

**FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL
UTILIZANDO UNA ACTINOBACTERIA NATIVA**

**DECXY NAYIBE JAIMES PADILLA
JORGE ALBERTO VILLABONA VARGAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL
UTILIZANDO UNA ACTINOBACTERIA NATIVA**

**DECXY NAYIBE JAIMES PADILLA
JORGE ALBERTO VILLABONA VARGAS**

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Ingeniero Químico

Directora:

**VIVIANA SÁNCHEZ TORRES
Ph.D. en Ingeniería Química**

Codirector:

**GUSTAVO EMILIO RAMÍREZ CABALLERO
Ph.D. en Ingeniería Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por darme la vida y una familia maravillosa. A mis padres por ser los pilares fundamentales de mi vida, por su gran amor, apoyo y confianza. A mis hermanos por siempre estar ahí y ser mis modelos a seguir y a mis amigos que han estado acompañándome y brindando su cariño a lo largo de estos años.

Decxy Nayibe Jaimes Padilla

Dedico esta tesis primeramente a Dios por quien todo es posible. A mi madre Edilia Vargas Merchán, promotora de todo lo que he logrado hasta el momento, que con su esfuerzo y sacrificio hizo posible que hoy esté donde estoy. A mi familia y amigos que durante todo este tiempo me han brindado su apoyo incondicional.

Jorge Alberto Villabona Vargas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y en especial a la Escuela de Ingeniería Química por ser el ente formador de nuestros conocimientos.

Al grupo de Investigación CINBIN y al grupo de Investigación en Polímeros por brindarnos los espacios y materiales para realizar esta investigación.

A nuestra directora la Dr. Viviana Sánchez por su gran dedicación, recomendaciones, asesoría y ser una guía en el proceso.

A la Bióloga Oriana Danuta Serna por su apoyo incondicional y brindarnos parte de sus conocimientos.

A la Ingeniera Química Jenny Carolina Osma por su paciencia, amabilidad, tiempo y disposición siempre que la necesitamos.

Y a cada una de las personas que han estado presentes brindando su apoyo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO	18
1.1 ESTRUCTURA INTRACELULAR DE LAS BACTERIAS	18
1.2 ACTINOBACTERIAS	19
1.3 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	20
1.4 POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL	23
2. METODOLOGÍA	26
2.1 SELECCIÓN DE LA CEPA	26
2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS	27
2.2.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).	27
2.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	27
2.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO	28
2.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES INFLUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE PHAS	28
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	30
3.1 SELECCIÓN DE LA CEPA	30
3.1.1 Análisis Termogravimétrico	30
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS	33
3.2.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).	33

3.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	35
3.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO	36
3.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES INFLUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE PHAS	39
4. CONCLUSIONES	46
5. RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Biosíntesis de PHAs	21
Figura 2. Estructura general de los PHA, y ejemplos de su nomenclatura	23
Figura 3. Pérdida de peso de una muestra de P3HB comercial	30
Figura 4. Pérdida de peso de una muestra de ACPG13 en MSMGC	31
Figura 5. Producción de polímero en base seca de cada cepa utilizando glicerol crudo y puro como fuente de carbono	32
Figura 6. Cromatograma de una muestra de ACPG13 en MSMGC luego de 5 días de cultivo	34
Figura 7. Cromatograma de una muestra de P3HB comercial	35
Figura 8. Espectrofotometría infrarroja de una muestra de ACPG13	36
Figura 9. Biomasa seca en miligramos / ml de cultivo a través del tiempo de ACPG13 en MSMGC	37
Figura 10. Producción de polímero en base seca a través del tiempo para ACPG13 en MSMGC	37
Figura 11. Producción de polímero por ml de cultivo a través del tiempo para ACPG13 en MSMGC	38
Figura 12. Biomasa seca / ml de cultivo de cada uno de los experimentos del diseño ortogonal	40
Figura 13. Producción de polímero en base seca de cada experimento	41
Figura 14. Producción de Polímero/ mL de cultivo de cada experimento.	42
Figura 15. Pérdida de peso de una muestra de P3HB comercial y Ácido oleico	45

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño de experimentos Ortogonal	28
Tabla 2. Acumulación intracelular de polímero calculada para la cepa ACPG13 en MSMGC usando TGA.	32
Tabla 3. ANOVA para el crecimiento celular Biomasa seca/mL de cultivo	40
Tabla 4. ANOVA para la acumulación intracelular de polímero	41
Tabla 5. ANOVA para la producción de polímero /mL de cultivo	42
Tabla 6. Influencia de las variables estudiadas en la producción de biomasa, acumulación de polímero y producción de polímero	43

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Medios de cultivo	53
Anexo B. Propiedades del Glicerol Crudo	54
Anexo C. Análisis Termogravimétrico	55
Anexo D. Protocolo de Metanólisis	56
Anexo E. Programa usado en GC-MS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

LB	Medio Luria Bertani
MSMGC	Medio mínimo de sales con glicerol crudo
MSMGP	Medio mínimo de sales con glicerol puro
PHAs	Polihidroxicanoatos
P3HB	Poli-3-hidroxi-butirato
DO	Densidad óptica
ACPG13	Cepa aislada de compostaje #13
ACPG10	Cepa aislada de compostaje #10
MFSR3 C	epa aislada de aguas de las lagunas de tratamiento de mucílago #3

RESUMEN

TÍTULO: FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL UTILIZANDO UNA ACTINOBACTERIA NATIVA*

AUTORES: Decxy Nayibe Jaimes Padilla
Jorge Alberto Villabona Vargas **

PALABRAS CLAVE: Actinobacterias, polihidroxicanoatos, acumulación intracelular, TGA.

DESCRIPCIÓN:

Los Polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables producidos por una gran variedad de microorganismos, como reserva de carbono. La obtención de PHAs a partir de glicerol residual, se ha venido estudiando para darle un uso a este subproducto del biodiesel y contribuir a disminuir el impacto negativo de los plásticos en el ambiente. En la presente investigación se estudiaron tres actinobacterias nativas, productoras potenciales de Poli-3-hidroxicbutirato (P3HB) a partir de glicerol, las cuales se sometieron a pruebas de Análisis Termogravimétrico (TGA) para seleccionar la cepa con mayor producción, en este análisis se encontró que la cepa ACPG13 fue quien tuvo una mayor acumulación con un 30,59% de polímero en base seca y con esta se realizaron pruebas de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para corroborar la presencia del biopolímero. Además, se realizó un diseño de experimentos ortogonal para evaluar el efecto en la acumulación de polímero, el crecimiento y el rendimiento de polímero de las variables: tiempo; concentración de glicerol, nitrógeno, fósforo, elementos traza, pH y la densidad óptica (DO) inicial. Para cuantificar el polímero se usó el TGA, lográndose determinar que la cantidad de glicerol, elementos trazas y el DO inicial influyen en la acumulación de polímero y de otros compuestos intracelulares ya que pruebas de GC-MS mostraron que se produce ácido hexadecanoico y octadecanoico, al interior de la célula.

* Proyecto de grado

** Facultad de Físicoquímicas Escuela de Ingeniería Química Directora: Ph.D. Viviana Sánchez Torres Codirector: Ph.D. Gustavo E. Ramirez Caballero

ABSTRACT

TITLE: FACTORS THAT INFLUENCE THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES FROM RESIDUAL GLYCEROL USING A NATIVE ACTINOBACTERIA.*

AUTHORS: Decxy Nayibe Jaimes Padilla
Jorge Alberto Villabona Vargas **

KEYWORDS: Actinobacterias, polyhydroxyalkanoates, intracellular acumulation, Thermogravimetric Analysis (TGA).

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polymers produced by a variety of microorganisms as a carbon reserve. PHAs production from residual glycerol has been studied to use this byproduct of biodiesel while contributing to reduce the negative impact of plastics on the environment. In this work 3 native actinomycetes strains were studied as a potential producers of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) from glycerol, which were tested by Thermogravimetric Analysis (TGA) to select the strain with more production. This analysis indicated that the strain ACPG13 had the highest accumulation with 30.59% polymer on a dry basis. Using this strain it was performed Infrared Spectroscopy Fourier Transform and gas chromatography-mass spectrometry to corroborate the presence of the biopolymer. In addition, an orthogonal experimental design was performed to evaluate the effect on the accumulation of polymer, growth and polymer yield of the variables: time; concentration of glycerol, nitrogen, phosphorus, and trace elements; pH; and initial optical density (DO). TGA was used to quantify the polymer. The amount of glycerol, trace elements and initial DO influence the accumulation of polymer and other intracellular compounds as GC-MS test showed that hexadecanoic acid and octadecanoic acid were produced inside the cell. amount of glycerol, trace elements and initial DO influence the accumulation of polymer and other intracellular compounds as GC-MS test showed that hexadecanoic acid and octadecanoic acid were produced inside the cell.

