempos utilizados para las mediciones de densidad óptica fueron 48 y 72 horas.

EL glicerol crudo utilizado fue proveído por la planta BioSC S.A (Biocombustibles Sostenibles del Caribe), cuyas propiedades fisicoquímicas se encuentran compiladas en el ANEXO A [24].

2.3 Selección cualitativa

Se realizó una selección cualitativa de la cepa mejor productora de PHAs mediante la tinción con Rojo de Nilo en medio sólido y líquido. En estado sólido las células crecieron en platos de medio MSMGC agar con una concentración de 1 µg/ml de tinte a 30 °C [28]. En estado líquido las células se cultivaron en medio LB a 30°C, se centrifugaron y se re-suspendieron en agua destilada con 3.1 µg/ml de Rojo de Nilo [29]. Posteriormente las células fueron expuestas a radiación ultravioleta (UV) con longitud de onda de 302 nm utilizando el Transiluminador UVP BioDocIt 220 Imagen System. Se utilizó como control negativo la cepa *Escherichia coli*, dado que no es productora de PHAs [28]. Se seleccionó la cepa con mayor fluorescencia para continuar los ensayos de producción y caracterización de los PHAs. El protocolo detallado se encuentra en el ANEXO B.

2.4 Cuantificación de PHAs

El análisis termogravimétrico efectuado con la Balanza Termogravimétrica Discovery TGA 1-0207 permite medir la pérdida de peso de una muestra a medida que transcurre el tiempo y se dan cambios programados en la temperatura de la muestra. Debido a que el PHAs es un producto intracelular, utilizando el TGA puede cuantificarse la cantidad de biopolímero en el transcurso de los días al conocer la temperatura de descomposición del mismo sin necesidad de una extracción previa y así mismo identificar el tiempo en el cual se alcanza la máxima producción de PHAs. Un programa de temperatura adecuado es indispensable para registrar las pérdidas de peso de manera conveniente, el utilizado en este proyecto puede encontrarse en el ANEXO C.

2.5 Caracterización de los PHAs

2.5.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja se utilizó para detectar vibraciones características de los grupos funcionales en los PHAs, en el espectrómetro FTIR-A8400S Shimadzu en modo de transmitancia en un rango de 4000 a 40 cm^{-1} . Se tomó una muestra de cultivo en su día máximo de producción de polímero para los cultivos en cada uno de los medios LB, MSMGC y MSMN₂ en un tubo Eppendorf, se centrifugó en una micro centrífuga Thermo Scientific Sorvall Legend micro21 a 15000 g durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. La muestra se dejó secar al aire durante una noche en la incubadora de 37°C.

2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para el análisis de GC-MS se requiere la transformación del polímero en moléculas pequeñas, en este caso se realiza la metanólisis del polímero para obtener los

ésteres metílicos del monómero. Este procedimiento se llevó acabo siguiendo la metodología de [30] descrita en el ANEXO D.

La muestra extraída y almacenada en viales de 1.5 ml fue analizada por el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C VL MSD con detector de triple eje siguiendo el método planteado por [31] detallado en el ANEXO E con el fin de identificar el PHAs.

2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El DSC permite encontrar propiedades importantes de los polímeros tales como el punto de fusión y la temperatura de transición vítrea. Con este fin se usó el Calorímetro Diferencial de Barrido Discovery DSC 1-0237 en modo estándar usando una rampa de calentamiento de 20 °C/min, desde 30 °C hasta 115 °C para eliminar el agua remanente presente en la muestra, acto seguido se estabilizó la temperatura en -20 °C y se prosiguió con una rampa de calentamiento de 3 °C/min hasta alcanzar 225 °C. La preparación de la muestra y el procedimiento para obtener una lectura óptima pueden encontrarse en el ANEXO F

2.6 Consumo de Glicerol

Para su análisis se tomó una muestra de cultivo en cada uno de los medios que contenían glicerol crudo o glicerol puro, justo antes de realizar la inoculación y 9 días después. Las muestras se centrifugaron a 15000 g durante 3 minutos y se almacenó el sobrenadante filtrado con una membrana de 0.45 µm.

Para la cuantificación del consumo de glicerol, la técnica empleada fue la de cromatografía líquida de alta eficacia con una columna Biorad Aminex PX-87H acoplada a el equipo UFLC20AD Shimadzu seguida de un detector de índice de

refracción RID-10A. El equipo operó a una temperatura de 65°C, con flujo de 0.6 ml/min. La fase móvil empleada fue una solución de ácido sulfúrico 5mM.

Se realizó una curva de calibración con el contenido de glicerol puro y crudo en las muestras, las cuales se encuentran en el ANEXO G. Las curvas de calibración se elaboraron mediante la preparación de soluciones de 0 gL⁻¹, 2 gL⁻¹, 4 gL⁻¹, 6 gL⁻¹, 8 gL⁻¹, 10 gL⁻¹ y 12 gL⁻¹ en los viales de HPLC para glicerol crudo y glicerol puro.

El cálculo del rendimiento se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación para todos los medios analizados:

