

**EVALUACION PRELIMINAR DE LA PRODUCCION DE
POLIHIROXIALCANOATOS (PHAs), A PARTIR DE SUBPRODUCTOS
GENERADOS EN LA REFINACION DEL ACEITE DE PALMA POR
Wautersia eutropha.**

LAURA SERRANO GALVIS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRIA EN QUIMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

**EVALUACION PRELIMINAR DE LA PRODUCCION DE
POLIHIROXIALCANOATOS (PHAs), A PARTIR DE SUBPRODUCTOS
GENERADOS EN LA REFINACION DEL ACEITE DE PALMA POR
Wautersia eutropha.**

LAURA SERRANO GALVIS

**Trabajo de aplicación presentado como requisito para optar
el título de Magister en química ambiental**

**Director: Prof. JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL
Química, M. Sc. Doctora en Química**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS
CICTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRIA EN QUIMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIA

A mi familia... motivo y motor para cumplir esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A Dra. Aide Perea, por su apoyo y su guía permanente para finalizar con éxito este trabajo de aplicación.

Al personal del laboratorio del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los alimentos, CICTA, por todo el soporte técnico y la paciencia en la realización en cada uno de los ensayos.

A mi familia por la paciencia y el apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	15
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	17
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	24
3.2 EQUIPOS	25
3.3 PROCEDIMIENTOS	25
3.3.1 Análisis preliminares	25
3.3.1.1 Caracterización de la materia prima	25
3.3.1.2 Reactivación, crecimiento y mantenimiento de la bacteria	27
3.3.1.3 Cinética de crecimiento bacteriano	28
3.3.2 Proceso de biotransformación	29
3.3.2.1 Preparación del inóculo	29
3.3.2.2 Preparación de la materia prima	29
3.3.2.3 Fermentación	30
3.3.2.4 Extracción y cuantificación de los PHAs	30
3.3.3 Evaluación de las condiciones de producción de PHAs	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 ANÁLISIS PRELIMINARES	33
4.1.1 Caracterización de la materia prima	33
4.1.2 Reactivación y crecimiento de la bacteria	34
4.2 PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN	36
4.2.1 Evaluación de la capacidad de formación de PHAs (Etapa 1)	36

4.2.2 Evaluación de las condiciones de biotransformación para obtener altas productividades de PHAs a escala de laboratorio (Etapa 2)	41
5. CONCLUSIONES	56
6. RECOMENDACIONES	57
7. BIBLIOGRAFIA	58
8. ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Factores y niveles de diseño	32
Tabla 2.	Caracterización del residuo graso obtenido de la trampa de grasa de una empresa refinadora de aceite de palma.	33
Tabla 3.	Contenido de ácidos grasos en el residuo graso.	34
Tabla 4.	Relación C/N en las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas.	42
Tabla 5.	Variables independientes y respuesta para el diseño factorial “3 ² ” con un punto central de cada factor, una réplica de cada ensayo, 20 experimentos y un error de 13 grados de libertad aplicado a la producción de PHAs por la ATCC 17699 <i>Wautersia eutropha</i> .	42
Tabla 6.	Análisis de varianza ANOVA para el contenido de PHA.	47
Tabla 7.	Efectos estimados de cada variable y sus interacciones sobre el contenido de PHA	47
Tabla 8.	Estimación de resultados para “Contenido de PHA” según el modelo ajustado.	51
Tabla 9.	Optimización de la variable respuesta.	52

Pág.

Tabla 10.	Algunos Trabajos reportados en los últimos 10 años en la producción de PHAs a partir de diferentes sustratos	53
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	ATCC 17699 <i>Wautersia eutropha</i> en agar nutritivo	34
Figura 2.	Crecimiento de la ATCC17699 <i>Wautersia eutropha</i> a diferentes temperaturas.	35
Figura 3.	Curva de crecimiento Atcc17669 <i>Wautersia eutropha</i> en caldo nutritivo, 30°C, 200rpm	36
Figura 4.	Evolución del contenido de gránulos de PHAs con el tiempo de fermentación vistos al microscopio con coloración de Negro Sudán.	38
Figura 5.	Variables evaluadas en la Etapa 1: 10% de residuo. Contenido de PHA: mg de polímero/ mg de biomasa.	39
Figura 6.	Polímero PHAs obtenido en diferentes etapas del proceso de extracción y cuantificación.	40
Figura 7.	Análisis de los factores individualmente.	44
Figura 8.	Diagrama de efectos principales para el contenido de PHA (mg/mg).	45
Figura 9.	Gráfico de Pareto para contenido de PHA.	48

		Pág.
Figura 10.	Grafico de superficie de respuesta para Contenido de PHA (mg/mg).	49
Figura 11.	Cromatograma del polímero obtenido con la ATCC 17699 utilizando el residuo sólido de la trampa de grasa.	55

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A.	Condiciones de operación del equipo GC-FID para la determinación de ácido 3 hidroxibutírico.	64
Anexo B.	Cromatograma del residuo graso.	65
Anexo C.	Curva de calibración para la ATCCC 17699 <i>Wautersia eutropha</i> . Absorbancia vs. Peso seco	66
Anexo D.	Registro fotográfico	67

RESUMEN

TITULO

EVALUACION PRELIMINAR DE LA PRODUCCION DE POLIHIROXIALCANOATOS (PHAs), A PARTIR DE SUBPRODUCTOS GENERADOS EN LA REFINACION DEL ACEITE DE PALMA POR *Wautersia eutropha*.

AUTORES

Serrano Galvis, Laura; Perea Villamil, J.Aide.

PALABRAS CLAVE

Polihidroxicanoatos, *Wautersia eutropha*, bioplásticos, residuo graso.

DESCRIPCIÓN

Es conocido el impacto ambiental generado por los plásticos provenientes del petróleo, razón por la cual se están buscando alternativas más amigables con el medio ambiente, mediante la obtención de plásticos de origen biológico, conocidos como “bioplásticos” cuya principal característica es su biodegradabilidad hasta CO₂ y agua bajo condiciones aerobias y anaerobias. Dentro de los bioplásticos se encuentran los polihidroxicanoatos (PHAs) que despiertan un gran interés por su similitud con plásticos obtenidos del petróleo (polipropileno, polietileno) y por la utilización de subproductos de procesos agroindustriales, que ocasionan también contaminación del ambiente, como materias primas para su producción,.

En este contexto, el presente trabajo de aplicación propuso evaluar la producción de PHAs mediante un bioproceso que utiliza como sustrato el residuo sólido proveniente de una trampa de grasa de una empresa refinadora de aceites de origen vegetal y la cepa ATCC 17699 de *Wautersia eutropha* como biocatalizador. Este microorganismo es reconocido en numerosos artículos científicos como una de las especies más eficientes para la producción de los polihidroxicanoatos por su versatilidad en el uso diversos de materiales orgánicos como fuente de carbono. Los resultados obtenidos permitieron establecer que la materia prima usada tiene un alto contenido de ácidos grasos libres (86%) que, a escala de laboratorio es posible transformar en PHAs de alta pureza por acción de la cepa *Wautersia eutropha* (Temperatura de incubación 30 °C, agitación 200rpm y 144 horas), alcanzando concentraciones hasta de 74% respecto a la biomasa producida.

SUMMARY

TITLE

PRELIMINARY EVALUATION OF POLYHYDROXYALKANOATE (PHAs) PRODUCTION USING BYPRODUCTS FROM PALM OIL REFINING PROCESS BY *Wautersia eutropha*.

AUTHORS

Serrano Galvis, Laura; Perea Villamil, J.Aide.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, *Wautersia eutropha*, bioplastics, fatty residue.

DESCRIPTION

is known de environmental impact caused by plastics from oil, therefore scientific are looking for new green alternatives like de production of bioplastics, that have many advantages like be biodegradables unto CO₂ and water, by aerobic and anaerobic conditions.

One of this bioplastics are called Polyhydroxyalkanoates (PHAs) that are a very interesting alternative because they are similar to plastics from oil and could be produced from byproducts of agro industrial process that are contaminants in the environment.

This application work proposed the evaluation of PHAs production using a solid residue from fatty tramp of refining palm oil plant and the ATCC 17699 *Wautersia eutropha*, like biocatalyst.

This bacterium is avowed by many scientific works like one of the most efficient species to produce PHAs from different carbonate raw materials.

The results showed that the solid fatty raw material has large amount of free fatty acids (85%) that can be transformed into high quality PHAs, using ATCC 17699 (incubation temperature 30°C, shake 200rbm and 144hours), reaching almost 74% of PHAs about biomass produced.

1. INTRODUCCION

La refinación de aceites genera diversos residuos líquidos y sólidos que exigen tratamientos físico, químicos y/o biológicos para ser dispuestos al medio ambiente con un mínimo impacto y de acuerdo con una normatividad ambiental cada vez más exigente a nivel Nacional e Internacional. (*Protocolo de Kioto, 1997*).

La presión legal ejercida a las empresas generadoras de estos residuos, en este caso a la industria dedicada a la refinación de aceites vegetales, ha hecho que los mayores esfuerzos se centralicen en el tratamiento de los residuos líquidos para su posterior vertimiento cumpliendo con el decreto 1594 de 1984; mientras tanto, la legislación respecto a residuos sólidos se enmarca básicamente en la Ley 9 de 1979 de la legislación Colombiana, que declara de manera general y sin especificaciones técnicas en su artículo 24: *“Ningún establecimiento podrá almacenar a campo abierto o sin Protección las basuras provenientes de sus instalaciones, sin previa autorización del Ministerio de Salud o la entidad delegada”* Y en su artículo 31: *“Quienes produzcan basuras con características especiales, en los términos que señale el Ministerio de Salud, serán responsables de su recolección, transporte y disposición final”*. Esta situación y la preocupación constante de la industria por hacerse más competitiva y sostenible han volcado los esfuerzos en convertir estos “desechos” industriales en subproductos aprovechables en actividades industriales paralelas como la producción de alimentos animales, jabones, reactivos industriales, fertilizantes o como material crudo alternativo para la producción de biodiesel (Haslenda *et al*, 2011).

Una de las alternativas que ha generado mayor interés es la posibilidad de producción de bioplásticos a partir de desechos industriales de aceites y grasas. Estos bioplásticos conocidos como Polihidroxicanoatos (PHAs), son producidos de manera natural por algunas plantas y bacterias, y su principal atractivo radica en que poseen propiedades químicas similares a las del polipropileno con la

ventaja de ser completamente biodegradables, biocompatibles y producidos a partir de recursos renovables como azúcares y ácidos grasos (Mumtaz *et al*, 2010).

Actualmente, el alto consumo de plástico proveniente del petróleo por su aplicación en diversas industrias y los problemas causados por su lenta degradación, ha impulsado la investigación y el desarrollo de otros materiales con características físico-químicas similares pero que poseen una degradación más rápida en el medio natural y minimizan los efectos negativos (Oliveria *et al*, 2004).

Con base en lo anterior, en este trabajo se planteó la siguiente hipótesis: “El residuo sólido generado en el proceso de refinación de aceites constituye un posible sustrato de bajo costo para la producción microbiológica de bioplásticos, dándole un valor agregado a este subproducto”. Y como objetivo general: “Determinar la viabilidad de la producción de Polihidroxicanoatos – PHAs – por *Wautersia eutropha* a partir del residuo sólido generado en la trampa de grasas principal en la planta de refinación de aceites de Saceites S.A.

2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

Los triglicéridos vegetales son materias primas renovables cuyo uso para el 2004 se dividía en un 80% para alimentación humana, 6% para alimentación animal y 14% para la industria oleoquímica; actualmente es posible que éste último porcentaje sea aún mayor por el interés creciente de diversificar los usos de los aceites y grasas animales dadas las circunstancias socio ambientales a las que se enfrenta el mundo industrial.