* Project of grade

** Faculty of Engineering Physicochemical School Engineering Chemical Directora: Ph.D. Viviana Sánchez Torres Codirector: Ph.D. Gustavo E. Ramirez Caballero

INTRODUCCIÓN

El plástico es la tercera aplicación más extendida del petróleo después de la energía y el transporte. Los plásticos se destacan por su resistencia a la degradación, por lo que se usan en la manufactura de una amplia variedad de productos, los cuales resultan imprescindibles para el estilo de vida actual¹. Estos al no ser biodegradables se convierten en una fuente significativa de contaminación debido a la acumulación de grandes cantidades de este material. A esto se le suma que en su proceso de producción hay altos consumos de energía y emisiones de CO_2 a la atmósfera².

Una alternativa para disminuir el impacto ambiental negativo de los plásticos convencionales derivados del petróleo es reemplazarlos por polímeros de origen biológico, tales como derivados de almidón, polivinil alcohol, ácido poliláctico, polímeros celulósicos, y polihidroxicanoatos (PHAs)³. Los PHAs son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunas bacterias, arqueas y microalgas acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía⁴; son plásticos biodegradables que pueden usarse como sustitutos o complementos a los plásticos tradicionales para mejorar su biodegradabilidad⁵.

¹ KHANNA S. y SRIVASTAVA A. K., «Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates,» *Process Biochemistry*, pp. 607-619, 2005.

² VASCO J. M. «Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales.» Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Manizales, Caldas, Colombia.

³ GONZÁLEZ IGUAVITA, M. P. «Obtención de poli-3-hidroxibutirato (p3hb) a partir de la Extracción de pectina del mucilago de café con *streptomyces* sp. Aislados de suelos de Boyacá (Colombia)» (Tesis Doctoral). 2014

⁴ GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. «Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano». *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 29, No. 1, pp.77-115. 2013

⁵ DIONISI, D., PETRANGELI-PAPINI, M., BECCARI, M., MARÍN, F. C., MAJONE, M., & CARUCCI, G. «Los polihidroxicanoatos: Plásticos biodegradables producidos por microorganismos.» *Ingeniería química*, No. 414, pp.244-251. 2004

En Colombia una actividad que se ha fortalecido es el cultivo de la palma de aceite para ser usada en la producción de biodiesel. El incremento en la producción de biodiesel deja a su paso una gran cantidad de glicerol residual, por tal razón se busca dar un uso a este subproducto al ser utilizarlo como materia prima para la producción de PHAs.

Con el presente trabajo se busca producir polihidroxialcanoatos a partir de glicerol residual como sustrato, usando tres cepas nativas de actinobacterias, seleccionar la cepa con mayor potencial de producción y determinar las variables influyentes en la obtención del biopolímero.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ESTRUCTURA INTRACELULAR DE LAS BACTERIAS

Las bacterias son células procariotas ya que no tienen un núcleo definido. Tienen una membrana celular por medio de la cual interactúan con el medio externo. Al interior de la célula se encuentran: ribosomas, proteínas, material genético, enzimas y otras moléculas de menor tamaño⁶. La célula procariota también puede almacenar en su interior otros compartimientos que se pueden clasificar en tres categorías: estructuras para la maquinaria metabólica, estructuras que contribuyen a la movilidad celular y estructuras para la reserva metabólica. Dentro de esta última categoría, podemos encontrar gránulos de polifosfatos, glóbulos de azufre, reservas de glucógeno, gránulos de PHAs, y gránulos de triacilgliceroles y ésteres cerosos⁷.

De acuerdo a las condiciones del medio en el cual crecen las células, el sustrato usado y los nutrientes disponibles, las bacterias pueden llevar a cabo una u otra ruta metabólica, dando lugar a la síntesis de productos y metabolitos intermediarios. Según la ruta metabólica seguida se producen las estructuras intracelulares mencionadas anteriormente.

⁶ GUTIÉRREZ F. y ALBÁNCHÉZ I., *Biología: la célula*, Firms Press, 2010, pp. 14-17.

⁷ SHIVELY J. M., CANNON G. C., HEINHORST S., FUERST J. A., BRYANT D. A., GANTT E., MAUPIN-FARLOW J. A., SCHULER D., PFEIFER F., D. R, DAHL C., PRESS J., STEINBUCHER A. y FEDERICI B. A., «Intracellular structures of prokaryotes: Inclusions, compartments and assemblages» de *Encyclopedia of Microbiology*, tercera ed., M. Schaechter, Ed., oxford, 2009, pp. 404-424

1.2 ACTINOBACTERIAS

Los actinomicetos son un grupo heterogéneo de microorganismos filamentosos los cuales crecen en forma de red denominada micelio. La mayoría de los actinomicetos forman esporas y se agrupan progresivamente⁸. La mayor parte de estas son respiradores aeróbicos estrictos pese a unas cuantas que son fermentadoras. Se pueden aislar de una amplia variedad de hábitats⁹ puesto que resultan ser abundantes en suelos¹⁰, sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos, aguas dulces y marinas¹¹.

Estos microorganismos son importantes saprófitos de plantas, capaces de degradar moléculas complejas y sustancias recalcitrantes como celulosa, lignocelulosa, xilano y lignina, adicionalmente juegan un importante papel en el proceso de descomposición de material orgánico, debido a sus enzimas líticas¹².

Adicionalmente presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal¹³. Se ha evaluado que producen

⁸ GONZÁLEZ IGUAVITA, M. P. Op. Cit.

⁹ STANIER R. Y., INGRAHAM J. L., WHEELIS M. L. y PAINTER P. R., «Microbiología», Reverte, 1996.

¹⁰ BEN-OMAR N., MERROUN M.L., ARIAS J.M. y GONZALEZ M.T., «Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and Myxococcus xanthus biomass», Chemosphere, vol. 35, No. 10, pp. 2217-283, 1997.

¹¹ LEIVA, S., YÁÑEZ, M., ZAROR, L., RODRÍGUEZ, H., & GARCÍA-QUINTANA, H. «Actividad antimicrobiana de Actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile». Revista médica de Chile, vol. 132, No. 2, pp.151-159. 2004

¹² FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. «Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos», Revista Peruana de Biología, Vol. 16, pp 1-2, 2009.

¹³ EZZIYYANI M., PÉREZ C., REQUENA M., AHMED A. y CANDELA M., «Evaluación del biocontrol de phytophthora capsici en pimiento (Capsicum annuum L.) por tratamiento con Burkholderia cepacia», Anales de Biología, vol. 36, pp. 61-68, 2004.

compuestos de uso biotecnológico como antibióticos, enzimas industriales¹⁴, agentes antitumorales¹⁵, agentes inmunosupresores¹⁶.

Normalmente los PHAs se producen bajo carencia de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo, magnesio y sulfuros. Se han reportado actinomicetos productores de PHA, en estas las condiciones limitantes de nitrógeno no favorecen el crecimiento y la producción de PHA. Por esta razón estos microorganismos requieren un manejo diferente de los factores nutricionales con respecto a los establecidos para la producción de PHA en otras bacterias¹⁷.

1.3 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Los PHAs son polímeros de hidroxialcanoatos que se acumulan como material de reserva de carbono y energía en diferentes microorganismos, normalmente bajo condiciones de carencia nutricional de elementos como nitrógeno, fósforo, sulfuro o magnesio y en presencia de un exceso de fuente de carbono¹⁸.

Estos constituyen una familia de polímeros biodegradables, por lo que contribuyen al desarrollo sostenible al ser originados por recursos renovables. Por su origen de fuentes renovables y ser biodegradables, son llamados “polímeros doblemente verdes”¹⁹. El P3HB es el primer miembro conocido de esta familia, tiene propiedades mecánicas semejantes al polipropileno con la ventaja agregada de la

¹⁴ BENTLEY, R.. «Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs». Perspectives in biology and medicine, Vol. 40, No. 3, pp. 364-394. 1997.

¹⁵ CRAGG, G. M., & NEWMAN, D. J. «Plants as a source of anti-cancer agents». Journal of ethnopharmacology, Vol. 100 No.1, pp. 72-79. 2005.

¹⁶ MANN, J. «Natural products as immunosuppressive agents». Natural Product Reports. Vol. 18 pp. 417-430. 2001.

¹⁷ FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. Op. Cit.