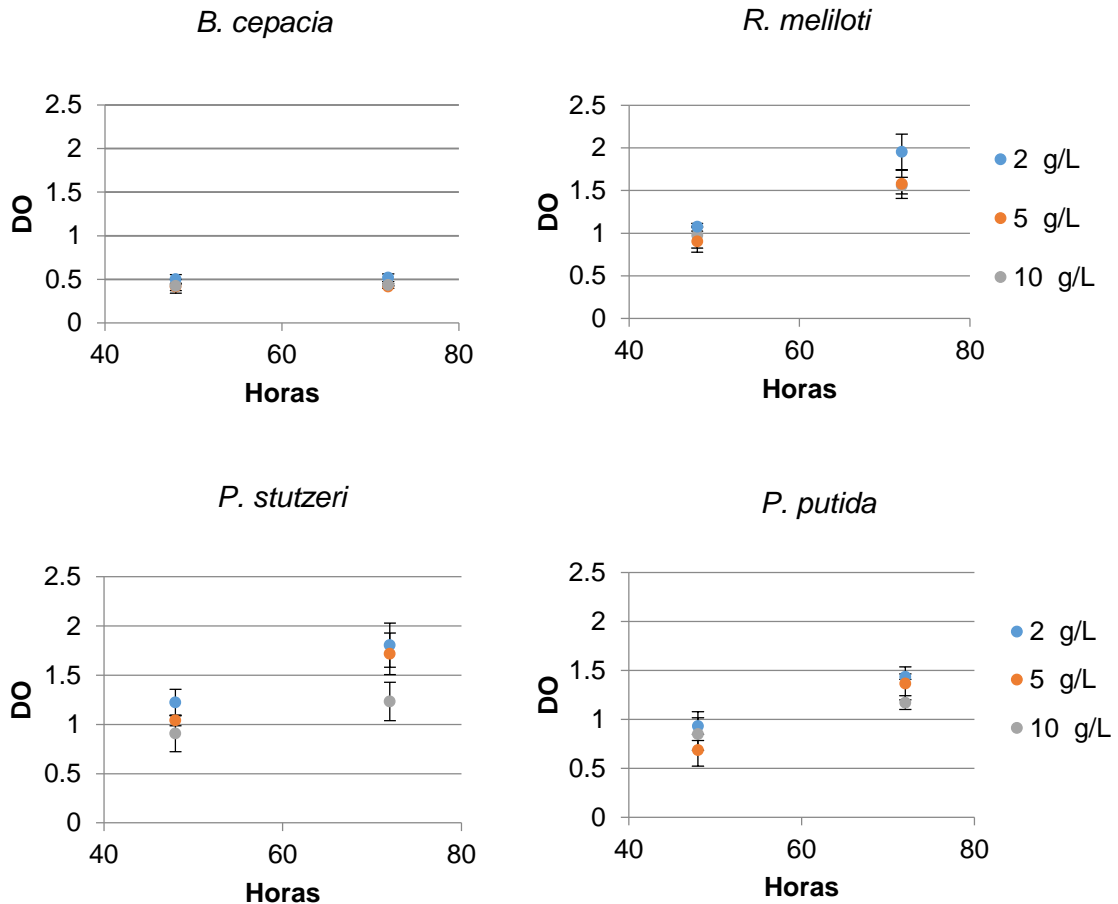
$$\text{Consumo de glicerol \%} = \frac{[\text{Glicerol}]_{\text{día 0}} - [\text{Glicerol}]_{\text{día 9}}}{[\text{Glicerol}]_{\text{día 0}}} * 100$$

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Crecimiento en MSMGC

El experimento demostró la capacidad de asimilamiento del glicerol crudo en un medio mínimo de sales por la *P. putida*, *R. meliloti* y *P. stutzeri*, dado el crecimiento de las mismas evidenciado en la Figura 4. Por el contrario el crecimiento presentado por la *B. cepacia* fue despreciable.

Figura 4. Asimilación de las cuatro cepas del glicerol crudo en un medio mínimo de sales a 30°C y 180 rpm.



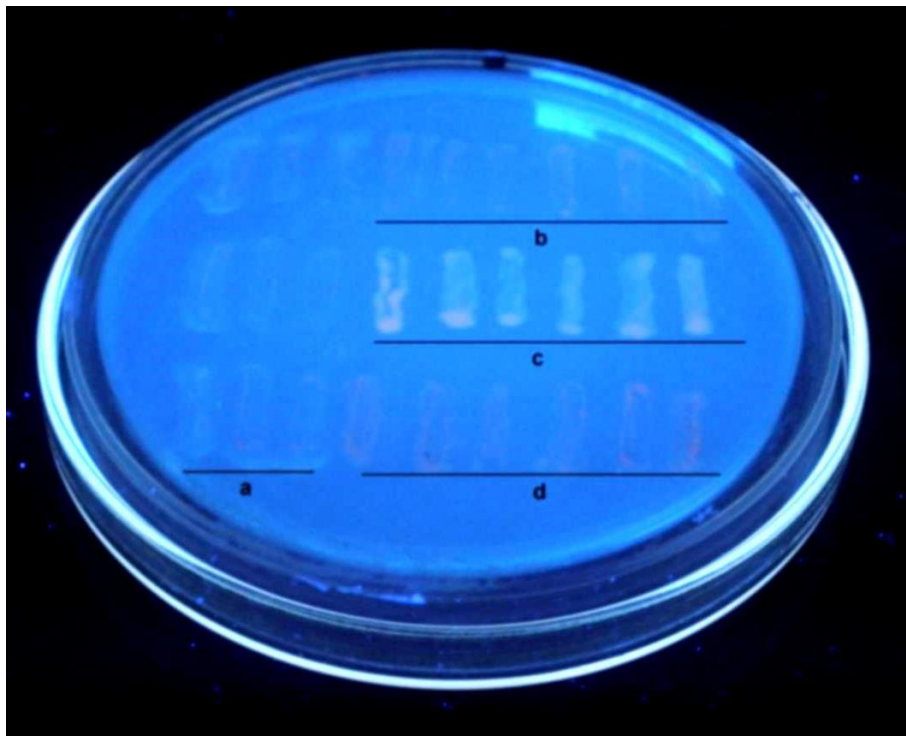
Se evidenció que entre las tres concentraciones no existe una diferencia de crecimiento considerable para las bacterias *P. putida*, *B. cepacia* y *R. meliloti*, *P. stutzeri*.

3.2 Selección cualitativa

Inicialmente se realizó el protocolo de tinción con Rojo de Nilo en un medio sólido utilizando las cuatro cepas, pero no se pudo conseguir un crecimiento notorio de la *B. cepacia* como ya se había evidenciado en el experimento de crecimiento en medio MSMGC.

Analizando la fluorescencia obtenida por las otras tres cepas en comparación con el blanco, se observó que la *R. meliloti* presentó la mayor emisión seguida por la *P.putida*, ver Figura 5.