Colombia, con un 37.7% de la producción total de aceites vegetales en América Latina, es el mayor productor de la región seguido de lejos por Ecuador (15.5%), Costa Rica (10.0%), Brasil (8.4%) y Honduras (7.9%). Estos cinco países participaron con cerca del 80% de las 1.4 millones de toneladas de aceite que produjo la región. El consumo mundial de aceites y grasas en 2002, fue de 121 millones de toneladas, lo que significó un crecimiento anual promedio de 3.8% en esos últimos cinco años. En América Latina específicamente, el crecimiento fue de 4%. Colombia es el cuarto país con mayor rendimiento de aceite de palma crudo a nivel mundial (Tns./Ht) después de Costa Rica, Papua, Nueva Guinea y Malasia y se destacó también su aumento de productividad en el 2002 al aumentar en un 35.8% mientras que Malasia tuvo un incremento de 13.6% e Indonesia sufrió un descenso de 7.5%. (Gunstone *et al*, 2005; Vasco, 2010)

En Estados Unidos, Europa Occidental y especialmente Asia tienen amplios desarrollos en la industria oleoquímica y producen ácidos grasos, metil esteroides, alcoholes, aminas y glicerol a partir de aceites vegetales y grasas animales, los cuales se convierten en materias primas de actividades industriales tan diversas como la industria de la construcción, velas, agentes limpiadores, cosméticos, detergentes, agentes de flotación, tintas, insecticidas, tratamientos del cuero, lubricantes, pinturas, pesticidas, productos farmacéuticos, plásticos, jabones,

textiles y neumáticos. Adicionalmente, se han desarrollado otros usos, económica y ambientalmente más atractivos, como la producción de surfactantes, bases lubricantes y biodiesel. (Acuerdo regional de competitividad de la cadena productiva de aceite de palma regional, zona central. Bucaramanga, 2001; Gunstone *et al*, 2005). En Colombia por ejemplo, existen actualmente 6 compañías dedicadas a la producción de biodiesel a partir del aceite de palma, logrando ingresar al mercado nacional de biocombustibles en mezclas del 5% y 10% con combustible fósil y con miras a llegar a una mezcla del 20% (Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia, 2011) .

Dentro de los residuos generados en la transformación de los aceites vegetales se encuentran los ácidos grasos provenientes de procesos de degradación de los aceites. Estos ácidos grasos son sustratos potencialmente útiles en la producción de Polihidroxicanoatos (PHAs) mediante su tratamiento con microorganismos, en fermentación en fase sólida y en fermentación en fase líquida.

Los PHAs son compuestos generados naturalmente al interior de las células como material de reserva cuando la disponibilidad de otros micronutrientes como el nitrógeno y el fósforo son limitados en el medio en que se desarrollan. La importancia de estos polihidroxicanoatos radica en su potencialidad de reemplazar los plásticos provenientes del petróleo con la gran ventaja de ser completamente biodegradables hasta CO₂ y agua a través de mineralización biológica natural; son obtenidos de recursos naturales renovables, son menos sensibles a la luz UV que el polipropileno y, entre muchas otras ventajas, son menos permeables al oxígeno. Esta última característica los convierte en materiales deseables para el almacenamiento de alimentos sensibles al oxígeno que requerirían menor cantidad de antioxidantes dada la mayor protección que ofrecerían los empaques producidos a partir de PHAs (Salehizadeh *et al*, 2004; Laycock *et al* 2012).

En general, los PHAs están conformados por varias repeticiones de un mismo monómero; se han encontrado cerca de 100 tipos diferentes de monómeros incorporados a los PHAs, los cuales incluyen unidades de hidroxialcanoatos que van de 2-6 hidroxiaácidos sustituidos con un amplio rango de grupos entre los cuales se encuentran: Alquil, aril, alquenil, alojen, ciano, epoxi, eter, y grupos ácidos. Los gránulos de PHAs en las bacterias fueron visualizados por primera vez por el microbiólogo Francés Maurice Lemoigne en un cultivo de *Bacillus megaterium* en 1926; desde entonces se ha encontrado una amplia variedad de PHAs con diferentes propiedades en más de 90 géneros de bacterias (Lemos *et al*, 1998; Tecnoparque Colombia, 2010).

El PHA mejor caracterizado es el poly 3-hidroxibutirato (PHB) y sus copolímeros pueden formarse a partir de la combinación de diferentes materias primas, formando polímeros que contienen monómeros de 3-hidroxicaproato (3HV) o 4-hidroxibutirato (4HB). Los PHAs pueden ser de varios tipos: los de cadena corta, cuyos monómeros están compuestos de 3-5 carbonos y son termoplásticos con un alto grado de cristalización; los PHAs de cadena media están constituidos por monómeros cuya longitud de cadena de entre 6-14 carbonos , pueden ser alifáticos ó aromáticos , poseen valiosas propiedades mecánicas, son hidrofóbicos, elásticos, poseen un bajo grado de cristalización (elastómeros semicristalinos termoplásticos) y una baja temperatura de fusión; y una combinación de ambos tipos bajo condiciones controladas de laboratorio. La producción de estos diferentes tipos de PHAs está determinada, tanto por la fuente de carbono utilizada, como por algunas variables de procesamiento como el pH y el tipo de microorganismo utilizado (Reddy *et al*, 2003; Villano *et al*, 2010; Sudesh *et al*, 2011).

Se han estudiado una gran variedad de sustratos para la producción de PHAs pues, actualmente, cerca del 80% del costo de producción corresponde a la fuente

de carbono utilizada, razón por la cual la búsqueda de materiales económicos para su producción es necesaria para permitir su producción industrial.

En los años 80, la compañía británica “Imperial Chemical industries (ICI)”, desarrolló un proceso comercial no sólo para producir los poli (3HB), también para producir un copolímero llamado poli-R-3-hidroxitirato-co-R-3-hidroxivalerato, ó poli (3HB-co-3HV); ambos fueron producidos bajo el nombre de Biopol e inicialmente su función era reemplazar los plásticos derivados del petróleo; posteriormente, fueron ampliándose las perspectivas de uso, siendo una de las principales el empleo de estos como materiales biomédicos (Williams *et al*,1996 en Tecnoparque Colombia, 2010).

Actualmente hay varias empresas a nivel mundial dedicadas a la producción de PHAs como Kaneka en Japón, P&G Chemical, BP y Metabolix en Estados Unidos. Kaneka y P&G Chemical se han unido para producir un producto llamado Nodax (o también conocido como Nodak™) el cual es un PHA especializado, que hasta el momento ha sido usado para producir fibras de plástico, y recipientes moldeados como platos y vasos. Adicionalmente diversos investigadores pertenecientes a la multinacional Monsanto desarrollaron plantas transgénicas que produjeron satisfactoriamente copolímeros de PHBsV en plastidios de *A. thaliana* y *B. napus*. Los copolímeros de 3-hidroxitirato-co-hidroxivalerato (PHAS/V) y el homopolímero-3-hidroxitirato (PHAS), son por el momento los únicos hidroxialcanoatos de origen bacteriano comercialmente viables y conocidos bajo la marca “Biopol”. Estos polímeros además de su biodegradabilidad poseen propiedades físicas y químicas similares a los termoplásticos convencionales y se pueden procesar usando las técnicas convencionales como extrusión, inyección por moldeo y soplado; originalmente obtenido por ICI/Zeneca ahora hacen parte del portafolio de productos de Monsanto (Tecnoparque Colombia 2010).

Sin embargo, la producción y comercialización de los PHAs se ha visto limitada en dos sentidos: en primer lugar, la habilidad de las bacterias para acumular el polímero pues, a pesar de haberse identificado muchos géneros bacterianos con la capacidad de producción, los niveles de acumulación en la mayoría de ellos es muy baja; sin embargo, especies como *Ralstonia eutropha* (antes *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* recombinante y *Azotobacter vinelandii* han sido ampliamente investigados. Por otro lado, los altos costos de las materias primas usadas para la producción de polihidroxicanoatos (PHAs), en especial la fuente de carbono, son la principal limitante en su aprovechamiento industrial (Vasco, 2012; Moreno *et al*, 2005). Actualmente la materia prima más económica empleada en la producción de PHAs tiene un costo de u\$ 0,22/kg, en comparación con el polipropileno que tiene un costo de u\$ 0,18 /kg; esta situación, sumada a la productividad, hacen que el valor comercial de los bioplásticos esté alrededor de U\$16/kg, mientras los plásticos derivados del petróleo tiene un costo de U\$1/ kg (Salehizadeh *et al*, 2004).

El aceite de palma es una fuente económica y viable para la producción de PHAs por su bajo costo y por la mezcla de ácidos grasos que presenta, más que los ácidos grasos purificados; aunque el uso de biología molecular y de técnicas de DNA recombinante son herramientas útiles para la producción de PHAs específicos, este tipo de metodologías incrementan el costo razón por la cual es interesante manipular los métodos de fermentación como el cultivo fed-batch.

El proceso ideal para la producción de PHAs mejorando su calidad térmica y sus propiedades mecánicas se ha obtenido a través de fermentaciones en 3 etapas: la primera permite el crecimiento celular y la adaptación al medio de cultivo; en la segunda etapa, un gran densidad celular se alcanza controlando los sustratos de alimentación y en una etapa final se agrega la fuente de carbono que ayudará a la producción de PHAs de cadena media (López-Cuellar *et al*, 2011). Un ejemplo de

esta estrategia fue empleada por Pradella *et al* quien describe el proceso de producción de PHAs de cadena corta a partir de aceites de soya o de ácidos grasos provenientes de aceites de palma, algodón, maíz, girasol o castor como fuente de carbono. El proceso consiste en 4 etapas utilizando cepas de *Wautersia eutropha* IPT026 o IPT027 y *Burkholderia cepacia* IPT048, 064, 066, 074, 110 o 189; obtuvo una conversión de masa de carbono a PHA de 0.6 Kg/Kg (López-Cuellar *et al*, 2011)

Wautersia eutropha (antes *Ralstonia eutropha*) es una bacteria gram negativa, aerobica, quimioorganotrofa, capaz de acumular de 8 a 13 gránulos con PHA en la célula con un diámetro que oscila entre 0,2 y 0,5 μm a partir de gran variedad de fuentes de carbono. Estas inclusiones hidrofóbicas, suspendidas en el citoplasma celular, contienen de 5% a 10% de agua y se encuentran en estado amorfo; entre los PHAs sintetizados por *Wautersia eutropha*, el Polyhidroxibutirato (PHBs) es el más estudiado por sus características similares al polipropileno.

Usando sustratos económicos como residuos agroindustriales (como sueros, melazas, efluentes de molienda de palma de aceite) y aislando cepas con altos porcentajes de acumulación, la producción de PHAs puede hacerse más económica. Por esta razón, las investigaciones encaminadas a la generación de estos biopolímeros utilizando algunos residuos industriales como materias primas son el gran reto. Aunque se han hecho varios ensayos utilizando residuos líquidos, en algunos estudios se han aprovechado los residuos y subproductos agroindustriales para realizar fermentaciones sobre sustrato sólido para la producción de PHAs (Castilho *et al*, 2009).

El residuo sólido generado en Saceites, que será objeto del presente estudio, proviene de la trampa de grasas principal y la trampa de grasas del efluente de la producción de margarina; este residuo se genera al retirar el material retenido por las trampas y almacenarlo en su sitio de disposición actual. Su composición

química muestra un contenido de grasa del 61% de los cuales un 76% corresponde a ácidos grasos libres, un contenido de carbono orgánico total del 24%, de nitrógeno del 0,91% y una concentración de fósforo de 57ppm (*Laboratorio de gestión Ambiental Saceites S.A.*) lo cual puede implicar una alta concentración de ácidos grasos libres, con bajas concentraciones de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo y fuente de carbono en exceso, condiciones compatibles con las necesidades reportadas en la bibliografía para la producción de PHAs por parte de los microorganismos (Sudech *et al*, 2000; Reddy *et al*, 2003; Mumtaz *et al*, 2010).