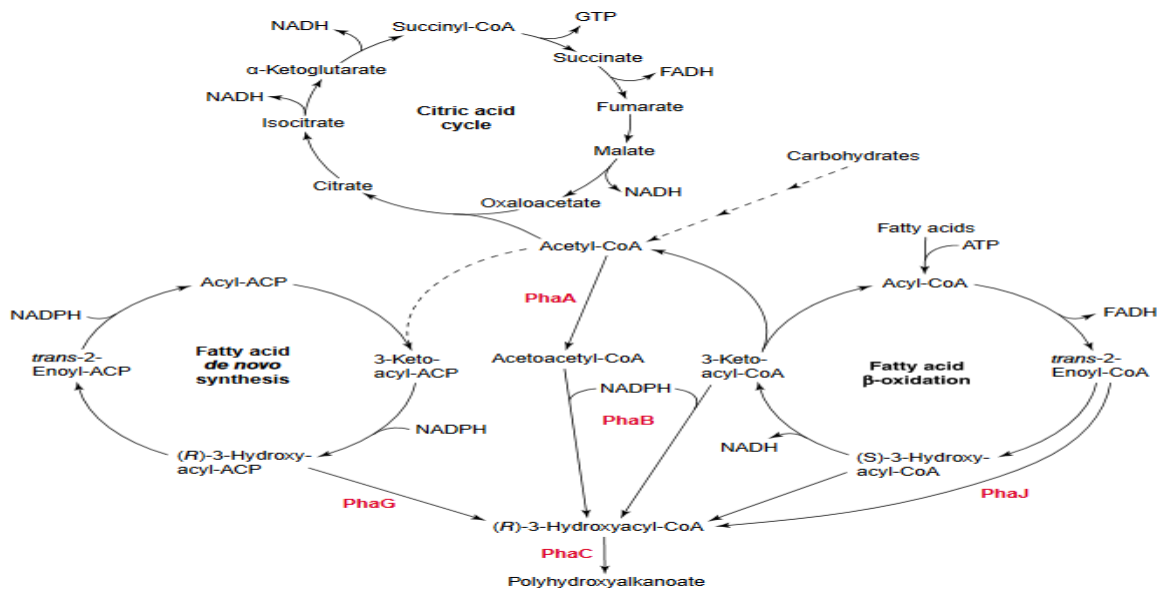
¹⁸ Ibíd.

¹⁹ DOI, Y. «Microbial polyesters». VCH Publishers. 1990.

biodegradabilidad y es una alternativa que puede contribuir a disminuir el impacto de los desechos de plásticos en el ambiente.

La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster²⁰. Existen varias rutas metabólicas que conducen la formación de PHAs, que se puede resumir como lo muestra la Figura 1, la ruta para la producción de PHAs compete y/o depende de otras vías importantes como: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la degradación de ácidos grasos(β -oxidación), y la biosíntesis de ácidos grasos²¹.

Figura 1. Biosíntesis de PHAs



Fuente: ALDOR, I. S., & KEASLING, J. D. «Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates». Current Opinion in Biotechnology, Vol. 14, No. 5, pp. 475-483. 2003.

²⁰ KHANNA S. y SRIVASTAVA A. K., Op. Cit.

²¹ ALDOR, I. S., & KEASLING, J. D. «Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates». Current Opinion in Biotechnology, Vol. 14, No. 5, pp. 475-483. 2003.

Abreviaturas: PhaA, 3-cetotiolasa; PhaB, (R)-3-cetoacil-CoA reductasa (para la biosíntesis de PHB, la enzima es acetoacetyl-CoA reductasa); PhaC, PHA sintasa o polimerasa; PhaG, (R)-3-hidroxiacil ACP:CoA transacilasa; PhaJ, (R)- específica enoil-CoA hidratasa. PhaC, específica para monómeros enantioméricos en la configuración [R]²²

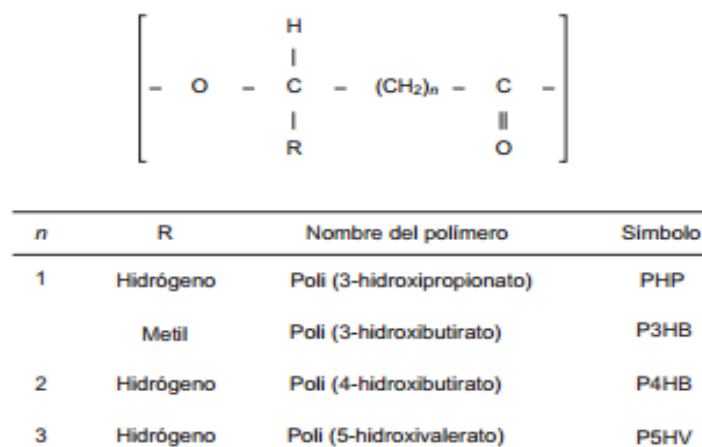
Respecto a su estructura monomérica, los PHAs se pueden clasificar en varios tipos según la longitud de la cadena de los ácidos hidroxialcanoicos de los que están constituidos (Figura 2). De esta manera, se definen como PHA de cadena corta (PHA-scl) aquellos polímeros compuestos por unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono, y como PHA de cadena media (PHA-mcl) a los que se componen por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono. Sin embargo, también existen PHA mixtos, es decir que se componen de monómeros tanto de cadena corta como de cadena media²³. Las propiedades de los PHAs como la hidrofobicidad, el punto de fusión, la temperatura de transición vítrea, y el grado de cristalinidad varían ampliamente de acuerdo a la longitud de la cadena del monómero²⁴.

²² Ibíd.

²³ GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. Op. Cit.

²⁴ GONZÁLEZ IGUAVITA, M. P. Op. Cit.

Figura 2. Estructura general de los PHA, y ejemplos de su nomenclatura



Fuente: GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. «Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano». Revista Internacional de Contaminación Ambiental, vol. 29, No. 1, pp.77-115. 2013

Los PHAs poseen aplicaciones en diversas industrias tales como: industria de empaques, fotografía e imprenta, bloque de copolimerización, proceso de plásticos, industrial textil, biomaterial para implantes médicos, administración de fármacos específicos, en cosméticos y también pueden ser utilizados como materiales de partida para la síntesis de antibióticos y otros productos químicos (fertilizantes, productos farmacéuticos)²⁵

1.4 POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL RESIDUAL

En Colombia una actividad que se ha fortalecido es el cultivo de la palma de aceite para ser usada en la producción de biodiesel. Según cifras de Fedebiocombustibles en 2015 se produjeron 513.354 toneladas de biodiesel de palma de aceite²⁶ y

²⁵ GÓMEZ CARDOZO, J. R. «Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos» (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Medellín).

²⁶ FEDEBIOCOMBUSTIBLES Indicador producción Biodiesel de Palma de aceite, 2015; [en línea] Disponible en: http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm

sabiendo que por medio de la transesterificación se producen aproximadamente 10 kg de glicerol por cada 100 kg de biodiesel obtenido, la producción de glicerol residual ronda las 50000 toneladas para este año; una de las posibles aplicaciones para el glicerol residual es su utilización como fuente de energía para el crecimiento de microorganismos en la industria microbiológica²⁷.

En el estudio de la producción de PHAs se ha evidenciado el uso de glicerol residual como sustrato ya que es una fuente de carbono de bajo costo. En algunas de las bacterias que emplean el glicerol como fuente de carbono y energía, el glicerol se metaboliza a través de una serie de etapas que comprenden: el transporte del glicerol al interior celular, su transformación en glicerol 3-P (G3P) y su posterior conversión en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), compuesto intermediario de la glicólisis²⁸.

En el grupo de investigación CINBIN se realizó un trabajo de grado donde se identificaron cepas de Actinobacterias posibles productoras de PHAs usando glicerol crudo como fuente de carbono. Se tomaron 24 cepas de las cuales la mitad provenía de aguas de lagunas de tratamiento de mucilago (MFSR) y las restantes fueron aisladas de compostaje (ACPG). Las bacterias crecieron en cajas de petri con medio mínimo de sales con glicerol crudo (MSMGC) con una concentración de 1µg/ml de Rojo de Nilo, este es un tinte fluorescente que permite detectar la acumulación de PHAs intracelulares. Las bacterias fueron expuestas a radiación ultravioleta lo que permitía observar su fluorescencia, de esta manera se fueron seleccionando quienes poseían una fluorescencia similar a un control positivo (*Rhizobium meliloti*). Esta prueba se repitió progresivamente hasta

²⁷ MAYORGA, M. A., & NARANJO, W. A. M. «Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1, 3-propanodiol (1, 3-pd) ». TECCIENCIA, Vol. 6, No. 12, pp. 80-93. 2012.

²⁸ FERNÁNDEZ ESCAPA, I., CERRO, C. D., GARCIA, J. L., & PRIETO, M. A.. «Sistema para mejorar la producción de polihidroxialcanoatos (bioplástico) por fermentación a partir de glicerol utilizando una cepa de pseudomonas putida modificada genéticamente».2013

obtener 3 posibles productoras de poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) las cuales fueron ACPG10, ACPG13 y MFSR3²⁹.

²⁹ GIRALDO BAREÑO YY, ROMERO GOMEZ DA, SANCHEZ TORRES V, RAMÍREZ CABALLERO GE. «Selección de cepas de actinomicetos para la producción de polihidroxi-alcanoatos». Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, 2015.

2. METODOLOGÍA

2.1 SELECCIÓN DE LA CEPA

Del cepario del grupo de investigación CINBIN se tomaron tres cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3, las cuales son posibles productoras de PHAs³⁰. Para encontrar la cepa con mejor producción se realizaron precultivos con cada una de las cepas en 25 ml de medio LB (ANEXO A) durante un día y se determinó la densidad óptica (DO) final a 600 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer, USA). El precultivo se utilizó para inocular con DO de 0,1 en 50 ml de medio mínimo de sales con glicerol puro como fuente de carbono (MSMGP) durante 5 días, a temperatura ambiente y agitación de 180 rpm (ANEXO A).