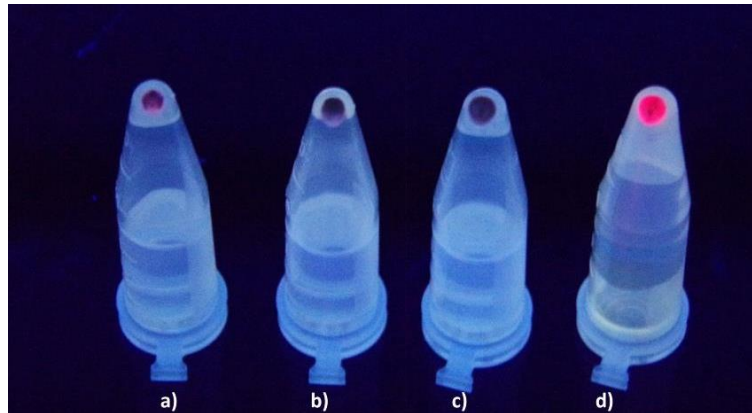
Figura 5. Tinción rojo de nilo en medio sólido con concentración de 1µg/ml



a) *E. coli* JM109 (control negative) b) *P. stutzeri* c) *R. meliloti* d) *P. putida*

La tinción también se llevó a cabo utilizando el protocolo en medio líquido en dónde se corroboró la fuerte emisión presentada por la *R. meliloti*, como se puede apreciar en la Figura 6. Con base en esta selección cualitativa de posible acumulación de PHAs, se escogió como cepa de estudio la *R. meliloti*.

Figura 6. Tinción con Rojo de Nilo en medio líquido con concentración de 3.1µg/ml

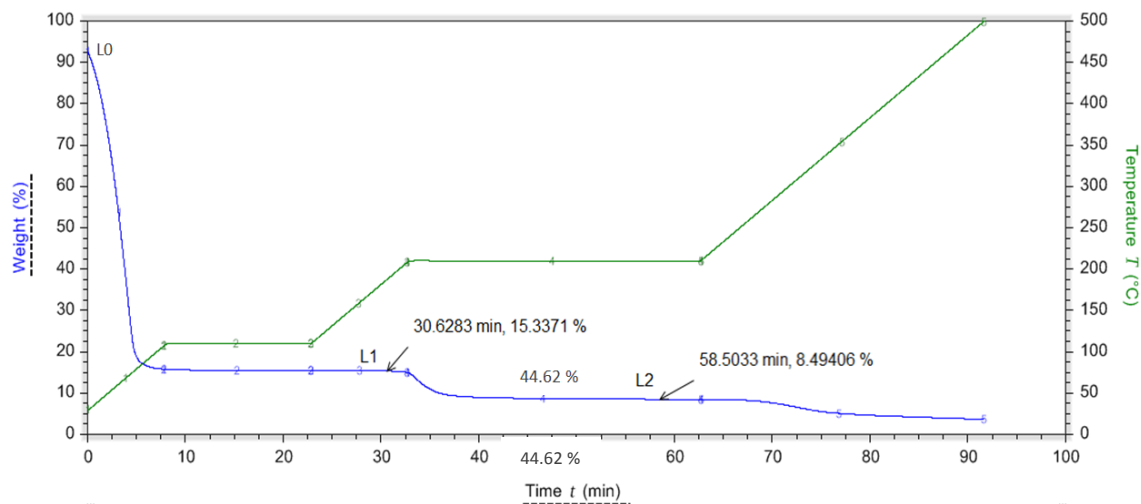


a) *E. coli* JM109 (control negativo) b) *P. putida* c) *P. stutzeri* d) *R. meliloti*

3.3 Cuantificación del PHAs

El análisis termogravimétrico resultante para una de las muestras se puede observar en la Figura 7. La diferencia entre los puntos L0 y L1 representa la pérdida de peso por el agua presente en la muestra, la diferencia entre L1 y L2 corresponde a la pérdida de peso por degradación del polímero, lo cual ocurre después de alcanzados los 210°C y la pérdida de peso que se observa posterior a la isoterma a 210°C es debida a la degradación del cuerpo celular [32].

Figura 7. Pérdida de peso de una muestra de *R. meliloti* en MSMGC en el séptimo día (Línea azul), y el programa de temperatura utilizado (línea verde).

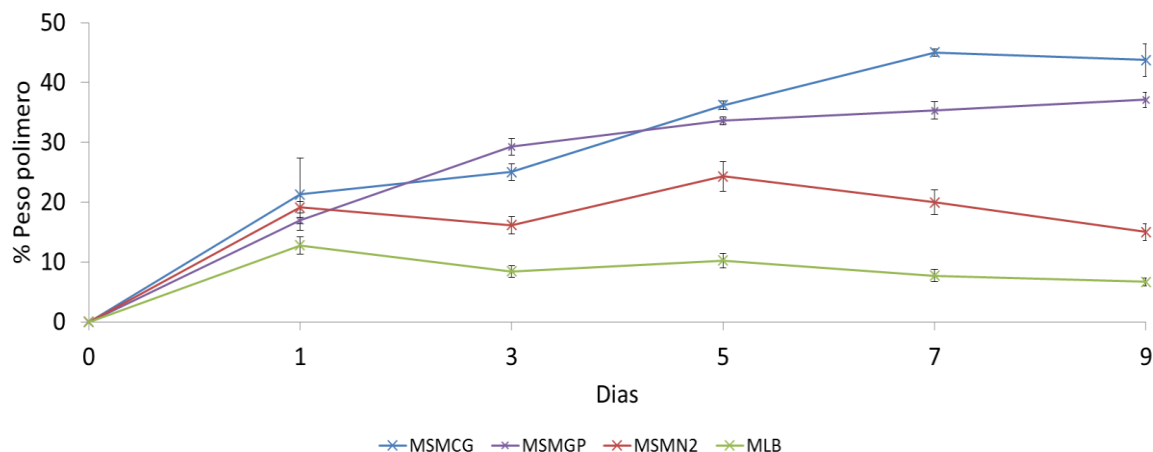


El porcentaje en peso seco perdido en la muestra a causa de la degradación del biopolímero, es decir la fracción de PHAs en las células, se puede representar como:

$$Y_{P/X} = \frac{L1 - L2}{L1}$$

El porcentaje de acumulación de PHAs en base seca obtenido diariamente en cada uno de los medios estudiados se encuentra en la Figura 8. Se pudo corroborar que la baja concentración de nitrógeno en el medio MSM favorece la acumulación de PHAs dado que al agregar nitrógeno en él, el porcentaje de PHAs disminuye considerablemente. El valor máximo de producción se presentó en el séptimo día con un porcentaje de acumulación de 45.04% en el medio con glicerol crudo, siendo este 10% mayor que el glicerol puro.