La determinación de la viabilidad de producir PHAs a partir del residuo sólido de la trampa de grasa sería un aporte significativo a la producción a gran escala de dichos bioplásticos, pues como ya se mencionó, los altos costos de producción son una de las limitantes para su aprovechamiento.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- **Microorganismo**

Se empleó una cepa certificada de *Wautersia eutropha* ATCC 17699 obtenida de la Colección Americana de Cultivos ATCC. La cepa en forma liofilizada se reactivó de acuerdo con el protocolo recomendado por la ATCC y su conservación se realizó siguiendo la guía de criopreservación de Frank P. Simione de la ATCC.

- **Materia prima y reactivos**

Como sustrato para el proceso se empleó el residuo graso obtenido de la trampa de grasa de la planta de producción de C.I. Saceites S.A. Los demás reactivos y solventes requeridos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) y de Merck (Darmstadt, Alemania).

- **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados para reactivar y reproducir la ATCC 17699 fueron:

- Caldo nutritivo de la casa comercial OXOID y sus componentes son:
Lab-Lemco Powder 1,0 g/L, extracto de levadura 2,0 g/L, peptona 5,0 g/L, cloruro de Sodio 5,0 g/L
- Agar nutritivo de la casa comercial OXOID y sus componentes son:
Lab-Lemco Powder 1,0 g/L, extracto de levadura 2,0 g/L, peptona 5,0 g/L, cloruro de Sodio 5,0 g/L, Agar-Agar 15g/L

3.2 EQUIPOS

Para la ejecución de procedimientos se emplearon los siguientes equipos: incubadora ultravioleta SI-950 marca UVP (*Upland*, USA), autoclave de vapor No. 25X marca *All American* (*Hempstead*, USA), espectrofotómetro VIS *Genesys 20* marca *Thermo Spectronic* (Rochester, USA), centrífuga Rotofix 32 marca *Hettich* (Alemania), baño termostático, balanza analítica AB204-S *Mettler-Toledo* (*Schwerzenbach*, Suiza), microscopio, espectrómetro de gases con detector FID, sonicador Ultrasonic LC 30H marca Elma.

3.3 PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Análisis preliminares

3.3.1.1 Caracterización de la materia prima

Para la caracterización de la materia prima se emplearon los siguientes métodos de análisis:

- **Determinación de Humedad:** La determinación de humedad se efectuó siguiendo el procedimiento de la NTC 287: 2002, para lo cual se pesaron 3 g de muestra que se llevaron a una estufa a 105°C durante 4 horas, hasta peso constante. Se dejó enfriar en un desecador y se calculó el porcentaje de humedad por pérdida de peso. La muestra obtenida se utilizó para la determinación de grasa.

- **Determinación de Grasa:** Se siguió el procedimiento de la A.O.A.C. 7.060/84 y 920.39/90 adaptados. Se tomaron 2 g de muestra seca y se extrajeron con hexano en un extractor Soxhlet durante 2 horas, al cabo de las cuales se removió el solvente para calcular el contenido de grasa.

- **Determinación de nitrógeno:** La determinación de nitrógeno se efectuó siguiendo el método de Kjeldahl-Gunning-Arnold adaptado Griffin 1995: se pesaron 0.5 g de muestra, se colocaron en un tubo Kjeldahl, se añadió una tableta de catalizador y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, se llevó al digestor y se calentó durante 3 horas, luego se dejó enfriar. A la solución obtenida se adicionaron 50 mL de agua destilada y 150 mL de NaOH 32% y se llevó al destilador, haciéndose una destilación por arrastre con vapor. El hidróxido de amonio generado se recibió en 50 mL de ácido bórico que contenían 3 gotas de indicador mixto, hasta tener un volumen de destilado de 200 mL. El destilado se tituló con HCl 0.1N. Se calculó el porcentaje de nitrógeno.
- **Índice de acidez:** El índice de acidez se determinó siguiendo la AOAC 940.28, la NTC 218:199 y el método con etanol caliente usando indicador, sin hidrólisis. Se pesó la muestra de acuerdo a la acidez esperada, se adicionaron 50ml de etanol del 95% (v/v) con 0,5ml de fenolftaleína al 1%. Se llevó a ebullición y se neutralizó con KOH 0,05N. Se tituló con el KOH en plancha de agitación con agitador magnético. Se calculó el índice de acidez de acuerdo al volumen de solución gastado en la titulación.
- **Perfil de ácidos grasos:** El análisis de ácidos grasos de la materia prima se llevó a cabo mediante la obtención de sus metilésteres y cuantificación por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), según las normas NTC 4967 (Grasas y aceites animales y vegetales. Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos) y NTC 5013 (Grasas y aceites vegetales y animales. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía de gases). Como material de referencia certificado se empleó la mezcla SupelcoTM 37 Component FAME Mix, Supelco, Befonte, PA, Cat. N° 47885-U. El análisis cromatográfico de la muestra se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) 7890^a (Agilent Technologies, Palo Alto,

California, EE.UU.), con detector de ionización de llama (FID). La columna empleada en el análisis fue HP-88 [(88%-cianopropil)-aril-polisiloxano] (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 60m x 0.25m x 0.20µm. La inyección se realizó en modo Split (10:1, V_{iny} : 2µL).

- **PHAs por GC-FID:** El análisis de PHAs por cromatografía de gases con detector FID se llevó a cabo mediante la obtención de su metilésteres usando el método descrito por Braunegg (1987) y que se basa en una metilación con alcohol acidificado al 3% con ácido sulfúrico durante 4 horas a 100°C. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 2mL de agua destilada y se separaron las fases. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró hasta 1ml y se inyectó al cromatógrafo. Las condiciones de trabajo del equipo se encuentran en el Anexo A. Para la identificación se empleó un patrón de ácido 3 hidroxibutírico como referencia.

3.3.1.2 Reactivación, crecimiento y mantenimiento de la bacteria

Para la reactivación de la cepa ATCC 17699, que se adquirió en forma liofilizada, se siguió el protocolo entregado por la ATCC: se separó la punta de vidrio del frasco, se removió el material aislante y se retiró el vial interior. Se rehidrató el pellet con 1mL de caldo nutritivo marca Oxoid, se transfirió asépticamente este contenido a un tubo de vidrio que contenía 5 mL de caldo nutritivo previamente esterilizado y se mezcló bien. Se dejaron caer algunas gotas sobre una placa de agar nutritivo marca Oxoid. Los dos medios de cultivo se llevaron a incubación a 26°C, durante 48 horas.

Una vez crecida la cepa, se realizó un banco de cepas conservándola en Caldo nutritivo y glicerol al 90% en proporción 50:50. El banco se almacenó a -15°C. Adicionalmente, se realizaron repiques cada 15 días en placas de agar nutritivo.

Adicionalmente se realizó una prueba sencilla para determinar la mejor temperatura de crecimiento del microorganismo, llevándolo a incubación en cajas de petri con agar nutritivo marca OXOID y tubos de ensayo con caldo nutritivo marca Oxoid a 26°C, 30°C y 37°C durante 24 horas.

3.3.1.3 Cinéticas de crecimiento bacteriano

La cinética de crecimiento bacteriano se estableció mediante mediciones turbidimétricas y de peso seco.

Para ello se hicieron curvas de calibración tomando tres colonias formadas en el agar nutritivo, estas colonias se suspendieron en 50 mL de caldo nutritivo y se dejaron a 30 °C durante toda la noche (*overnight*). Al día siguiente se prepararon 250 mL de medio de cultivo nutritivo, se inocularon con 5 mL de preinóculo y se agitaron a 80 rpm durante 6 h, con temperatura controlada a 30 °C. Posteriormente se tomaron 10 mL de esta suspensión en 6 tubos y se centrifugaron a 5.500rpm durante 30 min, los sobrenadantes se descartaron y los pellets se re suspendieron en 10 mL de agua destilada, agitando en vórtex para re suspensión completa y repitiendo el centrifugado y el lavado dos veces más. Los pellets resultantes del último lavado se re suspendieron en 10 mL de agua destilada y de cada tubo respectivamente se tomaron 2, 4, 5, 6, 8 y 10 mL de suspensión, aforando a 10 mL con agua destilada, de cada tubo se tomaron 5 mL para hacer las mediciones por turbidimetría a 600 nm y los otros 5 mL se centrifugaron, descartando los sobrenadantes y re suspendiendo los pellets en 1 mL de agua destilada que se transfirieron a una caja de vidrio previamente tarada y se llevó a sequedad a 60 °C durante 12 h. Se hizo una curva relacionando el peso seco de la bacteria en cada dilución con su absorbancia.

Para establecer la cinética de crecimiento sin sustrato (residuo graso obtenido de

la trampa de grasas) se agregaron 3 colonias en 50 mL de caldo nutritivo, se dejaron a 30 °C durante toda la noche (*overnight*), al día siguiente se tomaron 5 mL de esta suspensión y se diluyeron en 250 mL de caldo nutritivo, se agitaron y se tomaron 5 mL para medir su absorbancia; éste fue el tiempo de inicio de la cinética ($t = 0$). La suspensión se agitó a 80 rpm en agitador orbital y se mantuvo a 30 °C. Cada dos horas se tomaron 5 mL de suspensión, se centrifugaron, se lavaron tres veces con 5 mL de agua destilada, y se le midió la absorbancia al sobrenadante del último lavado, correlacionándola con el peso seco mediante la curva de calibración. Se hizo un gráfico de peso seco vs. tiempo para obtener la curva de crecimiento de la bacteria y establecer el tiempo en el que se encuentra en el punto medio de su fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad metabólica bacteriana es mayor.

3.3.2 Proceso de Bio - transformación

3.3.2.1 Preparación del inóculo

Los inóculos de todos los ensayos se prepararon en erlenmeyer con capacidad de 1000mL. Se preparó previamente el pre-inoculo tomando 50mL de medio nutritivo estéril inoculado con el microorganismo e incubado a 30°C. Una vez la cepa se activó en el preinoculo, se prepararon los inóculos y se llevaron a incubación a 30°C con 200rpm de agitación durante 26 a 28 horas, tiempo en el cual se estableció mediante la curva de crecimiento que la cepa se encontraba en fase exponencial.

3.3.2.2 Preparación de la materia prima

Se tomó el residuo sólido previamente caracterizado y se llevo a autoclave en erlenmeyer plástico con tapa rosca a 121°C, 15 psi por 20 minutos.

3.3.2.3 Fermentación

Una vez se obtuvieron los inóculos, se pusieron en contacto con el residuo sólido previamente esterilizado. En la primera etapa, en la cual se buscaba determinar si el microorganismo usaba el residuo como sustrato, se tomaron 10g de residuo y se inocularon con 90mL de inóculo, en un erlenmeyer de 250mL; se llevaron a incubación a 30°C con agitación de 200rpm durante 72 y 168 horas. En este caso todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

En esta etapa se verificó cada 24 horas la presencia de los Polihidroxicanoatos al interior de las células mediante microscopia y tinción con Negro Sudán. Para esta coloración se siguió la metodología reportada por Burdon (1946) con variación en el enjuague del colorante sobre las láminas; para ello se fijan las láminas con calor y se cubren completamente con colorante negro sudán, se dejan en reposo durante 15 minutos y se enjuagan con metanol. Posteriormente se tiñen con un colorante de contraste, en este caso safranina, se deja por un minuto y se enjuaga con agua. La variación en el enjuague de las láminas se realizó buscando una menor toxicidad en los reactivos utilizados.

En la segunda etapa se realizaron los ensayos establecidos en el diseño experimental que contemplaron mezclas de 25%, 50% y 75% de residuo con volumen constante de 100 mL. Los diferentes ensayos se mantuvieron a las mismas condiciones de agitación e incubación mencionadas en la primera etapa, durante 48, 96 y 144 horas.

3.3.2.4 Extracción y cuantificación de PHAs

Una vez finalizada cada fermentación, se recuperó el medio de cultivo en tubos para centrifuga de 50mL y se tomó una muestra para determinación de la biomasa usando la curva de calibración de biomasa vs. peso seco; de esta

manera se obtuvo el dato de mg de células por mL.