Se repitió el proceso anterior usando medio mínimo de sales con glicerol crudo como fuente de carbono (MSMGC) cuyos componentes y cantidades se describen en el ANEXO A. El glicerol crudo fue suministrado por la empresa Oleoflores S.A y sus propiedades se especifican en el ANEXO B. Los cultivos se centrifugaron y los pellets con la masa celular se utilizaron para los análisis siguientes.

2.1.1 Análisis Termogravimétrico (TGA). Se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Debido a que el PHA es un producto intracelular, la técnica de TGA puede cuantificar la cantidad de biopolímero acumulado en las células, conociendo la temperatura de descomposición del mismo (210°C) sin necesidad de una extracción previa³¹. Este análisis fue llevado a cabo en la Balanza Termogravimétrica Discovery TGA 1-0207 el programa utilizado se describe en el

³⁰ *Ibíd.*

³¹ *Ibíd.*

ANEXO C. Por medio de este análisis y tomando como parámetro la acumulación de polímero, se seleccionó la cepa que presentaba mayor producción en base seca.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS

2.2.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Es una técnica que permite la separación e identificación de mezclas complejas. Para realizar este análisis se requiere de la transformación del PHA en los ésteres metílicos del monómero por un proceso de metanólisis. Este procedimiento se describe en el ANEXO D. La cepa seleccionada por medio del TGA, fue analizada por el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado a un espectrofotómetro de masas Agilent Technologies 5975C VL MSD con detector de triple eje, siguiendo el método planteado por Y. González et. al³² detallado en el ANEXO E.

2.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia infrarroja fue utilizada con el propósito de captar vibraciones inherentes 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 ACPG13 luego de 5 días de cultivo en MSMGC y se dejó secar durante un día en la incubadora a 37°C.

³² GONZÁLEZ Y., MEZA J.C., GONZÁLEZ O. y CÓRDOVA J.A, «Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano», Revista Internacional de Contaminación Ambiental, vol. 29, No. 1, pp. 77-115, 2013.

2.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO

Para determinar el comportamiento de la cepa seleccionada a través del tiempo, se dejó en crecimiento durante 13 días en MSMGC y se tomaron muestras de 3 ml de cultivo en los días 1, 3, 7 y 13, las cuales fueron centrifugadas a 10000 g por dos minutos, el pellet obtenido fue sometido a TGA para determinar la cantidad de biopolímero; paralelo a esto se midió la biomasa seca/ ml de cultivo, para cada uno de los días de muestreo para tener un indicador de crecimiento de la cepa, también se le hizo seguimiento al crecimiento en la fase exponencial, para hallar la velocidad de crecimiento de la cepa. Las pruebas se hicieron por duplicado.

2.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES INFLUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE PHAS

Con la cepa seleccionada, se variaron las condiciones de cultivo para determinar la influencia de éstas en la producción del polímero con el objetivo de determinar el comportamiento de la cepa, bajo carencia o exceso de nutrientes. Para ello la bacteria se cultivó en MSMGC variando la concentración de glicerol, nitrógeno, fosfatos, elementos traza (micronutrientes) así como el tiempo, pH y la DO inicial; utilizando el diseño de experimentos ortogonal que se muestra en la Tabla 1. (Cada experimento se hizo al menos por duplicado).

Tabla 1. Diseño de experimentos Ortogonal

Experimento N°	Glicerol (g/l)	Tiempo (días)	NH ₄ Cl (g/l)	Concentración fosfatos	E. traza (ml)	pH	DO
1	10	1	0,1	Normal	1	6,5	0,1
2	10	1	0,1	10 veces inferior	0	7,5	1
3	10	8	1	Normal	1	7,5	1
4	10	8	1	10 veces inferior	0	6,5	0,1

Experimento N°	Glicerol (g/l)	Tiempo (días)	NH ₄ Cl (g/l)	Concentración fosfatos	E. traza (ml)	pH	DO
5	80	1	1	Normal	0	6,5	1
6	80	1	1	10 veces inferior	1	7,5	0,1
7	80	8	0,1	Normal	0	7,5	0,1
8	80	8	0,1	10 veces inferior	1	6,5	1

Para cada experimento, se tomaron muestras de 6 ml de cultivo las cuales fueron centrifugadas a 10000 g por 2 min. Con los pellets obtenidos se realizó TGA para determinar la cantidad de biopolímero contenido. Se llevó control del peso de masa celular de la muestra y se relacionó con los resultados obtenidos en el TGA para calcular la producción de polímero por mililitro de cultivo. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el software Develve.

Terminado el diseño de experimentos, se tomó una muestra de masa celular seca obtenida en las condiciones de cultivo que indicaron la mayor acumulación de polímero según los resultados del TGA. Para identificar el tipo de polímero se realizó un análisis por GC-MS siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.1. Como control negativo se utilizó *E. coli* JM109, (que no produce PHAs); a las mismas condiciones del experimento donde se obtuvieron los mejores resultados y se le realizó análisis por TGA y GC-MS.

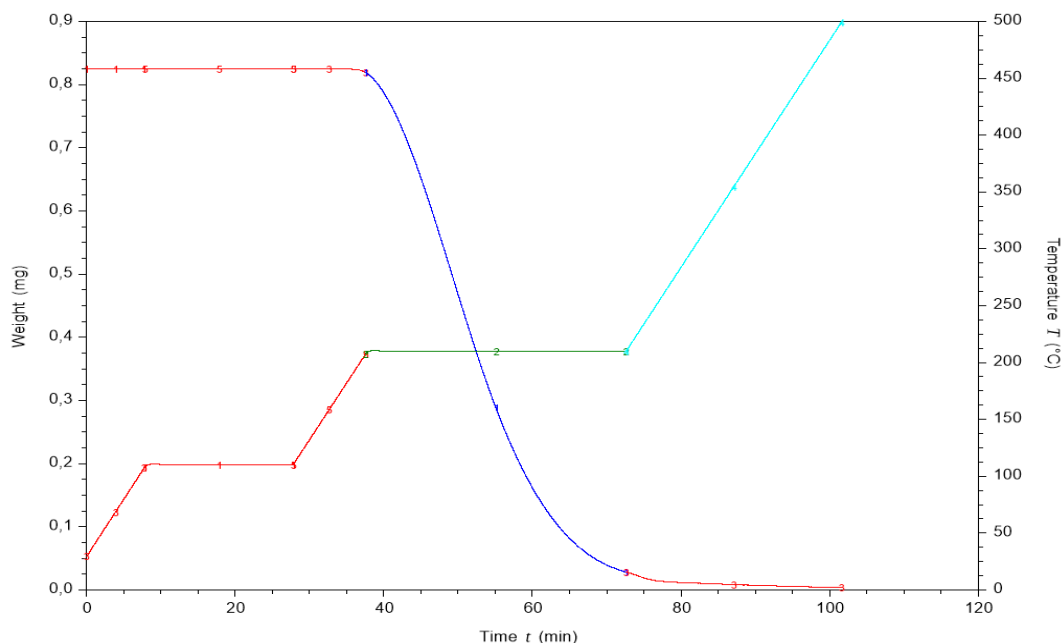
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 SELECCIÓN DE LA CEPA

Se tomaron las cepas ACPG10, ACPG13 y MFSR3 para las pruebas de selección usando glicerol crudo y puro en cultivos de 5 días y se seleccionó la mejor cepa según los resultados obtenidos en TGA.

3.1.1 Análisis Termogravimétrico. En la Figura 3 se puede observar la pérdida de peso del P3HB comercial cuando es sometido a TGA pudiéndose corroborar que este se degrada a 210°C como se menciona en la literatura y así tener un punto de comparación con los resultados de las muestras de cada una de las cepas.

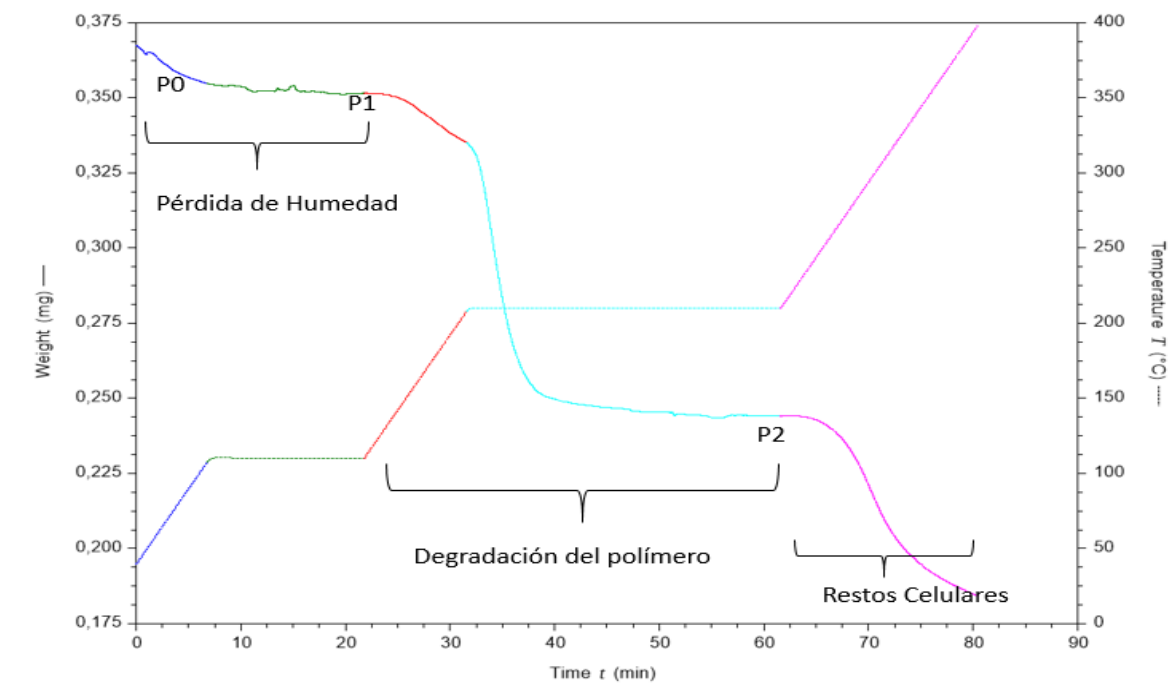
Figura 3. Pérdida de peso de una muestra de P3HB comercial



Fuente: Base de datos del grupo de Investigación de Polímeros.