Figura 8. . Porcentaje de acumulación de PHAs en cuatro diferentes medios de cultivo de *R. meliloti*.



3.4 Caracterización del PHAs

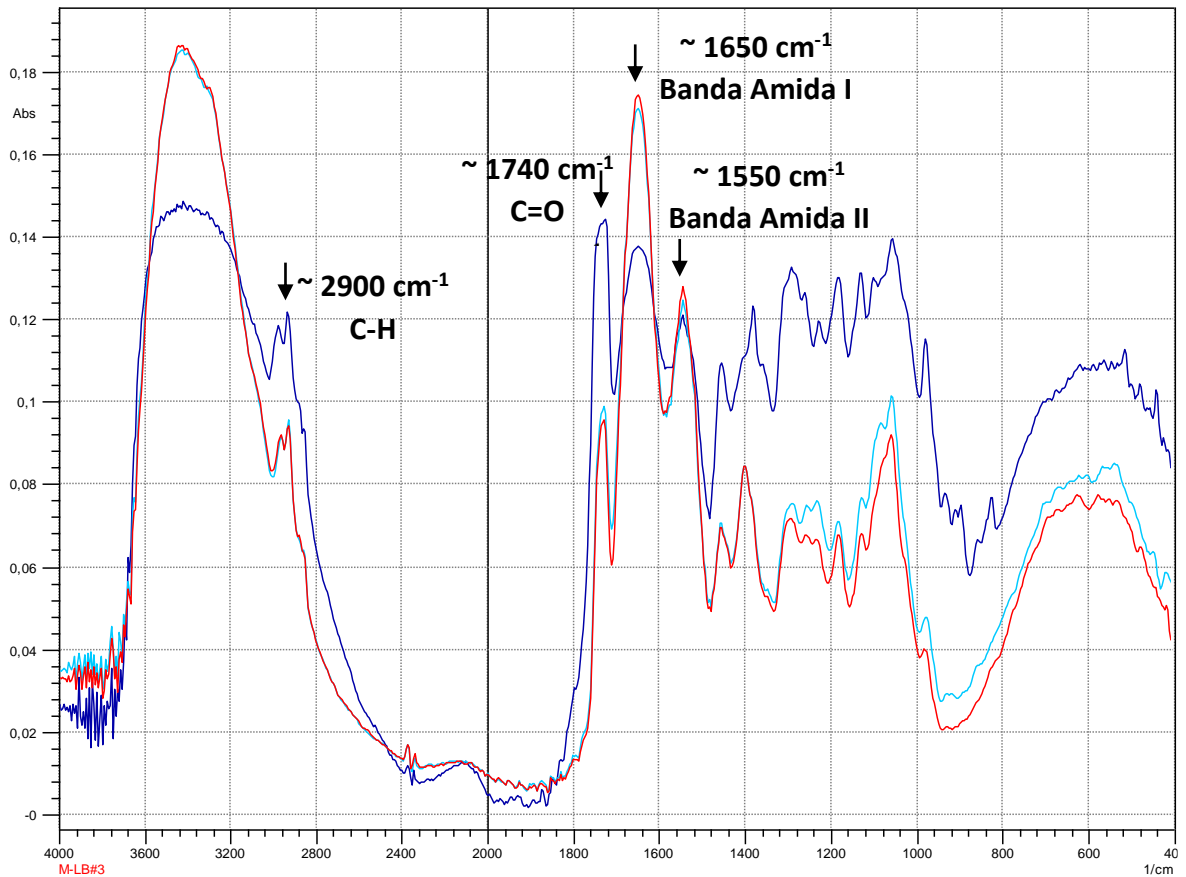
3.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó el análisis de espectroscopia infrarrojo para muestras de *R. meliloti* sometidas a crecimiento en tres diferentes medios: LB, MSMGC y MSMN2, con la finalidad de corroborar el efecto que tiene el medio mínimo y la deficiencia de nitrógeno en la acumulación del PHAs.

La Figura 9 presenta el análisis por espectrometría infrarrojo, el cual reveló picos característicos que han sido asociados en la literatura a cultivos en los que se producido PHB puro. El pico a 2900 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones del metileno C-H y el pico a 1740 cm^{-1} se presenta debido al grupo funcional éster (C=O) [33]. La locación exacta del pico en las bandas reportadas se conoce que varía con la longitud de cadena del polímero y la cristalinidad del PHAs [34].

También se encontró la presencia de dos picos representativos en 1650 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} , conocidos como banda de amida I y banda de amida II respectivamente, los cuales están asociados a la presencia de proteínas celulares, dado que el análisis se realizó sin previa extracción del polímero (intracelular) [35].

Figura 9. Espectrometría infrarrojo de tres muestras de *R. meliloti* cultivadas en medio LB (rojo), MSMGC (Azul oscuro) y MSMN2 (Azul claro).