Para la extracción y cuantificación de PHAs se empleó la metodología la metodología propuesta por Oliveira *et al* (2001), Cortazar y Malagón(2001), Kosing (2011) y Riedel *et al* (2011), que consistió en: la biomasa producida en los ensayos se concentró mediante centrifugación a 5.500rpm durante 45 minutos, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en hexano, se centrifugó a 5500rpm por 20 minutos y el pellet se lavó nuevamente con agua destilada por 20 minutos más. Posteriormente se realizó una lisis celular con lisozima a una concentración de 10mg/mL, se llevaron las muestras a sonicador por 10 minutos, se inactivó la enzima a 100°C por un minuto y se centrifugó nuevamente a 5.500rpm por 20 minutos con el fin de retirar los restos celulares; finalmente se llevó a sequedad a 50°C por 12 horas.

Sobre el pellet seco se realizó la extracción del PHAs usando como solvente Cloroformo al 10% (peso/volumen); se dejó durante 4 horas a 50°C en baño termostático agitando en vortex cada 30 minutos. El extracto así obtenido se centrifugó durante 30 minutos y se dejó en congelador de un día para otro para permitir que la capa superior se compactara y permitiera retirar más fácilmente el polímero disuelto en el solvente. Las muestras se concentraron en tubos tapa rosca de vidrio hasta alcanzar 2mL y se precipitaron con metanol frío en una relación 6:1; se dejaron en reposo por 12 horas, luego de las cuales se retiró parte del metanol limpio y se dejaron las muestras en cajas de Petri (previamente taradas y secadas) hasta sequedad del solvente.

El polímero obtenido fue cuantificado por gravimetría y su concentración se expresó como la relación entre el peso del polímero (mg por mL) dividido en los mg de biomasa por mL, obtenidos del medio recuperado x 100. (Verlinden *et al*, 2011). Posteriormente se identificó mediante cromatografía de gases, tomando como patrón el cromatograma del ácido 3-hidroxi-butírico.

3.3.3 Evaluación de condiciones de producción de PHAS.

Se aplicó un diseño experimental tipo superficie de respuesta con 2 factores de experimentación (concentración del residuo graso y tiempo de fermentación) y una variable de respuesta (concentración de PHAs), correspondiente a un diseño factorial aplicado de tercer nivel “3²” con un punto central de cada factor, una réplica de cada ensayo, 20 experimentos y un error de 13 grados de libertad.

El rango de las variables a evaluar se estableció con base en resultados obtenidos en la etapa 1 y datos de la bibliografía. En la **Tabla 1** se presenta el rango de condiciones evaluadas. Las variables temperatura de incubación (30°C) y la agitación de 200 rpm, se mantuvieron constantes en todos los casos.

Tabla. 1. Factores y niveles de diseño

FACTORES	NIVELES			
	-1	0	1	
Concentración de residuo	25	50	75	%
Tiempo	48	96	144	Horas

Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó, como se dijo anteriormente, la metodología de superficie de respuesta y análisis de optimización multivariable con ayuda del software estadístico **STATGRAPHICS CENTURION XV** para Windows, el cual permitió establecer el efecto de las variables independientes y sus interacciones sobre la producción de Polihidroxialcanoatos.

4. RESULTADOS y DISCUSION

4.1 Análisis preliminares

4.1.1 Caracterización de la materia prima

El residuo graso obtenido de la trampa de grasa de la empresa refinadora de aceites se caracterizó en cuanto a contenido de humedad, nitrógeno, grasa e índice de acidez. Se encontró, como se muestra en **Tabla 2**, que se trata de un sustrato en donde su principal componente corresponde a grasa, específicamente a ácidos grasos libres como se establece al medir el índice de acidez.

Tabla 2: Caracterización del residuo graso obtenido de la trampa de grasa de una empresa refinadora de aceite de palma

Características del residuo graso	
Humedad	8,00%
Índice de acidez	86,33%
Nitrógeno	0,28%
Grasa total	89,76%

En cuanto al contenido de ácidos grasos, se encontró que la materia prima es sumamente compleja (Anexo B); sin embargo, al cuantificar los ácidos grasos presentes se estableció que está constituida principalmente por ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoléico que en total suman 80,29%, como se relaciona en la Tabla 3. Teniendo en cuenta que el 77% del aceite vegetal que se refina en la planta de refinación de aceite es aceite de palma, se puede decir que

el residuo graso analizado conserva una composición de ácidos grasos muy similar a esta materia prima.

Tabla 3. Contenido de ácidos grasos en el residuo graso

Acido graso	%
Mirístico (C14)	1,40
Palmitico (C16)	44,81
Esteárico (C18:0)	17,06
Oleico(C18:1n9c)	11,56
Linoléico (C18:2n6c)	6,86

4.1.2 Reactivación y crecimiento bacteriano

En la **Figura 1** se muestran las colonias de ATCC 17699 *Wautersia eutropha* recuperadas del vial liofilizado y crecidas en agar nutritivo, incubadas a 26°C por 48 horas.

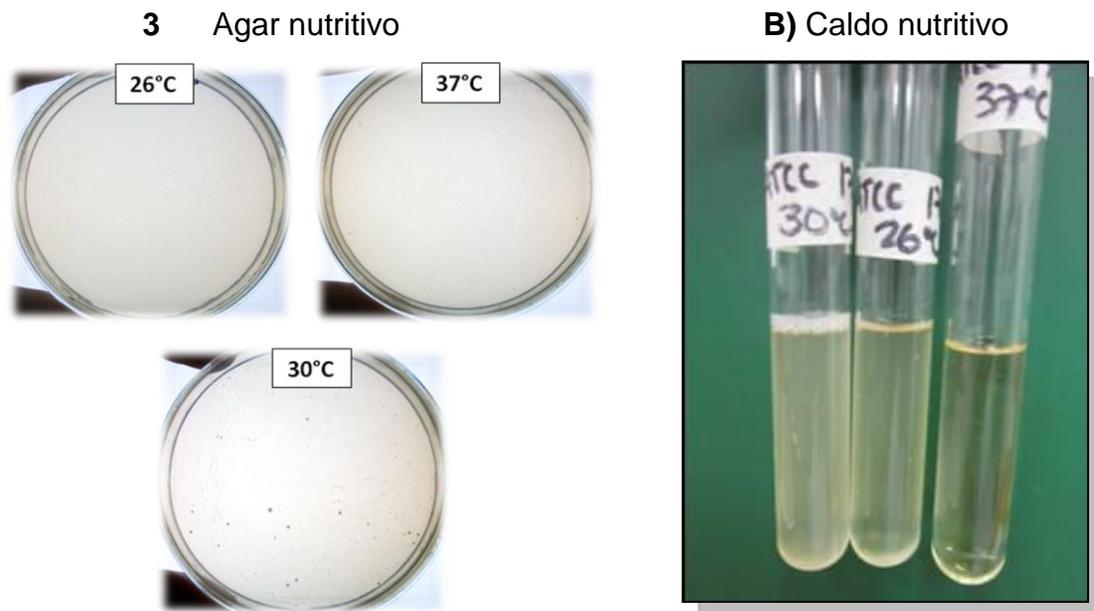
Figura 1. ATCC 17699 *Wautersia eutropha* en agar nutritivo



El ensayo para establecer la mejor temperatura de crecimiento se realizó dejando las cajas de petri y los tubos de ensayo en incubación durante 24 y 48 horas respectivamente y verificando el crecimiento del microorganismo a 26°C, 30°C y 37°C.

Como se observa en la **Figura 2** se presentó crecimiento en las cajas incubadas a 37°C y 30°C, pero se observó mayor crecimiento a 30°C. Así mismo, al comparar los tubos de ensayo se observó mayor turbidez a 30°C, seguido por 26°C y por ultimo 37°C. De acuerdo a esto, se estableció como temperatura para la determinación de la cinética de crecimiento y los ensayos de biotransformación, 30°C. Esto es acorde con los estudios que utilizan esta cepa para la producción de PHAs como Ko-Sing Ng, *et al* 2011,

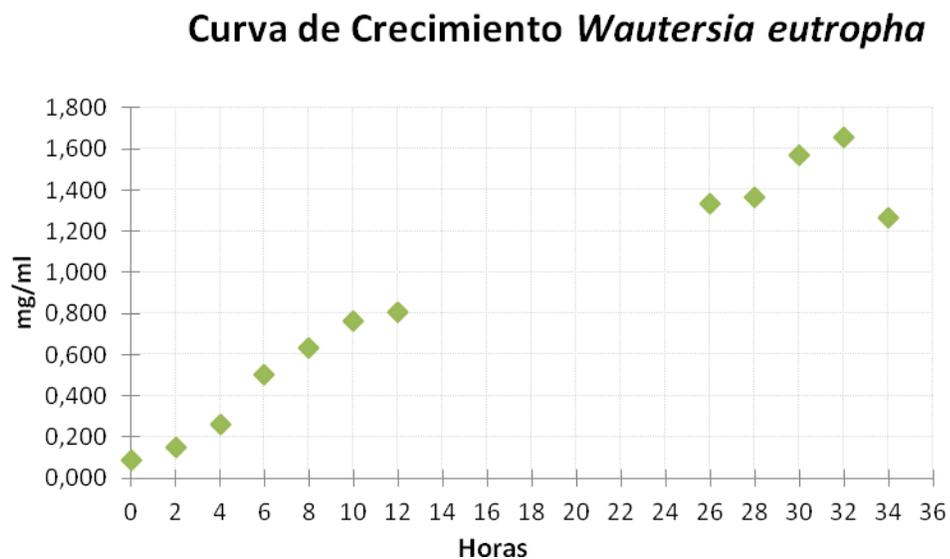
Figura 2: Crecimiento de la ATCC17699 *Wautersia eutropha* a diferentes temperaturas.



Con el fin de determinar la fase exponencial y obtener así un inóculo metabólicamente activo, se estableció la curva de calibración de absorbancia vs.

peso seco (Anexo C) y la curva de crecimiento para la cepa ATCC 17699 *Wautersia eutropha*. La **Figura 3** muestra un incremento sostenido de la biomasa del microorganismo en agar nutritivo a 30°C con agitación de 200 rpm a partir de la hora 2 de fermentación aproximadamente hasta la hora 32. Estos resultados coinciden con los reportados por DeSouza (2005) quien encontró una fase de adaptación de 2hr y un crecimiento sostenido, aunque este autor encontró una fase exponencial de solo 7 horas.

Figura 3: Curva de crecimiento Atcc17669 *Wautersia eutropha* en caldo nutritivo, 30°C, 200rpm



De acuerdo a estos resultados se estableció un tiempo de fermentación entre 26 y 28 horas a 30°C con agitación de 200rpm para todos los inóculos utilizados en las fermentaciones con el fin de asegurar una biomasa suficiente y metabólicamente activa.

4.2 Proceso de biotransformación

4.2.1 Evaluación de la capacidad de formación de PHA (Etapa 1).

Previo al proceso de biotransformación se hizo un cálculo aproximado de la cantidad de carbono presente en el residuo graso, tomando como base la composición de ácidos grasos, el contenido de grasa y el contenido de proteína, obteniendo una relación carbono/nitrógeno de 196; esto indica que es un sustrato adecuado para la síntesis del biopolímero, teniendo en cuenta que algunos autores como K-sing *et al* consideran una relación C/N óptima entre 20 y 50, aunque en la bibliografía se reportan trabajos con relación C/N desde 6 hasta mayor a 120 (Barbosa *et al*,2007; López-Cuellar, 2010).