En la Figura 4, se puede observar los resultados del TGA para la cepa ACPG13 en MSMGC. La figura muestra la pérdida de peso de una muestra de masa celular a través del tiempo.

Figura 4. Pérdida de peso de una muestra de ACPG13 en MSMGC



Entre los puntos P0 y P1 hay una pérdida de peso debido a la humedad presente en la muestra, la diferencia entre los puntos P1 y P2 corresponde a la degradación del polímero, el restante de la curva pertenece a la pérdida de peso de otros componentes celulares como la membrana. El proceso de cálculo se explica tomando como modelo la cepa ACPG13 (Tabla 2).

Tabla 2. Acumulación intracelular de polímero calculada para la cepa ACPG13 en MSMGC usando TGA.

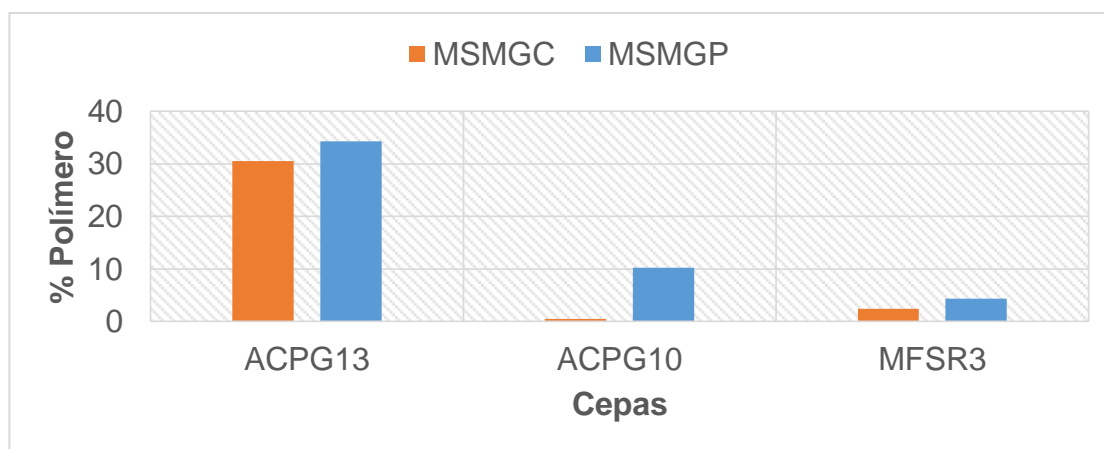
	Tiempo (min)	Peso (mg)	Temperatura (°C)
P1	21,7867	0,3516	110
P2	61,5783	0,244	210

$$Y_{p/x} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \quad Y_{p/x} = \frac{0,3516 - 0,244}{0,3516} = 0,3059 \text{ mg polímero / mg muestra seca}$$

El porcentaje de polímero obtenido en base seca es del 30,59%

De forma similar en medio MSMGP el porcentaje de acumulación intracelular de polímero en base seca fue de 34,34% para ACPG13. Para las muestras de ACPG10 y MFSR3 se realizó el mismo procedimiento. En la Figura 5 se comparan los resultados obtenidos para las 3 cepas. La cepa que presentó una mayor producción de polímero en base seca fue la ACPG 13, y por lo tanto se eligió como cepa de trabajo. Esta cepa pertenece al género *Arthrobacter sp*³³.

Figura 5. Producción de polímero en base seca de cada cepa utilizando glicerol crudo y puro como fuente de carbono



³³ PEÑA GAMBOA, A. C. «Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico». Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander 2015

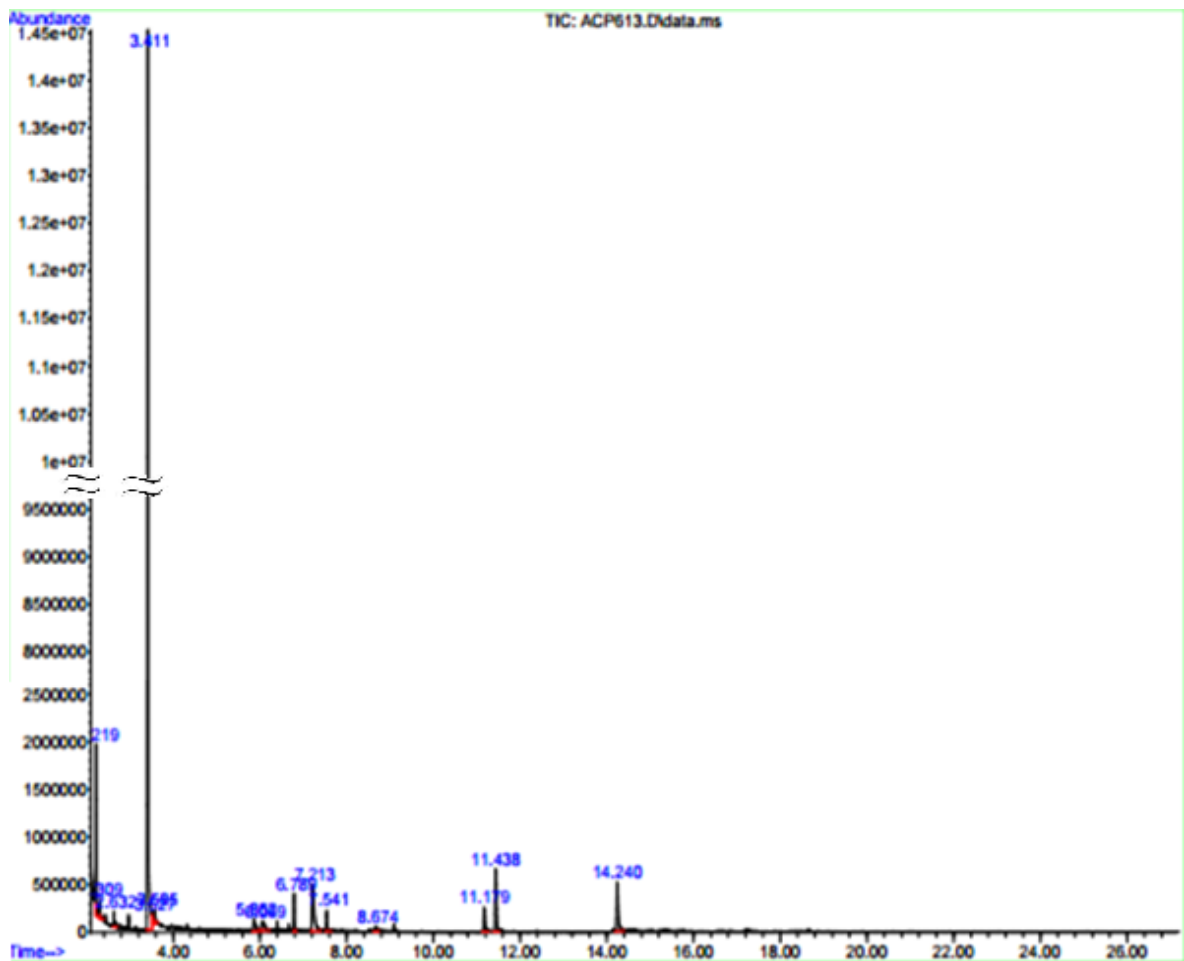
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS

3.2.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Según la base de datos del equipo los compuestos detectados en la muestra de ACPG13 en MSMGP sometida a cromatografía son: en mayor abundancia, en el pico 3,427 el Metil 3-hidroxi-butanoato, compuesto que sugiere la presencia de polímero (P3HB), le sigue en el pico 7,197 el metil 3-hidroxidecanoato; compuestos que también se encuentran en el siguiente pico en 6,048 y que sugiere que la cepa produce en menor proporción otro biopolímero(P3HD) o bien que se produce un copolímero, también se nota la presencia en menor proporción de esteres metílicos de ácidos grasos en los picos 11,444 y 14,245.