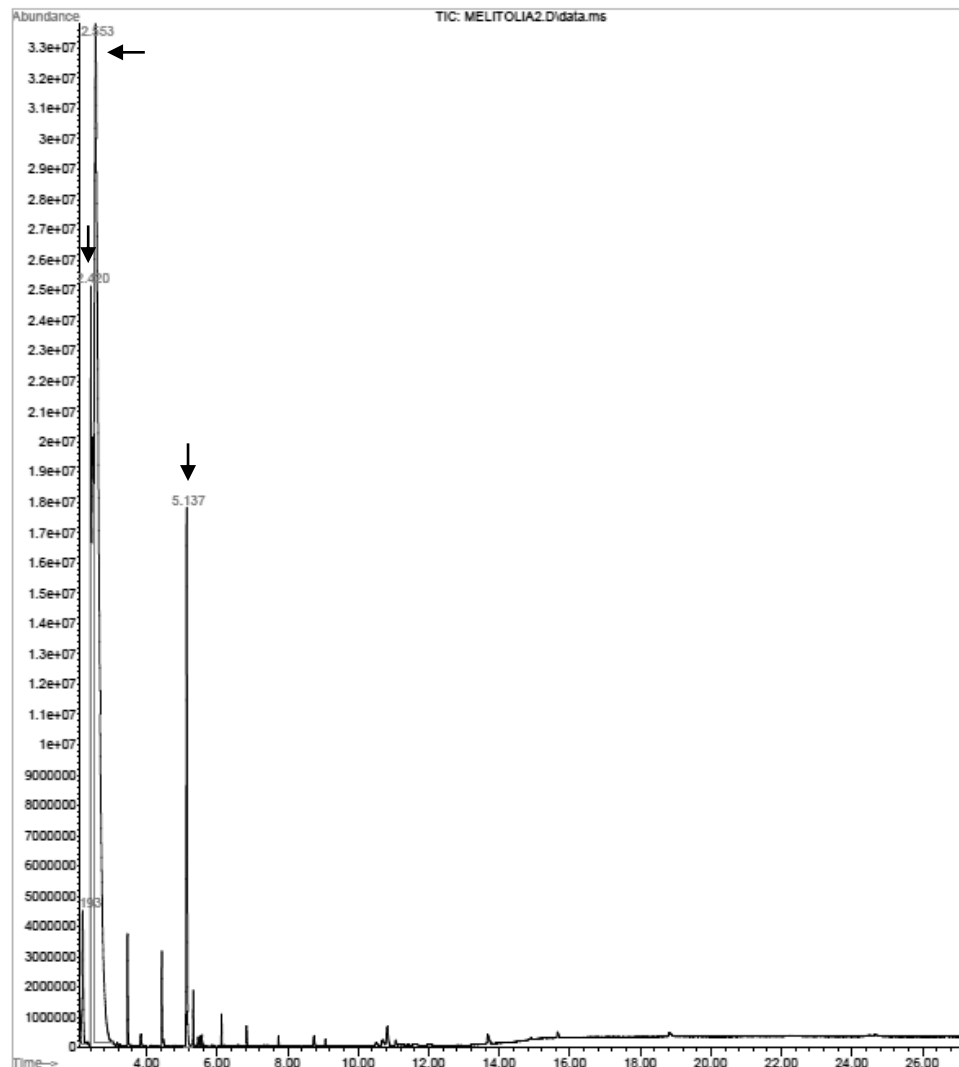


Al realizar un análisis de los tres medios se evidenció que los picos característicos de PHB presentan la intensidad más alta en el medio MSMGC en relación a la banda amida I correspondiente a las proteínas celulares, sugiriendo que el porcentaje de acumulación intracelular del polímero fue mayor en este medio.

3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

En la Figura 10 se puede observar el espectro resultante del análisis de cromatografía realizado a una muestra en medio mínimo de sales con glicerol crudo, donde los primeros dos picos 2.420 y 2.553 corresponden al metanol y al cloroformo respectivamente que fueron usados durante la reacción de metanización. El pico en el tiempo 5.137 corresponde al metil 3-Polihidroxibutanoato lo que confirma la presencia de PHB acumulado por el microorganismo.

Figura 10. Cromatograma de una muestra de *R. meliloti* en MSMGC

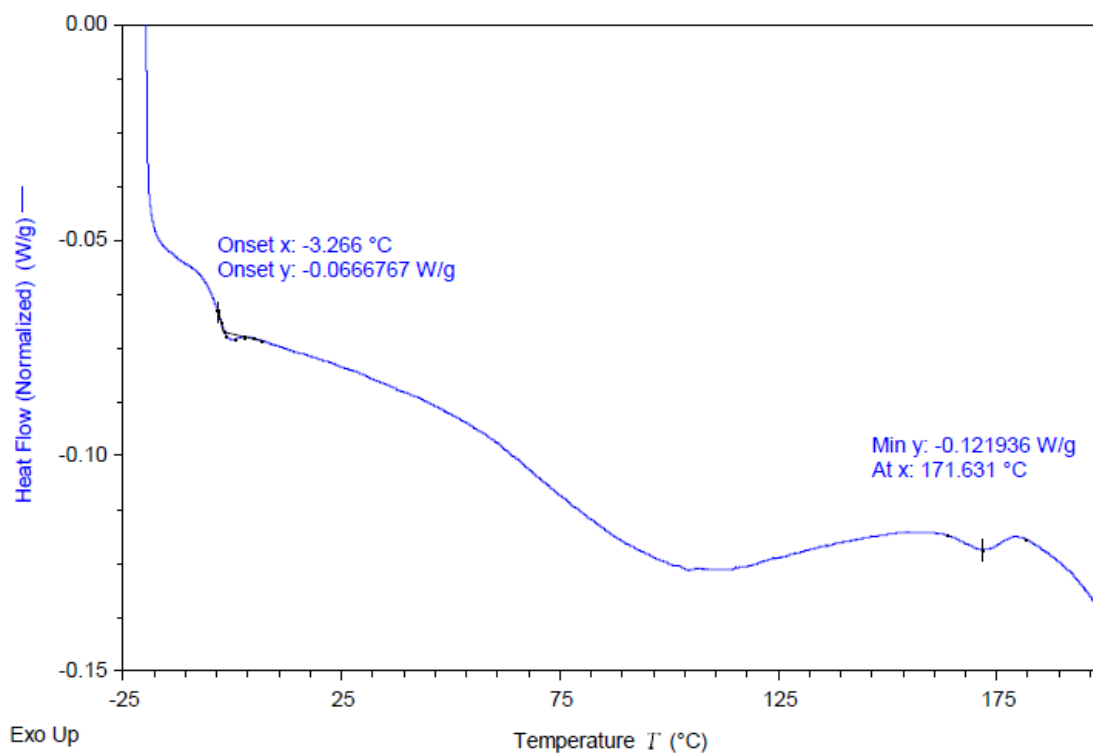


La identificación de PHB ratifica la existencia de diferentes caminos metabólicos para la asimilación del carbono. Es así como se obtienen distintos polímeros con la cepa *R. meliloti* dependiendo de la fuente de carbono disponible, P(3HB-co-3%HV) es obtenido a partir de la utilización de sucrosa [36] y P(3HB-co-2%HV) al recurrir a cascara de arroz fresca [20].

3.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En la Figura 11 se observa el termograma obtenido para una muestra de *R. meliloti* en un medio MSMGC, el cual presenta dos puntos importantes para la caracterización del polímero. El primero ubicado a $-3.266\text{ }^{\circ}\text{C}$ el cual corresponde a la temperatura de transición vítrea del polímero y el segundo en el mínimo a $171.631\text{ }^{\circ}\text{C}$ representa la temperatura de fusión del polímero [33]. El mínimo alrededor de los 100°C es característico del agua remanente asociada a la muestra.