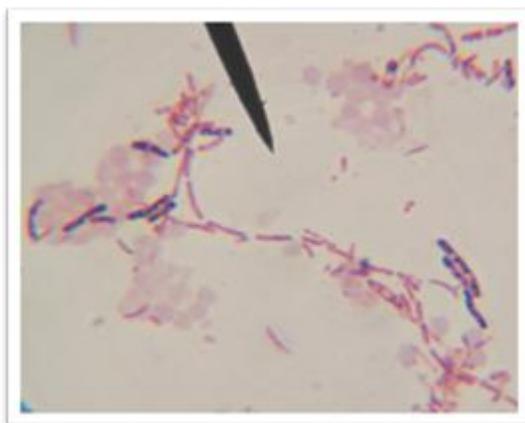
Bajo esta premisa y una vez establecidas las condiciones de crecimiento de la bacteria y las características del residuo, se procedió a evaluar a nivel de laboratorio la producción de PHAs. Para esto se mezclaron en erlenmeyer de 250mL, 10g del residuo con 90mL de medio de cultivo con 27hr de crecimiento, que contenían aproximadamente 3,31mg de células por mL de medio de cultivo y se hizo seguimiento con la tinción de Negro Sudán; esta concentración de residuo en el medio corresponde a una relación C/N de 8,5.

Las tinciones realizadas diariamente a la fermentación mostraron el incremento progresivo de los gránulos al interior de las células desde las 24hr de fermentación hasta las 168 horas como se observa en la **Figura 4**.

Figura 4: Evolución del contenido de gránulos de PHAs con el tiempo de fermentación vistos al microscopio con coloración de Negro Sudán.

A) Cultivo de 24h de fermentación. B) cultivo de 168h de fermentación

A)

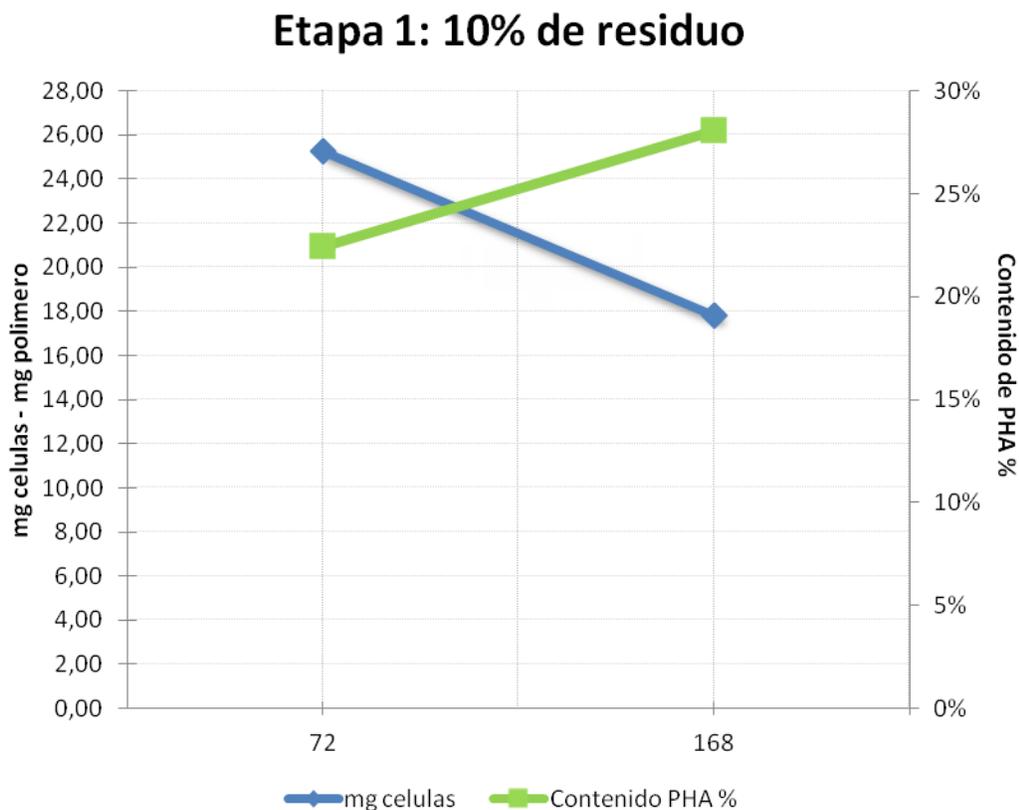


B)



En esta primera etapa se observó, como se evidencia en la **figura 5**, que mientras la biomasa decrece en el tiempo, los mg de polímero producido se mantienen y hay un crecimiento sostenido de la acumulación de carbono en forma de biopolímero hasta alcanzar casi un 30% del peso de la biomasa presente en el medio. Esto sugiere que las condiciones para que el microorganismo sintetice los PHA son favorables. A 72 horas de fermentación se alcanza 22% de contenido de PHAs y a 168 horas, 28%.

Figura 5: Variables evaluadas en la Etapa 1: 10% de residuo. Contenido de PHA: mg de polímero/ mg de biomasa.



El polímero, determinado por gravimetría como se dijo anteriormente, se precipitó en metanol frío tomando una apariencia transparente-blanca, como se observa en las diferentes etapas del proceso de extracción que se muestran en la **figura 6**.

Figura 6: Polímero PHAs obtenido en diferentes etapas del proceso de extracción y cuantificación .



Polímero concentrado en cloroformo
Muestra 72h



Polímero purificado con metanol
Muestra 72h



Polímero precipitado en metanol
Muestra 168h



Polímero seco
Muestra 168h

Estos resultados son similares a los reportados por Chakraborty *et al* (2009), quienes inocularon un medio a base de maíz con ácido acético o ácido propiónico y obtuvieron un contenido de PHA del 29% después de 120 horas de fermentación; sin embargo, se encuentran estudios con mayor éxito como el realizado por Alias y Ten (2005) quienes usaron diferentes sustratos como oleína de palma, aceite de palma crudo, aceite de núcleo de palma, estearina de palma y ácido oleico, en una concentración del 1% y obtuvieron entre 43% y 57% de contenido de PHA en biomasa de cepas nativas.

4.2.2 Evaluación de las condiciones de biotransformación para obtener altas productividades de PHAs a escala de laboratorio (Etapa 2).

En esta etapa se evaluó el efecto de la concentración de residuo graso y el tiempo de fermentación utilizando un diseño experimental con metodología de superficie de respuesta, como se describió en el numeral 3.3.3.

La selección de los rangos evaluados se basó en estudios realizados por otros investigadores. Según Chakraborty *et al* (2009), la relación C/N óptima para la producción de PHAs es de 50, y varios autores coinciden en la utilización de relación C/N entre 20 y 50 para obtener resultados satisfactorios en la producción de PHAs (Lee *et al*, 2008, Villano *et al* 2010, Ko-Sin *et al* 2011). Con base en lo anterior, en el presente trabajo de aplicación se evaluaron relaciones de C/N entre 20 y 100 como se muestra en la **Tabla 4**. Adicionalmente, se establecieron diferentes tiempos de fermentación teniendo en cuenta la variabilidad de los ensayos consultados en los diferentes artículos (Chakraborty *et al*, 2009, Zhiquiang Chen *et al*, 2010; Ko-Sin *et al* 2011).

Tabla 4. Relación C/N en las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas

Concentración de residuo graso	Relación C/N
25%	23
50%	56
75%	107

En la **Tabla 5**, se muestran los resultados de la ejecución del diseño experimental.

Tabla 5. Variables independientes y respuesta para el diseño factorial “3²” con un punto central de cada factor, una réplica de cada ensayo, 20 experimentos y un error de 13 grados de libertad aplicado a la producción de PHAs por la ATCC 17699 *Wautersia eutropha*.

Experimento	Tiempo de fermentación (horas)	Concentración del residuo (%)	Cont. de PHA (mgPHA/mgBiomasa)*100
1	144	50	17
2	96	50	15
3	96	25	17
4	48	25	6
5	48	50	15
6	144	75	76
7	96	50	11
8	96	75	28
9	144	25	17
10	48	75	12
11	144	50	14
12	96	50	10
13	96	25	11
14	48	25	3
15	48	50	21
16	144	75	65
17	96	50	7

18	96	75	13
19	144	25	15
20	48	75	12

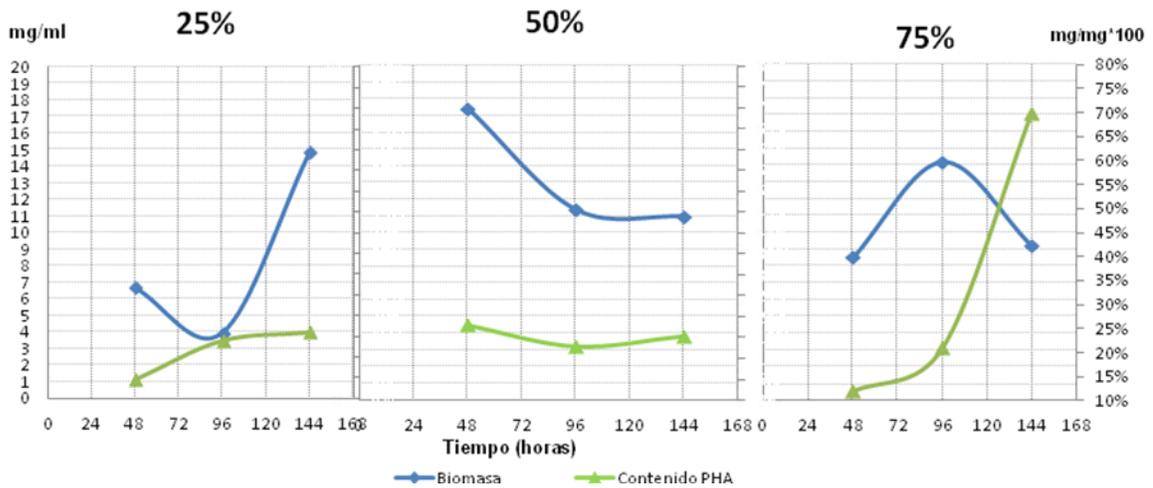
Para evaluar el efecto de las variables independientes (Tiempo y concentración de residuo) sobre la producción de PHAs y conocer el comportamiento de la biomasa y los mg de polímero recuperados, se expresaron gráficamente los resultados como se muestra en la **figura 7**; allí, el gráfico A muestra la evolución de las variables evaluadas agrupándolas por tiempo de fermentación y se evidencia que a las 48 horas hay un crecimiento de la biomasa(mg/ml) y el contenido de PHA (mg/mg) de manera paralela, lo que puede implicar que el microorganismo está creciendo y al mismo tiempo empieza a acumular el polímero, situación que solo cambia a las 144 horas en que se detiene el crecimiento especialmente cuando se tienen concentraciones del residuo al 50% y al 75% y el contenido de PHA se incrementan. En el gráfico B, se agrupan las variables evaluadas de acuerdo a la concentración del residuo y los resultados sugieren que la fermentación con el 25% de residuo soporta el crecimiento de la biomasa en el tiempo pero sin favorecer la acumulación de PHAs; situación que es similar con el 50% de concentración del residuo. Cuando hay 75% del residuo en el medio se observa cómo la biomasa deja de crecer y comienza a incrementar el contenido de PHA (mg PHA/mgbiomasa *100).