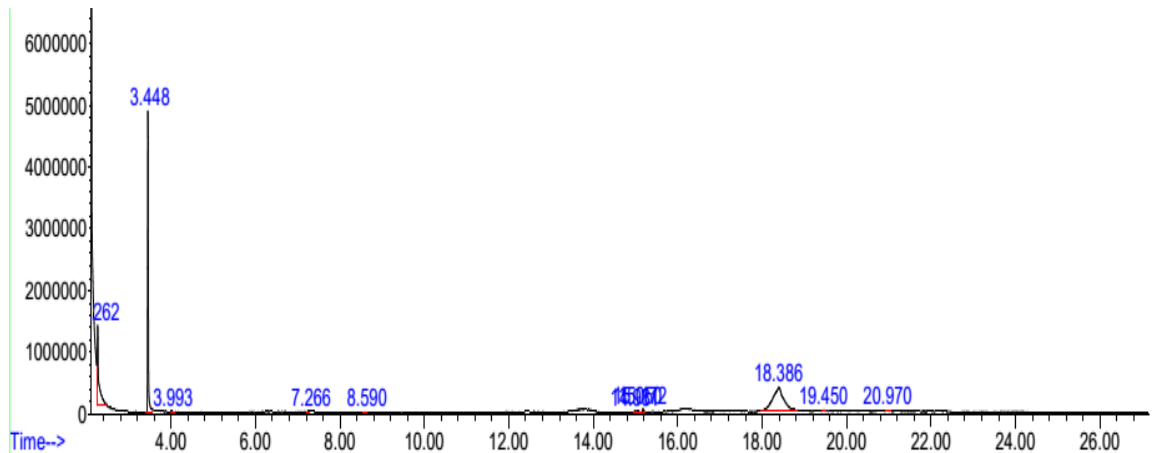
En el resultado de la cromatografía de la muestra ACPG13 en MSMGC (Figura 6) se encontró: en mayor abundancia, en el pico 3,411 el compuesto Metil-3-Hidroxi-butanoato, compuesto que sugiere la presencia de polímero (P3HB); en el tiempo 11,438 se observó el Ácido Hexadecanoico-Metil Éster, en el pico 14,2407 éster metílico del Ácido Octadecanoico, también se notó en el pico 7,213 el metil-3-hidroxidodecanoato, aunque la abundancia de estos tres últimos picos es bastante baja.

Figura 6. Cromatograma de una muestra de ACPG13 en MSMGC luego de 5 días de cultivo



En la Figura 7 se presenta el cromatograma de una muestra de P3HB comercial evidenciándose que el pico característico se encuentra en un tiempo de retención de 3,4 perteneciente al Metil-3-Hidroxibutanoato.

Figura 7. Cromatograma de una muestra de P3HB comercial



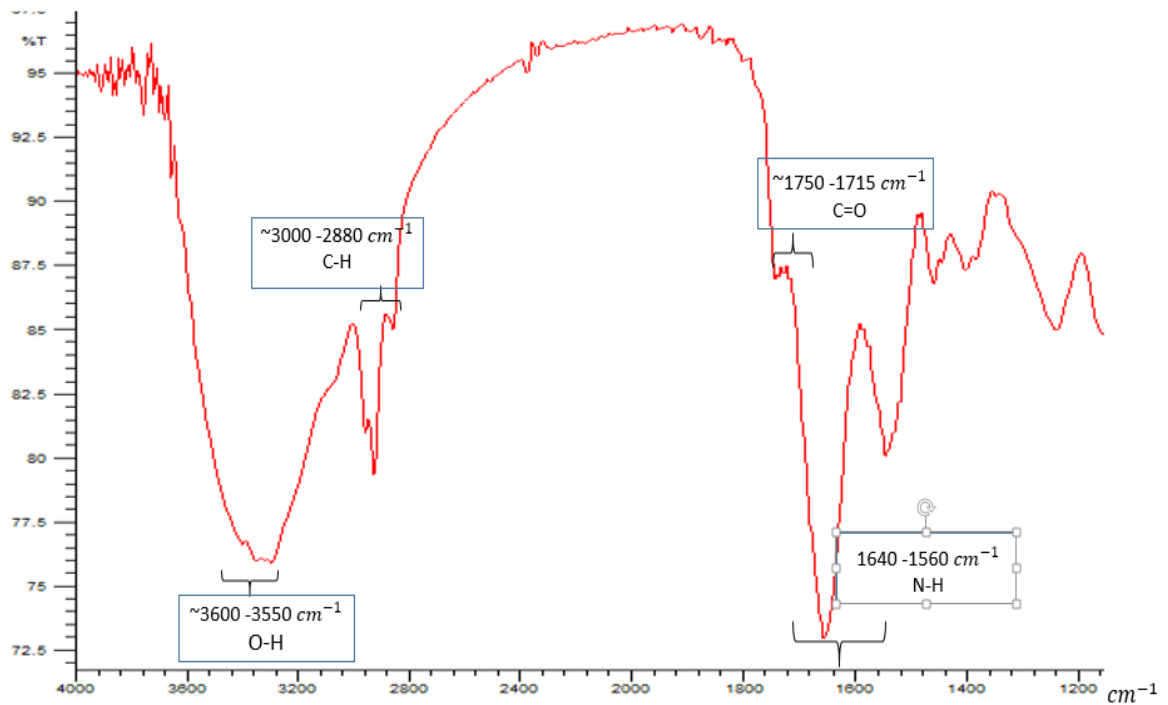
3.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se realizó el análisis respectivo de espectroscopia infrarrojo para la muestra ACPG13, en medio MSMGC para corroborar la presencia de PHAs intracelular. Dicho análisis se presenta en la Figura 8, este reveló picos característicos que han sido asociados en la literatura a cultivos en los que se ha producido PHAs. El pico entre $[3000-2880\text{ cm}^{-1}]$ corresponde a las vibraciones del metileno C-H y el pico cercano a la franja entre $[1750-1715\text{ cm}^{-1}]$, se presenta debido al grupo funcional éster $\text{C}=\text{O}$ ³⁴. La locación exacta del pico en las bandas reportadas se conoce que varía con la longitud de cadena del polímero y la cristalinidad del PHAs³⁵. Se encontró de igual manera picos en la región de los aminos, estos están asociados a los elementos bases de las paredes celulares, dado que el análisis se realizó sin previa extracción del polímero Intracelular³⁶.

³⁴ DA SILVA G.P, MACK M. y CONTIERO J., «Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology,» *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 3039, 2009.

³⁵ GUERRERO J., TAYÀ C., GUIASOLA A. y BAEZA J. A., «Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal,» *Water Research*, vol. 445, pp. 2983-2991, 2012.

³⁶ BANACORE A., MARTÍNEZ G. y SARAVIA V., «Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono», Instituto de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay

Figura 8. Espectrofotometría infrarroja de una muestra de ACPG13

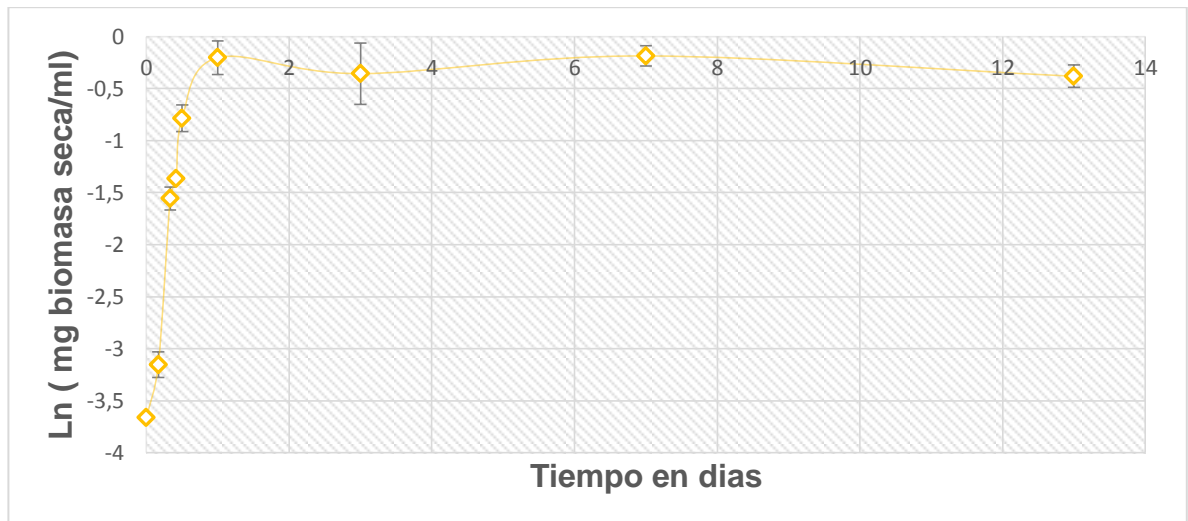


3.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO

Después del muestreo y realizadas las pruebas respectivas, se obtuvieron los resultados para la producción de biomasa seca por ml de cultivo (Figura 9) de la cepa ACPG13 en MSMGC.