Figura 11. Termograma de una muestra de *R. meliloti* en MSMGC

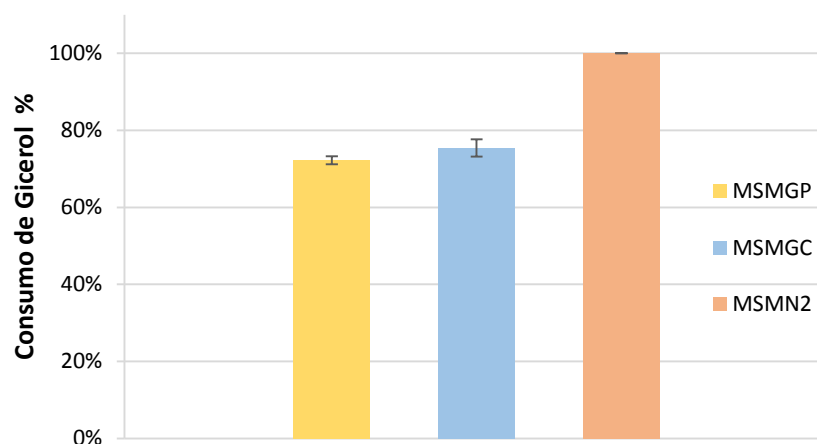


Según la Tabla 1 reportada en [37] y el Cuadro III reportado en [21] el PHB presenta temperatura de transición vítrea a 4°C y la temperatura de fusión es 177 - 179°C, los cuales son cercanos a los obtenidos en la muestra de células de *R. meliloti* en medio MSMGC, -3.266°C y 171.6°C respectivamente. La discrepancia presente en la temperatura de transición puede ser atribuida a la presencia de proteínas celulares, ya que los valores de la referencia son característicos de un polímero puro.

3.5 Consumo de Glicerol

Como se puede apreciar en la Figura 12 no se observa una diferencia significativa en la asimilación del glicerol puro y glicerol crudo como fuente de carbono (72% y 75% respectivamente) por la *R. meliloti* en medio MSM. Aunque la asimilación de glicerol en medio MSMN2 fue de 100% este no es un medio apropiado para la producción de PHAs como puede ser evidenciado en la cuantificación del mismo.

Figura 12. Asimilación de glicerol para la producción de PHAs en *R. meliloti* en tres distintos medios



CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el glicerol crudo subproducto de la elaboración de biodiesel, puede ser aprovechado en la producción de biopolímeros sintetizados por *R. meliloti* en medio mínimo de sales, siendo asimilado en aproximadamente un 75% y promoviendo una mayor acumulación de PHAs en comparación con el glicerol puro como fuente de carbono.

El porcentaje de acumulación máximo de PHAs alcanzado con la metodología propuesta fue de 45.04% lo cual no se aleja del valor máximo alcanzado para la cepa *R. meliloti* de 61% de acumulación incluso con modificación genética orientada a favorecer la producción de biopolímero.

Las metodologías propuestas más estudiadas para la caracterización y cuantificación de PHAs requieren etapas complejas para el aislamiento o extracción del polímero, sin embargo los análisis realizados en este trabajo fueron llevados a cabo intracelularmente aplicando metodologías sencillas. Aportando así la adaptación del método a las condiciones disponibles en la UIS.

BIBLIOGRAFÍA

HONG, K. *et al.* A rapid method for the detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy En: *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, vol. 51, p. 523-526.

KOLLER, M. *et al.* Microbial PHA production from waste raw material. En: *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. 2010, p. 85-119.

LAKSHMAN, K. *et al.* Enhanced biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in a mutant strain of *Rhizobium meliloti*. En: *Biotechnology Letters* 2003, vol. 25, p. 115-119.

LAYCOCK, B. *et al.* The chemochemical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. En: *Progress in Polymer Science*. 2013, p 1-46.

LEE, E. Y. *et al.* Structural identification of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) containing 4-hydroxyalkanoic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application to bacteria screening. En: *Biotechnology techniques*. 1997, vol. 11, nº 3, p. 167-171.

MIURA, T. *et al.* Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* cultivated in a glycerol/nonanoic acid-containing medium. En: *Journals of Polymers and the Environment*. 2013, vol 21, p. 760-765.

SPIEKERMANN, P. *et al.* A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. En: *Archives of Microbiology* 1999, vol. 171, p. 73-80.

TALON, O. *et al.* Method for rapid control of bacterial PHA production through thermogravimetric analysis. En: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2011, vol 86, p. 1195-1197.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. M. Cornish, *El ABC de los plásticos*, Universidad Iberoamericana, 1997.
- [2] S. Warvel, F. Brüse, C. Demes, M. Kunz y M. Rüş, «Polymers and surfactants on the basis of renewable resources,» *Chemosphere*, p. 1, 2001.
- [3] Remar, «Bioplásticos. Guía práctica - Número 2,» Red de energía y medio ambiente , 2011.
- [4] B. Rehm, «Polyester synthases: natural catalysts for plastics,» *Bio-chemical Journal*, vol. 376, pp. 15-33, 2003.
- [5] L. L. Madison y W. G. Huisman, «Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic.,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 63(1), pp. 21-53, 1999.
- [6] D. Byrom, «Polymer synthesis by micro-organism: technology and economics,» *Trends Biotechnology*, pp. 246-250, 1987.
- [7] M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer y G. Braunegg, «Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources,» *Materials and Technology* , vol. 46, nº 6, pp. 23-30, 2013.
- [8] A. Anderson y E. Dawes, «Ocurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 54, pp. 450-472, 1990.
- [9] P. A. Holmes and G. B. Lim, "Separation process". United States Patent 4910145, 1990.
- [10] P. Phukon, J. Saikia y K. B. Konwar, «Bioplastics (P-3HB-co-3HV) from bacillus circulans (MTCC 8167) and its biodegradation,» *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, vol. 92, pp. 30-34, 2012.
- [11] N. Jacquel , C.-W. Lo, Y.-H. Wei, H.-S. Wu y S. S. Wang, «Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates),» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, pp. 15-27, 2008.
- [12] A. Steinbuchel y T. Lutke-Eversloh, «Metabolic engineering and path-way construction for biotechnological production of relevant polyhydrxalkanoates in microorganism,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 16, pp. 81-96, 2003.