Figura 7. Análisis de los factores individualmente

A) Variables agrupadas según el tiempo de fermentación



B). Variables agrupadas según la concentración de residuo

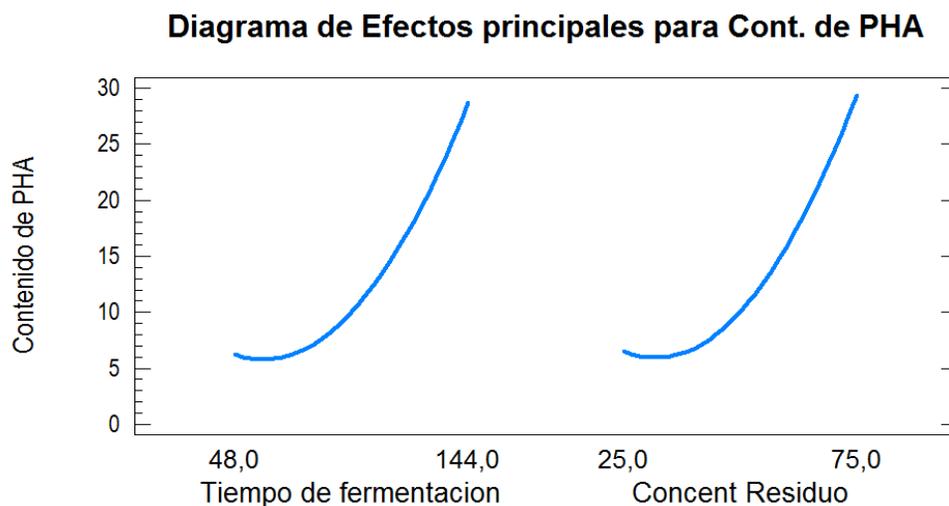


Para el análisis de los valores obtenidos en el diseño experimental se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurión XV, y se realizó como sigue:

- Evaluación del diagrama de efectos principales en el cual se destaca la influencia que tiene cada variable en forma individual sobre la producción de PHAs.
- Análisis de varianza (ANOVA) para mostrar los efectos que tienen significancia estadística y utilización del diagrama de Pareto para observar los efectos en el orden decreciente de importancia.
- Desarrollo de un modelo matemático que relaciona cada variable de respuesta con la variable independiente y determinación de los respectivos coeficientes de regresión.
- Desarrollo gráfico de las superficies de respuesta, para visualizar los efectos de las interacciones entre las variables.

En la **figura 8** se muestra el diagrama de efectos principales para el contenido de PHA en porcentaje. En él, la variable de respuesta se presenta como función de cada variable independiente, desde su nivel más bajo al más alto. La tendencia de cada línea refleja la influencia positiva de cada variable y la pendiente permite establecer la producción de PHAs en el rango de los niveles evaluados.

Figura 8. Diagrama de efectos principales para el contenido de PHA (mg/mg)



Se observa que el tiempo de fermentación y la concentración del residuo tienen un efecto positivo, es decir, la producción de PHAs aumenta a medida que estos factores avanzan del nivel más bajo al nivel más alto. Este incremento es muy similar para ambas variables y en los niveles inferiores no es lineal (48h – 25%); antes de alcanzar el nivel central (96-50%) de ambas variables, la producción de PHA se vuelve lineal y tiene a permanecer constante.

Esto se puede corroborar al revisar los experimentos **6 y 16** (75%, 144horas) en los cuales se evidencia la mayor producción de PHAs a mayor tiempo y mayor concentración del residuo, y el gráfico 6 en que, como se dijo anteriormente, a las 144 horas se evidencia la disminución de la biomasa y el aumento en la acumulación de PHA al interior de la célula hasta alcanzar hasta un 70% de su peso. Esto es acorde con lo publicado en la bibliografía, en donde se establece que a mayor concentración del residuo la relación C/N se incrementa y se requiere mayor tiempo para que el microorganismo acumule mayor cantidad de PHAs (Zhiqiang Chen *et al*, 2010; López-Cuellar *et al* 2010).

El análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de PHA que se muestra en la **Tabla 6** permite establecer la variación debida a los diferentes factores y la interacción entre ellos, el efecto de cada factor al cuadrado y la variación aleatoria debida a errores experimentales (error total) con su respectiva significancia. Para ello, se debe comparar la suma de cuadrado de las medias (SCM) de dichos efectos con el cuadrado medio del error total (CME), con el fin de obtener el valor F, el cual se utiliza para establecer si los valores estimados para la varianza difieren significativamente. En este caso, la concentración del residuo, el tiempo y interacción entre estos dos factores poseen un valor de P menor de 0,05, mostrando con ello que son significativamente diferentes de cero en un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de PHA.

Variable	Suma de cuadrados (SC)	Suma Cuadrado medias (SCM)	Relación F	Valor P
A: Tiempo	15,1875	15,1875	13,12	0,0031
B: Concentr. residuo	15,6408	15,6408	13,51	0,0028
AA	257,524	257,524	2,22	0,1597
AB	1104,5	1104,5	9,54	0,0086
BB	293,357	293,357	2,53	0,1354
Error total	1505,11	1505,11		

F: prueba de significancia

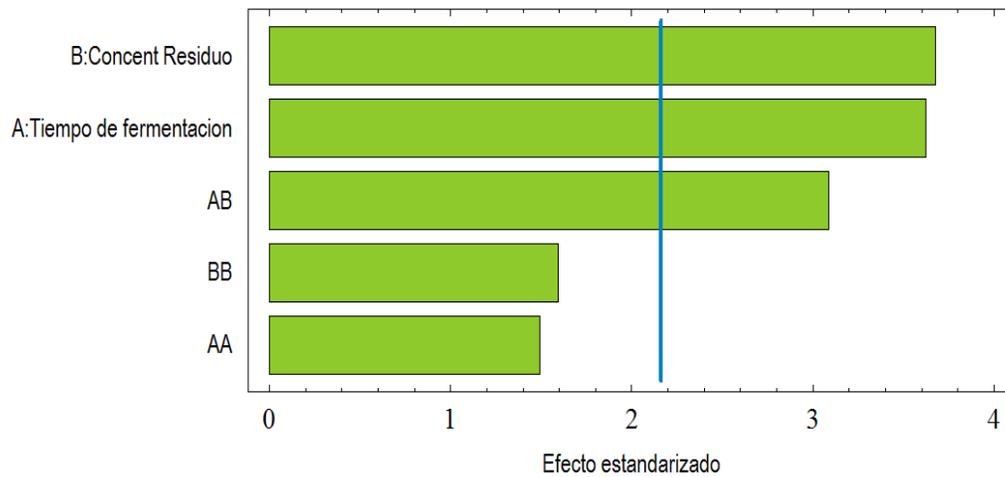
P: probabilidad de error

En la **Tabla 7** se encuentran los efectos estimados de cada variable y se observan gráficamente en el diagrama de pareto (**Figura 9**) donde se muestra cada efecto en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar). Las barras que se extienden mas allá de la línea azul corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 7. Efectos estimados de cada variable y sus interacciones sobre el contenido de PHA

Promedio	10,0357
A: Tiempo de fermentación	22,5
B: Concentración del residuo	22,8333
AA	14,8571
AB	23,5
BB	15,8571

Figura 9. Gráfico de Pareto para contenido de PHA



De acuerdo a esto se determino que la concentración del residuo y el tiempo tienen una incidencia estadísticamente significativa sobre el contenido de PHA y existe una relación directa entre ellas; los efectos de las interacciones de las variables con sí mismas no son significativos. Bajo las condiciones de este estudio, la concentración de residuo tiene la mayor influencia sobre el contenido de PHA.

De otra parte, se determinó también el ajuste de un modelo de regresión para obtener los más altos niveles de producción de PHAs; la ecuación del modelo que predice la producción es:

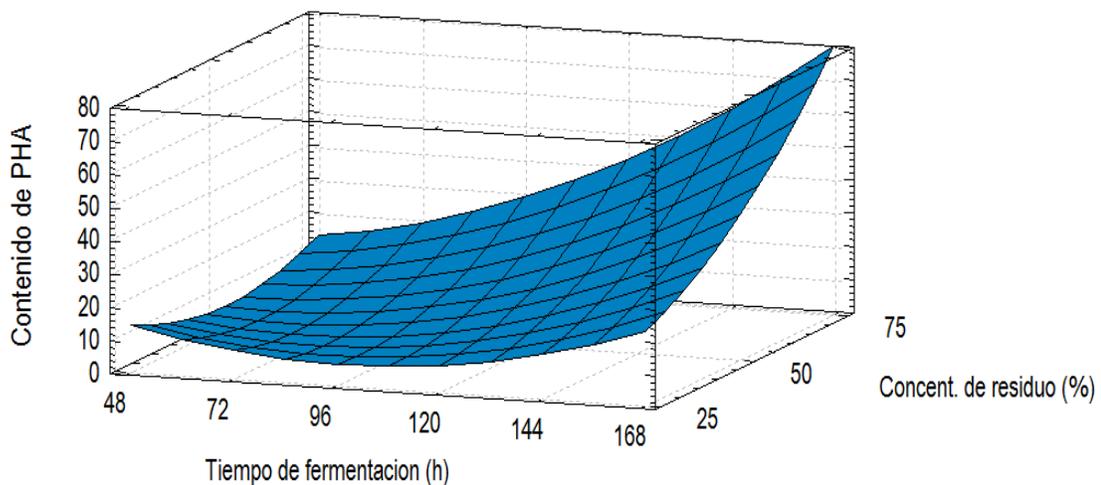
$$\text{Contenido PHA} = 73,131 - 0,874256*A - 1,7519*B + 0,00322421*A^2 + 0,00979167*A*B + 0,0126857*B^2$$

El estadístico R^2 ajustado indica que este modelo explica el 68,3101% de la variabilidad en el contenido de PHAs.

Es de anotar que el signo más (+) y el signo menos (-) representan los efectos positivos y negativos sobre la variable respuesta, en este caso, el contenido de PHA. De acuerdo a esto, la interacción entre A y B (Tiempo y concentración de residuo) la cual es significativamente diferente según el análisis ANOVA, es una variable que toma más importancia pues de ésta depende que se logre una mayor producción de PHAs. (Papanephytou y Kyriakidis, 2012)

A partir de este modelo, se construyeron las gráficas de superficie de respuesta del tiempo de fermentación y la concentración del residuo. Como se observa en la **figura 10**, Los valores más altos de contenido de PHA se alcanzan cuando la fermentación se realiza en un periodo de tiempo amplio (144h) con la mayor cantidad de residuo (75%).

Figura 10. Grafico de superficie de respuesta para Contenido de PHA (mg/mg)



Los perfiles de las curvas creadas por la superficie, permiten ver que las pendientes son pronunciadas con los cambios tanto en la concentración del residuo como en el tiempo de fermentación, lo cual corrobora que ambas variables

son determinantes para alcanzar mejores niveles de producción. Sin embargo, los coeficientes negativos que se presentan en la ecuación de ajuste del modelo para el tiempo y la concentración de PHAs no se evidencian en el gráfico de superficie de respuesta, aunque pueden estar compensados por el efecto positivo que ejerce la interacción entre estas dos variables; esto puede indicar que el modelo no es válido en todos los casos, razón por la cual es necesario continuar investigando este comportamiento en futuros procesos de biotransformación del residuo graso en PHA.

En la **Tabla 8** se encuentra la estimación de los resultados para el contenido de PHAS y el resultado actual en cada ensayo, aplicando el modelo ya mencionado. En varios casos la diferencia entre los datos del modelo y los datos actuales exceden el 50%, esto puede deberse a una insuficiente extracción del polímero de las células de *Wautersia eutropha* y/o que el modelo no es válido en todos los casos, como se discutió en el gráfico de superficie de respuesta. Esta misma variación la reportan Hong *et al* (2009) y Papanephytou y Kyriakidis (2012), estos últimos en su estudio sobre obtención de PHAs usando una cepa de *Thermus thermophilus* y evaluando diferentes aspectos como relación C/N, concentración de fosfato y tiempo de reacción mediante metodología de superficie de respuesta.

Tabla 8. Estimación de resultados para “Contenido de PHA” según el modelo ajustado

Ensayo	Valor observado	Valor ajustado
1	15	13
2	17	9
3	6	16
4	11	13
5	15	9
6	17	31
7	76	61
8	17	15
9	12	15
10	28	32
11	20	10
12	11	6
13	3	12
14	7	10
15	21	5
16	14	28
17	65	58
18	15	11
19	12	12
20	13	28

Con base en estos resultados, se aplicó la *metodología de optimización multivariable*, con la cual se analiza de forma simultánea el efecto del tiempo y concentración del residuo sobre la variable de respuesta con el objetivo de establecer las condiciones de reacción, en las cuales se maximiza el contenido de PHA (mgPHA/mgBiomasa). Los rangos dentro de los cuales se realizó la optimización de la reacción se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Optimización de la variable respuesta

Factor	Bajo	Alto	Optimo
Tiempo	25	144	144
Concentración de residuo	25%	75%	75%

Los resultados del análisis mostraron que bajo las condiciones del experimento la máxima concentración de PHA que obtiene es de 59,8095 mgPHA/mg biomasa*100.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con los resultados de trabajos reportados en los últimos 10 años, enlistados en la **Tabla 10**, se calculó la productividad y se encontró que la obtenida en este estudio (0,026 gPHA/gbiomasa/h) es inferior a la señalada por otros autores (0,050 gPHA/gbiomasa/h en promedio) que utilizan principalmente aceites vegetales puros o sus fracciones e incluso bacterias modificadas genéticamente (0,185 gPHA/gbiomasa/h), pero es mayor a la reportada por Verlinden *et al*, 2011 (0,017 gPHA/gbiomasa/h), quienes utilizaron aceite de canola, y similar a la obtenida por Chakraborty *et al*, 2009 quienes utilizaron un medio cuya relación C/N era 50 adicionado con ácido acético (0,024 gPHA/gbiomasa/h) y ácido láctico (0,024 gPHA/gbiomasa/h).