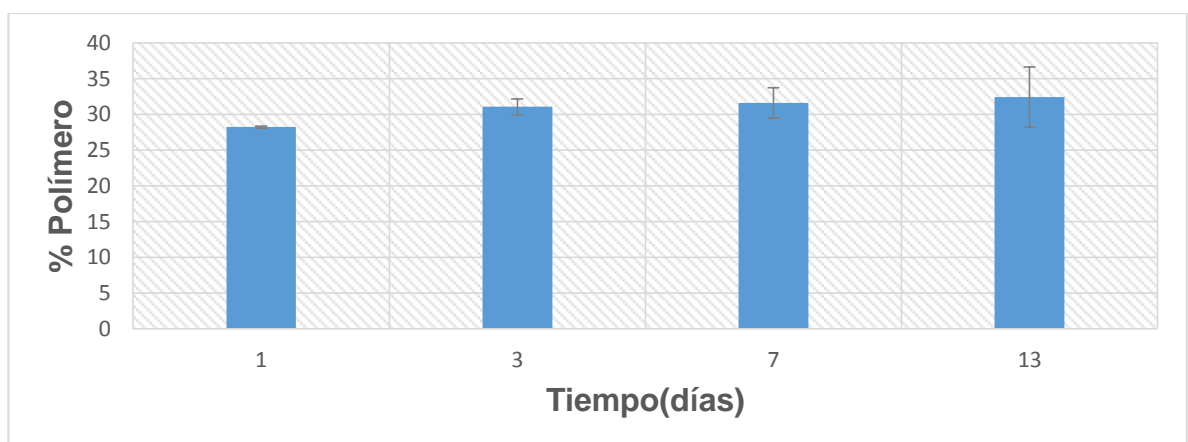
Según los resultados de biomasa seca/ml de cultivo, se puede inferir que durante las primeras 12 horas, se presenta la fase exponencial de crecimiento, encontrándose una velocidad específica de crecimiento máxima de $0,25$ h^{-1} . Luego del primer día de crecimiento, la bacteria entra en la fase estacionaria.

Figura 9. Biomasa seca en miligramos / ml de cultivo a través del tiempo de ACPG13 en MSMGC



Después del muestreo y realizadas las pruebas respectivas, se obtuvieron los siguientes resultados de TGA para el porcentaje de acumulación intracelular de polímero en base seca, producido por la cepa ACPG13 en diferentes días de crecimiento (Figura 10)

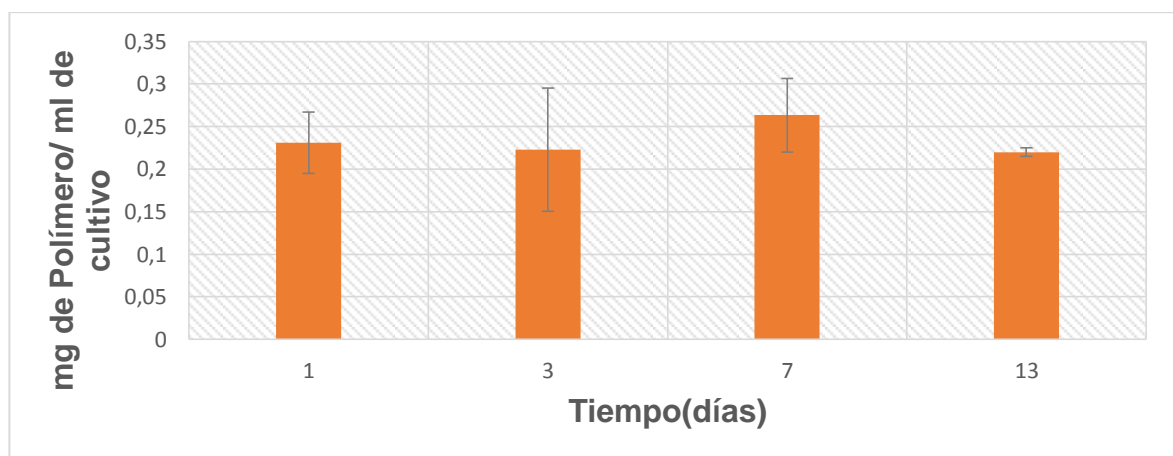
Figura 10. Producción de polímero en base seca a través del tiempo para ACPG13 en MSMGC



Se realizó un análisis ANOVA de un factor, para determinar si el tiempo de crecimiento influye en la acumulación intracelular de polímero. Según este análisis, no hay efectos significativos para el tiempo, es decir que el tiempo de crecimiento de la cepa no hace que la acumulación intracelular de polímero sea estadísticamente diferente.

En la Figura 11 se puede observar los resultados para la producción de polímero por ml de cultivo alcanzada por la cepa ACPG13 en diferentes días de crecimiento, luego de que se le realizaran las pruebas respectivas.

Figura 11. Producción de polímero por ml de cultivo a través del tiempo para ACPG13 en MSMGC



Se realizó un análisis ANOVA de un factor para determinar si el tiempo de crecimiento influye en la producción de polímero. Se obtuvo que no hay efectos significativos para el tiempo, es decir que el tiempo de crecimiento de la cepa no hace que la producción de polímero / ml de cultivo sea estadísticamente diferente.

3.4 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES INFLUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE PHAS

Las variables de entrada que se estudiaron fueron concentración de glicerol, nitrógeno, fosfatos, elementos traza, así como el tiempo, pH y la DO inicial para obtener como variable de salida: la producción de biomasa, la acumulación intracelular de polímero y la producción de polímero por ml de cultivo.

Hasta este punto se ha logrado evidenciar la presencia del polímero (P3HB) en las condiciones trabajadas y con la formulación original del medio, de aca en adelante es posible que bajo las nuevas condiciones la bacteria acumule otro tipo de moléculas, teniendo en cuenta que el medio es desequilibrado en nutrientes, y que la cepa se trata de una *Arthrobacter sp*, es posible que bajo estas condiciones la cepa sintetiza ácidos grasos o derivados de estos, como lo sugieren algunas fuentes bibliográficas³⁷.

En la Figura 12 se observa la producción de biomasa en las condiciones de cada experimento y en la Tabla 3 se muestra los resultados del análisis estadístico hecho usando Develve. En amarillo se encuentran los factores influyentes en el crecimiento de la cepa, se toma como significativo los resultados que tengan un valor $p < 0,05$. Las variables estudiadas en el diseño ortogonal que son representativas para el crecimiento de la cepa son: la concentración de glicerol, fosfatos y el tiempo. El glicerol y el tiempo tienen una influencia negativa sobre la biomasa, es decir que altos contenidos de glicerol y tiempos prolongados de cultivo desfavorecen el crecimiento. Los fosfatos tienen una influencia positiva puesto que la presencia de ellos en el medio mejora la cantidad de biomasa obtenida.

³⁷ SHIVELY J. M., CANNON G. C., HEINHORST S., FUERST J. A., BRYANT D. A., GANTT E., MAUPIN-FARLOW J. A., SCHULER D., PFEIFER F., D. R, DAHL C., PRESS J., STEINBUHEL A. y FEDERICI B. A., Op. Cit.

Figura 12. Biomasa seca / ml de cultivo de cada uno de los experimentos del diseño ortogonal



Tabla 3. ANOVA para el crecimiento celular Biomasa seca/mL de cultivo

Variables	DF	SS	MS	F	p	Efecto
Glicerol	1	9,16	9,16	28,95	0	-0,49
Tiempo	1	1,77	1,77	5,58	0,03	-0,28
Nitrógeno	1	0,55	0,55	1,73	0,21	
Fosfatos	1	9,3	9,3	29,4	0	0,49
Trazas	1	0,74	0,74	2,33	0,15	
Ph	1	0,5	0,5	1,59	0,23	
DO inicial	1	0,34	0,34	1,06	0,32	

En la Figura 13 se observa la acumulación de polímero en las condiciones de cada experimento; los experimentos 2, 3 y 4 son los de menor producción, mientras que el experimento 6 presenta una mayor acumulación del polímero. Para determinar cuáles son las variables influyentes se realizó el análisis estadístico utilizando el software Develve (Tabla 4). En amarillo se encuentran los factores influyentes en la producción de polímero en base seca. Las variables que influyen en la acumulación intracelular de polímero son la concentración de glicerol, elementos traza y la DO inicial.

El glicerol y los elementos traza tiene una influencia positiva sobre la acumulación de polímero; mientras que la DO inicial tiene una influencia negativa, es decir que la acumulación intracelular de polímero se ve favorecida con un DO inicial bajo.