- [13] M. Singh, K. S. Patel y C. V. Kalia, «Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates,» *BioMed Central*, 2012.
- [14] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker y P. Lant, «The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates,» *Progress in Polymer Science*, 2013.
- [15] Y. Gonzalez, J. C. Meza, O. Gonzalez y J. A. Cordova, «Sintesis y biodegradacion de polihidroxicanoatos: Plasticos de origen microbiano,» *Revista Internacional Contaminacion y Ambiente*, vol. 29(1), pp. 77-115, 2013.
- [16] D. Agnew and F. Pfleger, "Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources," *Chemical Engineering Science*, 2012.
- [17] R. Tombolini y M. P. Nuti, «Poly(B-hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different Rhizobium species,» *FEMS Microbiology*, vol. 60, pp. 299-304, 1989.
- [18] K. Lakshman y T. R. Shamala, «Enhanced biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in a mutant strain of Rhizobium meliloti,» *Biotechnology Letters*, vol. 25, pp. 115-119, 2003.
- [19] K. Lakshaman, N. K. Rastogi y T. R. Shamala, «Simultaneous and comparative assessment of parent and mutant strain of Rhizobium meliloti for nutrient limitation and enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production using optimization studies,» *Process Biochemistry*, vol. 39, pp. 1977-1983, 2004.
- [20] S. Devi, S. Vijayendra y T. R. Shamala, «Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra - and extra-cellular polymers by Sinorhizobium meliloti MTCC 100,» *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 1, pp. 80-84, 2012.
- [21] Y. González García , J. C. Meza Contreras, O. González Reynoso y J. A. Córdova López, «Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano,» *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 29, nº 1, pp. 77-115, 2013.
- [22] S. Mamtesh, P. K. Sanjay y K. C. Vipin, «Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates,» *BioMed Central*, 2009.
- [23] M. Koller, A. Atlíc, M. Dias , A. Reiterer y G. Braunegg, «Microbial PHA production from waste raw material,» de *Plastics from Bacteria: Natural*

Functions and Applications, G. -. Chen, Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, 2010, pp. 85-119.

- [24] J. P. Pineda Martínez y J. Z. Rojas Cristancho, Factores que afectan la polimerización del glicerol crudo para la producción de poliglicerol, Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013.
- [25] Q. Ren, G. Roo, B. Witholt, M. Zinn y L. Thony-Meyer, «Influence of growth stage on activities of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerase and PHA depolymerase in *Pseudomonas putida* U,» *BMC Microbiology*, vol. 10, p. 254, 2010.
- [26] J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [27] M. Berlanga, M. T. Montero, J. Hernandez-Borrell y R. Guerrero, «Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats,» *International Microbiology*, vol. 9, pp. 95-102, 2006.
- [28] P. Spiekermann, B. H. A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister y A. Steinbüchel, «A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds,» *Arch Microbiol*, vol. 171, pp. 73-80, 1999.
- [29] R. Zuriani, S. Vigneswari, N. M. Azizan M, I. A. Majid M y A. A. Amirul, «A high throughput Nile Red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates,» *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 18, pp. 472-478, 2013.
- [30] M. Kato, H. J. Bao, C. Kang, T. Fukui y Y. Doi, «Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, pp. 363-370, 1996.
- [31] E. Y. Lee y C. Y. Choi, «Structural identification of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) containing 4-hydroxyalkanoic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application to bacteria screening,» *Biotechnology techniques*, vol. 11, nº 3, pp. 167-171, 1997.
- [32] O. Talon y N. Berezina, «Method for rapid control of bacterial PHA production through thermogravimetric analysis,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 86, pp. 1195-1197, 2011.

- [33] M. Barbosa, A. Espinosa Hernández , D. Malagón Romero y N. Moreno Sarmiento, «Producción del Poli-B-Hidroxibutirato (PHB) por *Rastonia eutropha* ATCC 17697,» vol. 10, nº 1, pp. 45-54, 2005.
- [34] K. Hong, S. Sun, W. Tian, G. Chen y W. Huang, «A rapid method for the detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy,» vol. 51, pp. 523-526, 1999.
- [35] M. V. Arcos-Hernandez, N. Gurieff, S. Pratt, P. Magnusson, A. Werker, A. Vargas y Lant Paul, «Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures,» vol. 150, pp. 372-379, 2010.
- [36] K. Lakshman and R. Shamala, "Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cell using *Microbispora* sp. culture and its enzymes.," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, pp. 1471-175, 2006.
- [37] C. Zhu, S. Chiu, J. P. Nakas y C. T. Nomura, «Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 130, pp. 1-13, 2013.

ANEXO A. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL GLICEROL CRUDO

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo

PARÁMETRO FISICOQUÍMICO	
pH	6.135 ± 0.05
Densidad [g/cm ³]	1.275 ± 0.001
Humedad [%]	10.52 ± 0.01
Jabones [%]	13.90 ± 0.05
Metales [mg/Kg]	
Sodio (Na)	22850 ± 3860.8
Potasio (K)	46.705 ± 3.542
Calcio (Ca)	17.090 ± 1.782
Magnesio (Mg)	8.616 ± 0.684
Cenizas [%p/p]	3.489 ± 0.424
Glicerol [%p/p]	75 ± 1.414
Metanol [%p/p]	0.025 ± 0.08
Esteres metílicos de ácidos grasos [%p/p]	
Ácido palmítico	63.28
Ácido esteárico	5.58
Ácido oleico	29.58
Ácido linoleico	1.56
Otros	0

ANEXO B. TINCIÓN ROJO DE NILO

1. Realización del tinte

En un vial ámbar cubierto con papel aluminio para impedir el paso de la luz agregar 2 mg de rojo de nilo y 2ml de DMSO. Disolver y refrigerar a -20 °C.

2. Tinción en medio sólido

- I. Preparar el medio mínimo de sales
- II. Autoclavar el medio
- III. Agregar el rojo de nilo necesario para obtener una concentración final de 1 µg/ml cuando el medio se encuentre a una temperatura moderada.
- IV. Servir los platos y cubrirlos evitando la luz, ya que el rojo de nilo se oxida fácilmente.
- V. Inocular e incubar a la temperatura y tiempo necesario.