Comparando específicamente las productividades obtenidas cuando se usa como sustrato aceite de palma o sus fracciones con el residuo de la trampa de grasa se observa que en el primer caso se logran en promedio productividades del orden de 0,045 gPHA/gbiomasa/h, es decir, el doble de lo alcanzado en este trabajo.

Tabla 10. Algunos Trabajos reportados en los últimos 10 años en la producción de PHAs a partir de diferentes sustratos

Sustrato	Microorganismo	Autor	Año	Contenido de PHA	Productividad (g/PHA/H)
Oleina de palma (1% V/V)	Nativos	Alias y Tan	2005	43,10%	0,045
Torta de soya (fermentación en estado sólido)	<i>C. necator</i>	Oliveira F <i>et al</i>	2007	14,40%	0,033
Torta de soya suplementada con melaza				33,30%	0,086
Aceite de palma crudo (5g/L) + MM	<i>C. necator</i>	Lee Wing-Hin, <i>et al</i>	2008	75%	0,049
Oleina de palma (5g/L) + MM				70%	0,050
Aceite de cocina comercial (5g/L) + MM				78%	0,058
Acido Acetico (5g/L)	<i>Ralstonia eutropha</i>	chakraborty <i>et al</i>	2009	29,20%	0,024
Acido lactico (5g/L)				40,70%	0,02
Ácido butirico (5g/L)				31,90%	0,037
Acido propiónico (5g/L)				29,30%	0,036
sucrosa	Nativos	Moreno <i>et al</i>	2009	44,53%	0,058
Butirato de sodio(18,7g/L)	<i>Y proteobacterium(nativo)</i>	Zhiqiang Chen <i>et al</i>	2010	41%	
aceite de canola	<i>Wautersia eutropha</i>	López-Cuellar <i>et al</i>	2010	89%	
Aceite de jatropa(10g/L) + MM	<i>C. necator</i>	K-sing <i>et al</i>	2011	84%	0,14
Aceite de canola (20g/L) + TSB	<i>C. necator</i>	Verlindem <i>et al</i>	2011	40%	0,017
Aceite ácido de palma (5g/L)	<i>C. necator</i>	kumar <i>et al</i>	2011	43%	0,04
Fructosa	Nativos	Doan, Thuok Van	2012	61%	0,110
Aceite de palma(40g/L)	<i>Ralstonia eutropha</i>	Riedel <i>et al</i>	2012	71%	

Las diferencias con respecto a los trabajos **reportados** pueden ser debidas a diferentes factores:

- **El sustrato:** la mayoría de los estudios utilizan aceites vegetales puros cuya composición mayoritaria son triglicéridos y en este trabajo se utilizo un residuo cuya composición en un 80% a ácidos grasos libres, situación que da lugar a un medio muy ácido que puede afectar la acción del microorganismo. Según la bibliografía consultada, se ha demostrado que *Wautersia eutropha* utiliza más eficientemente los sustratos cuya composición sea principalmente de ácidos grasos insaturados como el ácido linoléico (34%), el Oleico (42%) y en menor proporción el palmítico (17%) para la producción de PHAs (Zhiqiang Chen *et al*, 2010). Los ácidos grasos Linoléico y Oleico están presentes principalmente en aceites vegetales como el de Soya, Oliva, Canola, Maíz etc , en tanto, que el acido Palmítico es el aceite mayoritario del Aceite de Palma. En el caso del residuo evaluado los ácidos grasos mayoritarios son el acido palmítico

(44%) y el Oleico (11%), por lo cual podría haber influencia de la especificidad de la bacteria por el sustrato.

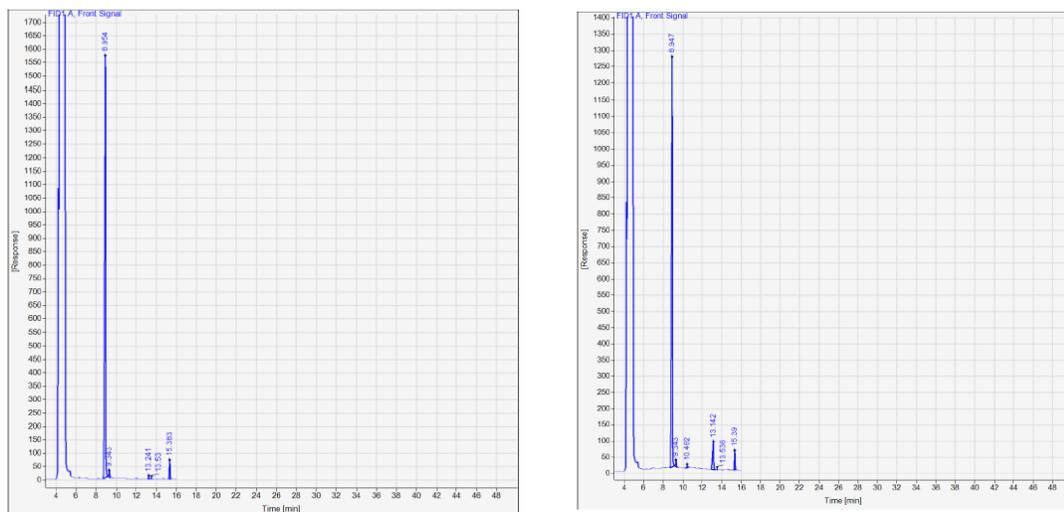
Chakraborty et al (2009) encontraron que cuando los ácidos grasos se presentan en altas concentraciones en el medio se reduce el crecimiento bacteriano y esto se traduce en una menor acumulación de PHA y por esta razón concluye que este tipo de sustratos deben adicionarse al medio una vez la bacteria haya alcanzado su fase estacionaria, es decir, la mayor cantidad de biomasa posible.

- **El medio de cultivo utilizado para la biotransformación:** En este trabajo se utilizó el residuo de la trampa de grasa mezclado en diferentes proporciones con un caldo nutritivo cuya composición está equilibrada en nutrientes y micronutrientes, en un solo bache. Tal como se evidencio en el gráfico 6, es posible que este medio soporte el crecimiento bacteriano por más tiempo retardando la acumulación de carbono al interior de la célula en forma de PHA. Los artículos que muestran mayor productividad como Lee-Wing *et al* (2008) usan un medio de cultivo mineral que asegura la disponibilidad mínima de micronutrientes como nitrógeno y fosforo para soportar el crecimiento bacteriano y llevar a la bacteria a acumular el carbono presente en el sustrato como PHA. Chakraborty *et al*, 2009 muestran que micronutrientes como el nitrógeno y el fósforo en bajas concentraciones permiten que las bacterias cambien su metabolismo reproductivo por el de acumulación de biopolímero pero otras investigaciones sugieren que la ausencia total del nitrógeno en el proceso de biotransformación puede inhibir la actividad enzimática en la síntesis de PHAs (Shimizu *et al*/1999, en Chakraborty *et al*, 2009). En este trabajo los resultados coinciden con los publicados por Verlinden et al, quienes también utilizaron un medio nutritivo (TSB) mezclado con el aceite de canola y el contenido de PHA (40%) y la productividad (0,017) son similares.

No hay reportes en la literatura para el uso de residuos de trampas de grasa como sustratos para la producción de PHAs, pero los resultados obtenidos en este estudio muestran que es posible obtener el polímero en forma pura, como se observa en el cromatograma de la figura 11.

De esta forma, este trabajo de aplicación plantea una posible alternativa para el uso de este residuo graso disminuyendo el impacto ambiental generado por su disposición inadecuada y, a su vez, se producen polímeros biodegradables con amplio potencial de aplicación. Sin embargo y dadas las características del sustrato se debe continuar investigando para optimizar el proceso de biotransformación y de extracción del polímero, mejorando el medio de cultivo y evaluando el efecto de factores como: la fermentación en varias etapas, el ajuste de micronutrientes en el medio de cultivo, el control de pH y concentraciones más bajas del sustrato y la búsqueda de microorganismos propios del sustrato capaces de producir PHAs.

Figura 11. Cromatograma del polímero obtenido con la ATCC 17699 utilizando el residuo sólido de la trampa de grasa.



Patrón de ácido 3hidroxibutírico

PHA obtenido en el bioproceso

5. CONCLUSIONES

- Se determinó que *Wautersia eutropha* crece mejor a 30°C y su fase exponencial en medio nutritivo con agitación de 200rpm se extiende hasta las 30 horas.
- El residuo sólido de la trampa de grasa fue utilizado por la ATCC 17699 *Wautersia eutropha* como sustrato para la producción de polihidroxicanoatos a escala de laboratorio.
- En el proceso de biotransformación las variables tiempo de fermentación, concentración del residuo graso y su interacción tienen un impacto estadísticamente representativo sobre la producción de PHAs.
- En las condiciones evaluadas en el laboratorio la mayor cantidad de PHA se obtiene usando una concentración del 75% de residuo graso durante 144 horas de fermentación.
- Este trabajo de aplicación plantea una alternativa ambientalmente responsable para el aprovechamiento de este subproducto generado en la trampa de grasa de la planta de refinación de aceite.

6. RECOMENDACIONES

- Continuar con ensayos de laboratorio usando el residuo graso de la trampa de grasa para verificar las condiciones evaluadas en este proyecto de aplicación y obtener modelos matemáticos más ajustados.
- Evaluar otras variables en el proceso de fermentación del residuo obtenido de la trampa de grasa como el pH y el tamaño del inóculo.
- Determinar la curva de crecimiento del microorganismo sobre el sustrato evaluado para establecer si corresponde a un metabolito primario o a uno secundario, como se observó en este trabajo de aplicación.
- Realizar ensayos con aceites vegetales puros para evaluar el efecto de la acidez en el proceso de biotransformación.
- Evaluar el contenido de micronutrientes como el nitrógeno y el fósforo en el medio de fermentación para determinar si tienen alguna influencia sobre la producción de PHAs.
- Realizar un screening en el residuo sólido para buscar cepas nativas adaptadas al medio que sean capaces de producir PHAs.
- Optimizar el método de extracción y cuantificación de los PHAs para disminuir el error en las determinaciones.
- Explorar otros métodos de cuantificación e identificación del biopolímero obtenido con esta cepa ATCC 17699,

7. BIBLIOGRAFÍA

Alias, Zazali and Tan, Irene K.P. Isolation of palm oil-utilizing, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. EN: Bioresource Technology, Vol.96 (2005); p. 1229–1234.

Bialy, Heba El; Gomaa, Ola M. and Azab, Khaled Shaaban. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. EN: World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol 8. (2011)

Braunegg G.; Sonnleimer, B. and Lafferty R.M. A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly- γ -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. EN: European journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 6 (1978); p. 29-37.

Burdon, K. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. Department of Bacteriology and Immunology, Baylor University College of Medicine, Houston, Texas. Vol.52 (1946); p. 665-678

Castilho, Leda R; Mitchell, David A and Freire, Denise M.G. 2009 Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. Journal of Bioresource Technology, Vol. 100 (2009); p. 5996–6009.