3. Tinción en medio líquido

- I. En tubos Eppendorf de 2 ml, debidamente marcados, se toma 1 ml de cada cultivo y se centrifuga a 12000 g durante 3 min.
- II. Se retira el sobrenadante de cada tubo Eppendorf.
- III. Agregar a cada tubo Eppendorf 1 ml de agua destilada (previamente autoclavada) y resuspender las células con la ayuda de la pipeta.
- IV. Agregar 3,1 µl de Rojo de Nilo en cada tubo Eppendorf, con la finalidad de mantener una concentración de 3,1 µg/ml.
- V. Mantener a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- VI. Centrifugar a 15000 g durante 3 min
- VII. Exponer las muestras a radiación UV con longitud de onda 302 nm

ANEXO C. ANÁLISIS TERMO GRAVIMÉTRICO

1. Se tomaron muestras de los cultivos especificados en el numeral 2.1. cepas y condiciones de crecimiento, los días 1, 3, 5, 7 y 9 utilizando tubo Eppendorf de 2 ml tomando muestra de tal manera que se obtuviera un pellet apreciable centrifugando a 15000g durante 3 minutos y retirando el sobrenadante.
2. La muestra puede ser conservada en el tubo Eppendorf a -20°C por varios días sin sufrir alteración alguna.
3. EL programa de temperatura usado en el TGA para la cuantificación del polímero intracelular fue [32]:
 - Equilibrar la temperatura a 30°C.
 - Rampa de calentamiento de 10°C min⁻¹ hasta 110°C.
 - Isotherma durante 15 min.
 - Rampa de calentamiento de 10°C min⁻¹ hasta 210°C.
 - Isotherma durante 30 min.
 - Rampa de calentamiento de 10°C hasta 500°C.

ANEXO D. METODOLOGÍA DE METANÓLISIS

Aproximadamente 15 mg de biomasa se agregaron a un tubo de ensayo de 12 ml, para posteriormente ser agregados 1,7 ml de metanol, 0,3 ml de ácido sulfúrico y 2 ml de cloroformo. Es necesario asegurarse que la biomasa y el tubo de ensayo se encuentren lo más secos posible debido a la violenta reacción entre en ácido sulfúrico y el agua. Mediante agitación por vortex se asegura que entren en contacto ambas fases para posteriormente proceder a realizar el montaje como se describe en la Figura 13.

Figura 13. Montaje reacción de metanolisis



La reacción debe llevarse a cabo a una temperatura de 100°C por 140 min, tiempo por el cual debe haber una supervisión periódica para mantener el nivel del agua de calentamiento mediante la adición de agua a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo de reacción se enfrían los tubos de ensayo rápidamente reemplazando el agua caliente por agua a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1ml de agua destilada autoclavada a cada tubo de ensayo y se agitó mediante vortex para favorecer la separación de las 3 fases, encontrando los

detritos en la interfase y en el fondo del tubo de ensayo como la fase más clara, el polímero diluido en cloroformo.

Figura 14. Fases



ANEXO E. MÉTODO DE ANÁLISIS GC-MS

Tabla 2. Columna y condiciones de operación para el cromatografo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas para la identificación de PHAs.

Columna	Wax-DB5MS
Altura de la columna	30 m
Diámetro de la columna	250 μ
Gas fase móvil	Helio
Temperatura del inyector	250 °C
Volumen de la muestra	1 μ l
	80 °C
Programa de temperatura del horno	rampa de 5°C por min a 300 °C mantener a 300°C por 30 min
Detector	espectrofotómetro de masas
Rango escáner	42-300 EI+

Fuente: [31]

ANEXO F. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA EN EL DSC

1. Preparación de la muestra.
 - i. Se tomó una muestra de cultivo en su día máximo de producción de polímero en un tubo Eppendorf, se centrifugo a 15000 g durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante.
 - ii. La muestra debía se secó durante una noche en la incubadora de 37°C.

2. Montaje de la muestra en el equipo DSC.
 - i. La preparación de la muestra en el DSC requiere la utilización de un pan hermético, el cual debe ser pesado antes de introducir la muestra y con la muestra, teniendo especial cuidado en el peso máximo de la muestra, el cual no puede superar los 20 mg. El equipo utiliza una referencia de pan hermético la cual debe ser pesada.
 - ii. Los pesos del pan hermético vacío, la muestra y el pan hermético de referencia deben ser introducidos al software.
 - iii. El programa de temperatura utilizado en el equipo fue:
 - Equilibrar la temperatura a 30°C
 - Rampa de calentamiento de 20°C min⁻¹ hasta 115°C para eliminar el agua remanente.
 - Equilibrar la temperatura a -20°C.
 - Rampa de calentamiento de 3°C min⁻¹ hasta 225°C.

ANEXO G. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Figura 15. Curva de calibración HPLC medio mínimo con glicerol crudo

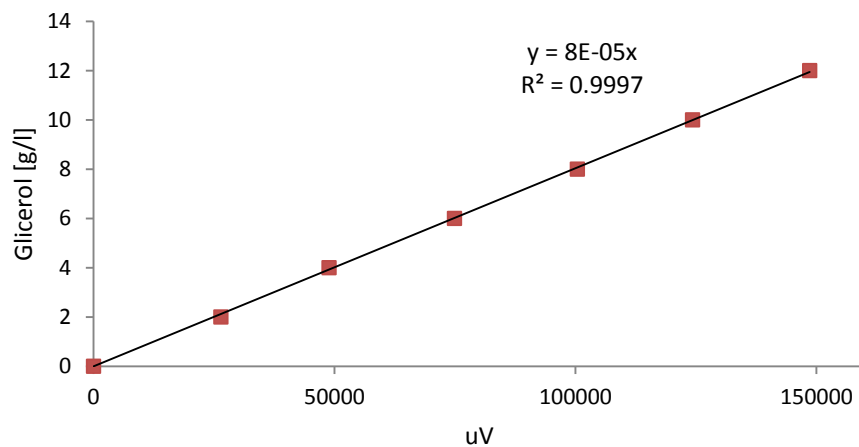


Figura 16. Curva de calibración HPLC medio mínimo con glicerol puro