CONVENIO DE COMPETITIVIDAD DEL SECTOR AGROPECUARIO COLOMBIANO (Junio de 2001, Bucaramanga). Acuerdo regional de competitividad de la cadena productiva de aceite de palma, zona central, Bucaramanga. Corporación para la Innovación, Tecnológica Secretaría Técnica.

Consejo Regional de Competitividad, Bucaramanga, Agosto de 2001, 96p. (Colección documentos IICA, serie competitividad no. 21) ISBN 9328-35-0.

Cortázar, J.; Malagón, D. Evaluación experimental de tres métodos de recuperación de polímeros biodegradables del tipo PHAs sintetizados por *Pseudomonas*. (2001). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química. Departamento de Ingeniería Química. Bogotá D.C.

Chakraborty, P.; , Gibbons, W.; Muthukumarappan, K. Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. EN: Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072. Vol. 106 (2009); p.1996-2005

Doan, T.; Nguyen, B. Polyhydroxyalkanoates production by a bacterium isolated from mangrove soil samples collected from Quang Ninh province. EN: Journal of Vietnamese Environment, Vol. 3 (2012); p.76-79.

Gunstone, J. Alander, S.Z. Erhan, B.K. Sharma, T.A. McKeon and J.-T. Lin. Nonfood uses of oils and fats. EN: The lipid handbook, third edition, chapter 9. Taylor and Francis group. (2005); p591 – 635.

Haslenda, H. and Jamaludin M. Z. Industry to Industry By-products Exchange Network towards zero waste in palm oil refining processes. EN: Resources, Conservation and Recycling Journal. Vol 55 (2011); p. 713 – 718.

Hong, C.; Hao, H.; Haiyun, W. Process optimization for PHA production by activated sludge using response surface methodology. EN: Biomass and Bioenergy. Vol.33 (2009); p. 721-727.

Ko-Sin, N.; Wong, Y. ;Tsuge, T; Sudesh, K. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyhexanoate) copolymers using jatropha oil as the main carbon source . EN: Process biochemistry. Vol. 56 (2011); p. 1572 – 1578.

Laycock, B; Halley, P.; Pratt, S.; Werker, A.; Lant, P. Review: The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. EN: Progress in Polymer Science, DOI 10.1016 (2012).

Lee, W.; Loo, C.; Nomura, C.; Sudesh, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. EN: Bioresource Technology. Vol. 99 (2008); p. 6844 – 6851.

Lemos, P.C.; Viana,C.; Salgueiro, E.M.; Ramos, A.M.; Crespo, J. P. S. G and Reis, M. A. M. Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate accumulating mixed culture. EN: Journal of enzyme and Microbial Technology. Vol. 22 (1998); p. 62–671.

López-Cuellar, M.R.; Alba-Flores, J.; Gracida, J.N.; Rodriguez, B. and Perez-Guevara, F. 2011. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. EN: International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 48 (2011); p. 74–80.

Moreno, Nubia; Gutiérrez, Ivonne; Malagón, Dionisio; Grosso, Victoria; Revelo, Dolly; Suárez, Diego; González, Juan; Aristizábal, Fabio; Espinosa, Armando and Montoya, Dolly. Bioprospecting and characterization of poly-bhydroxyalkanoate (PHAs) producing bacteria isolated from Colombian sugarcane producing areas. EN: African Journal of Biotechnology. Vol. 13 (2007); p. 1536-1543.

Mumtaz, Tabassum; Yahaya, Noor Amalina; Abd-Aziz, Suraini; Rahman, Nor'Aini Abdul, Phang, Lai Yee; Shirai, Yoshihito and Hassan, Mohd Ali. Turning waste to wealth-biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent - a

Malaysian perspective. EN: Journal of Cleaner Production. Vol. 18 (2010); p. 1393 – 1402.

Oliveira, Fabiane C., . Dias b, Marcos L; Castilho a, Leda R. and Freire, Denise M.G. Characterization of poly (3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. EN: Journal of Bioresource Technology. Vol. 98 (2007); p. 633–638.

Oliveira, Fabiane C; Freire, Denise M. G; Lopes-Dias, Marcos y Castilho, Leda R. Produção de Polihidroxialcanoatos por Fermentação no Estado Sólido. (2004). Universidade Federal de Rio de Janeiro. Programa de Ingeniería Química. Departamento de Bioquímica, Instituto de Macromoléculas.

Papaneophytou, C., Kyriakidis, D. Optimization of Polyhydroxyalkanoates Production from *Thermus thermophilus* HB8 Using Response Surface Methodology. EN: Journal of Polymer Environmental. Vol. 20 (2012); p. 760 – 773.

Reddy, C.S.K. ; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. EN: Journal of Bioresource Technology. Vol. 87 (2003); p.137–146.

Riedel, S; Bader, J.; Brigham,C., Budde, C. ; Mohd Yusof, Z.; Rha, C. ; Sinskey, A. Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in High Cell Density Palm Oil Fermentations. EN: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 109 (2010); p.74-83.

Salehizadeh,H. and Van Loosdrecht M.C.M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. EN: Journal of Biotechnology Advances, Vol. 22 (2004); p. 261–279.

Souza Rocha Jr., Paulo Roberto de.(2005). Etudo das condições de cultivo para a produção de PHAS por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado apresentada como parte integrante do exame de Qualificação ao Título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

Sudesh, K.; Abe, H and Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. EN: Progress in Polymer Science, Vol. 25 (2000); p.1503-1555.

Sudesh, Kumar; Bhubalan, Kesaven; Chuah , Jo-Ann; Kek, Yik-Kang; Kamilah, Hanisah; Sridewi, Nanthini and Lee, Yan-Fen. Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. EN: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 89 (2011); p.1373–1386.

TECNOPARQUE COLOMBIA. Línea de biotecnología industrial. EN: <http://biotecnologia1tecnoparque.blogspot.com/>

Vasco, Javier Mauricio. Producción de polihidroxiálcanoatos a partir de residuos agroindustriales. (2010). Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería_Ingeniería Química. Grupo de investigación de procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales

Verlinden, R.; Hill, D.; Kenward, M.; Williams, C.; Piotrowska-Seget, Z.; Radecka, I. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator* . EN: AMG Express. Vol. 11 (2011); p. 1-8

Villano, Marianna; Beccari, Mario; Dionisi, Davide; Lampis, Silvia; Miccheli, Alfredo; Vallini, Giovanni and Majone, Mauro. Effect of pH on the production of

bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. EN: Process Biochemistry. Vol. 45 (2010); p. 714–723.

Zhiqiang, C.; Yunbei, L.; Wen, Q.; Zhang, H. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by *Gamma proteobacterium* WD-3 from volatile fatty acids. EN: Chemosphere. Vol. 82 (2011); p.1209 – 1213.

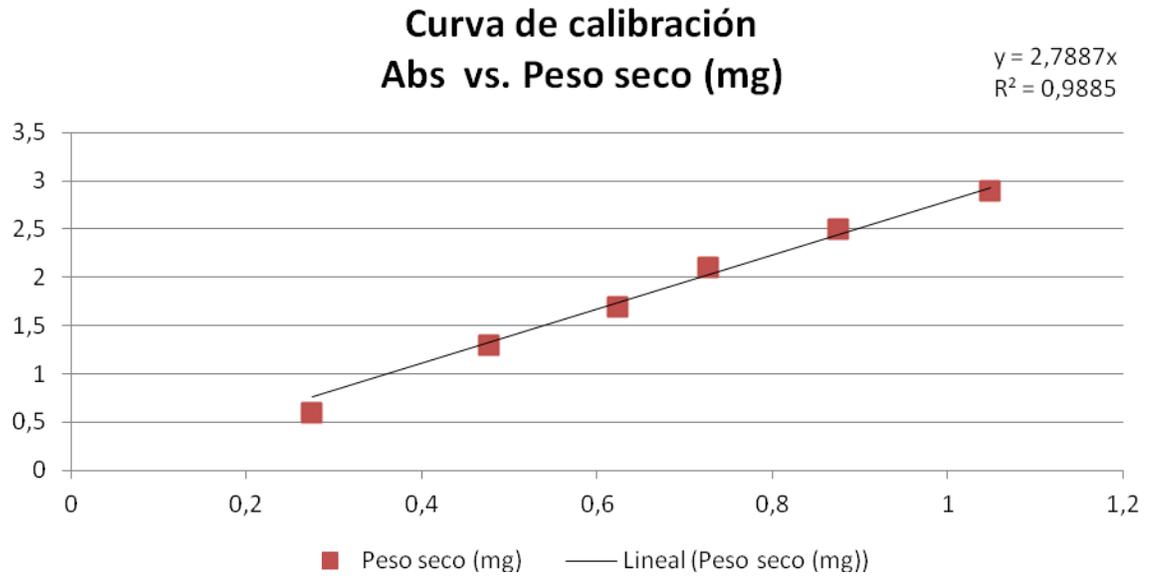
ANEXO A.

Condiciones de operación del equipo GC-FID para la determinación de ácido 3 hidroxibutírico.

Cromatógrafo	Agilent Technologies 5975C
Columna	60mt x 250 μ m x 0,2 μ m
Inyector	Automático serie HP 7683
Temperatura de inyección	250°C
Rango de temperatura	100°C – 150°C
Gradiente de temperatura	5°C/min
Cantidad de muestra	1 μ l
Modo	Splitless
Temperatura del detector	250°C

ANEXO C

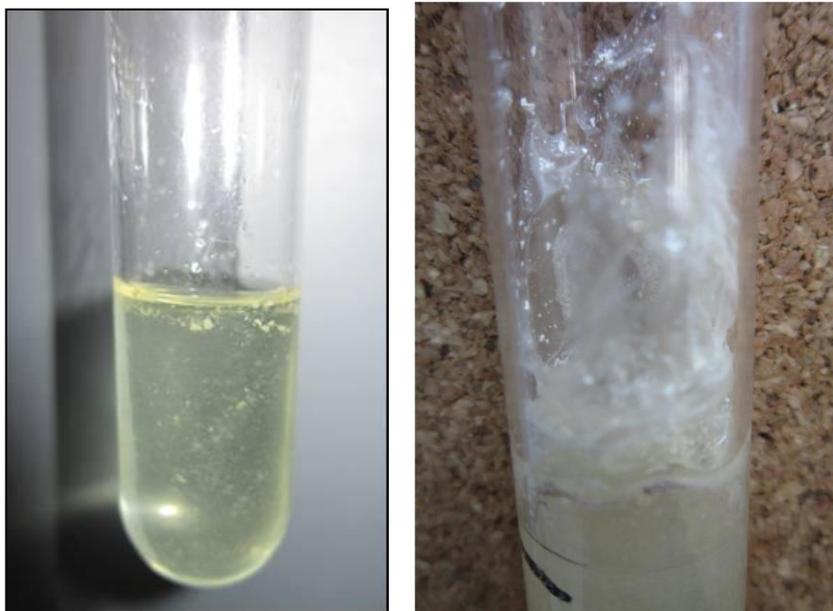
Curva de calibración para la ATCCC 17699 *Wautersia eutropha*. Absorbancia vs. Peso seco



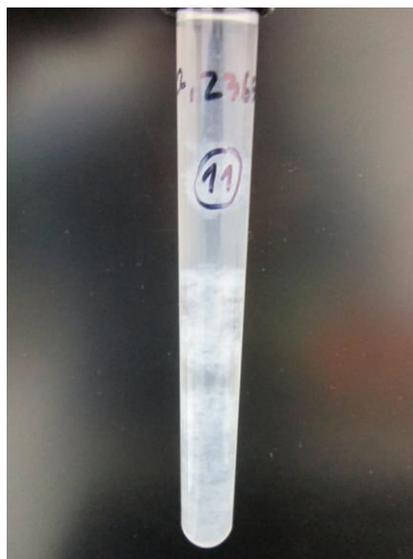
ANEXO D.
Registro fotográfico



Aspecto del residuo sólido de la trampa de grasa



Extractos del polímero en cloroformo



Polímero en precipitación con metanol frío.



Aspecto del polímero seco