Figura 13. Producción de polímero en base seca de cada experimento

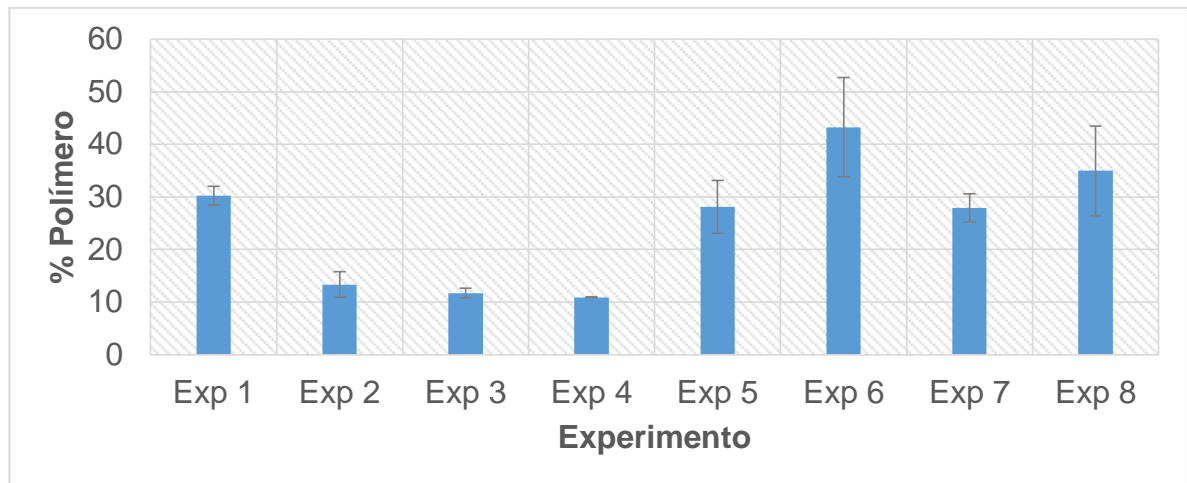
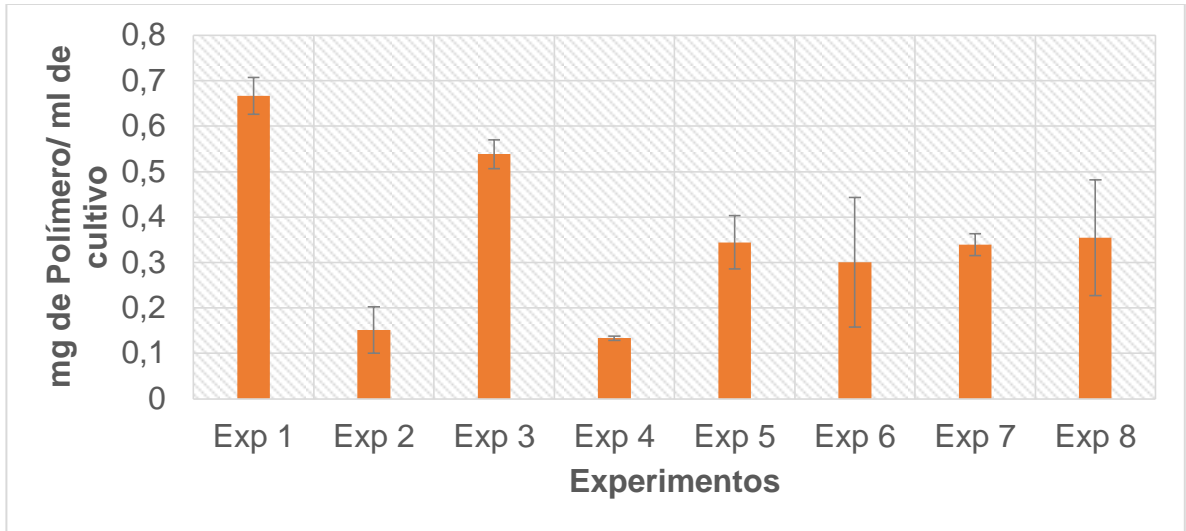


Tabla 4. ANOVA para la acumulación intracelular de polímero

Variables	DF	SS	MS	F	p	Efecto
Glicerol	1	1914,62	1914,62	-45,2	0	7,05
Tiempo	1	318,17	318,17	-7,51	1	
Nitrógeno	1	0	0	0	1	
Fosfatos	1	242,73	242,73	-5,73	1	
Trazas	1	977,2	977,2	-23,07	0	8,82
pH	1	3,69	3,69	-0,09	1	
DO inicial	1	770,49	770,49	-18,19	0	-7,83

La Figura 14 se muestra la producción de polímero en mg por ml de cultivo para cada uno de los experimentos. Los experimentos con menor producción son el 2 y el 4; mientras que el experimento 1 y 3 presentan una mayor producción. Para determinar cuáles son las variables que influyen en la producción se realizó un análisis estadístico con ayuda del software Develve cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

Figura 14. Producción de Polímero/ mL de cultivo de cada experimento.



La Tabla muestra en amarillo los factores influyentes en la producción de polímero/ml de cultivo. Según esto, las variables estudiadas en el diseño ortogonal que son significativas, es decir hacen que la producción de polímero / ml de cultivo sea estadísticamente diferente son: los elementos traza y presencia de fosfatos, los elementos traza tienen una influencia positiva sobre la producción, es decir que se requieren elementos traza para obtener mayor producción de polímero al igual que los fosfatos.

Tabla 5. ANOVA para la producción de polímero /mL de cultivo

Variables	DF	SS	MS	F	p	Efecto
Glicerol	1	86,45	86,45	0,52	0,48	
Tiempo	1	0,86	0,86	0,01	0,94	
Nitrógeno	1	133,93	133,93	0,81	0,38	
Fosfatos	1	1990,57	1990,57	12,03	0	7,19
Trazas	1	1360,81	1360,81	8,22	0,01	10,4
pH	1	108,86	108,86	0,66	0,43	
DO inicial	1	118,9	118,9	0,72	0,41	

En la Tabla 6, se muestra un resumen de los efectos significativos, en esta se pueden evidenciar la influencia positiva o negativa para cada una de las variables de entrada sobre las variables de salida estudiadas.

Tabla 6. Influencia de las variables estudiadas en la producción de biomasa, acumulación de polímero y producción de polímero

Factor	Producción de biomasa	Acumulación de polímero (%)	Producción de polímero / ml de cultivo
Glicerol	-	+	
Tiempo	-		
Nitrógeno			
Fosfatos	+		+
Trazas		+	+
pH			
DO inicial		-	

Finalizado el diseño de experimento ortogonal se seleccionó el mejor experimento en cuanto a la acumulación de polímero, el cual fue el experimento 6 que tiene una producción en base seca del 42% aproximadamente. Al realizarle GC-MS a esta muestra no se encontró pico alguno que sugiriera la presencia del P3HB que se evidenció en las pruebas preliminares, por otro lado se nota en mayor proporción del pico a 11.449 correspondiente al éster metílico del ácido hexadecanoico y del pico 14,165 el éster metílico del ácido octadecanoico, compuestos que se habían evidenciado en pruebas preliminares con un contenido bajo y que en esta etapa se presentan como los componentes principales de la muestra.

En cuanto al control realizado con *E. coli*, pasando la muestra por TGA y aplicando la misma ecuación para calcular el porcentaje de polímero, se encontró una producción de 29,54% en base seca, resultado que no concuerda con la bibliografía acerca del tema ya que esta bacteria no es productora de PHAs. Sin

embargo hay evidencias de que *E. coli* puede producir derivados de ácidos grasos en condiciones de limitación de nutrientes^{38 39 40} y que el ácido hexadecanoico es un producto de *E. coli* mediante la ruta de los ácidos grasos⁴¹ y estos son los que pueden causar la falsa interpretación en las lecturas de TGA. En cuanto a los resultados arrojados por GC-MS se evidenció en mayor proporción en los picos 11,449 y 14,165 el éster metílico del ácido hexadecanoico y el éster metílico del ácido octadecanoico respectivamente; compuestos a los que podría atribuirse los resultados.

Para tener certeza de que es posible que estos ácidos grasos pueden generar falsas interpretaciones en el TGA, se encontró evidencia bibliográfica de que el ácido linoleico (compuesto identificado en los resultados de GC-MS aunque con una abundancia baja) sufre una pérdida de peso entre 120°C y 200°C al ser sometido a TGA⁴². También se encontró que al pasar una muestra de ácido oleico por el mismo equipo con el que se ha venido trabajando, se puede evidenciar la pérdida de peso entre 140°C y 200°C y si comparamos este con un TGA hecho a una muestra de P3HB comercial, queda en evidencia que se puede dar lugar a una falsa interpretación de los resultados. En la Figura 15 se puede ver la pérdida de peso de una muestra de ácido oleico y de una muestra de P3HB comercial.

Los resultados de la cepa ACPG13 como de la *E. coli* sugieren que en las condiciones del experimento 6, estas bacterias sintetizan ácidos grasos o

³⁸ JANßEN, H. J., & STEINBÜCHEL, A. «Fatty acid synthesis in Escherichia coli and its applications towards the production of fatty acid based biofuels». *Biotechnology for biofuels*, Vol. 7, No. 1, pp. 1, 2014.

³⁹ MARR, A. G., & INGRAHAM, J. L. «Effect of temperature on the composition of fatty acids in Escherichia coli». *Journal of Bacteriology*, Vol. 84, No. 6, pp. 1260-1267. 1962.

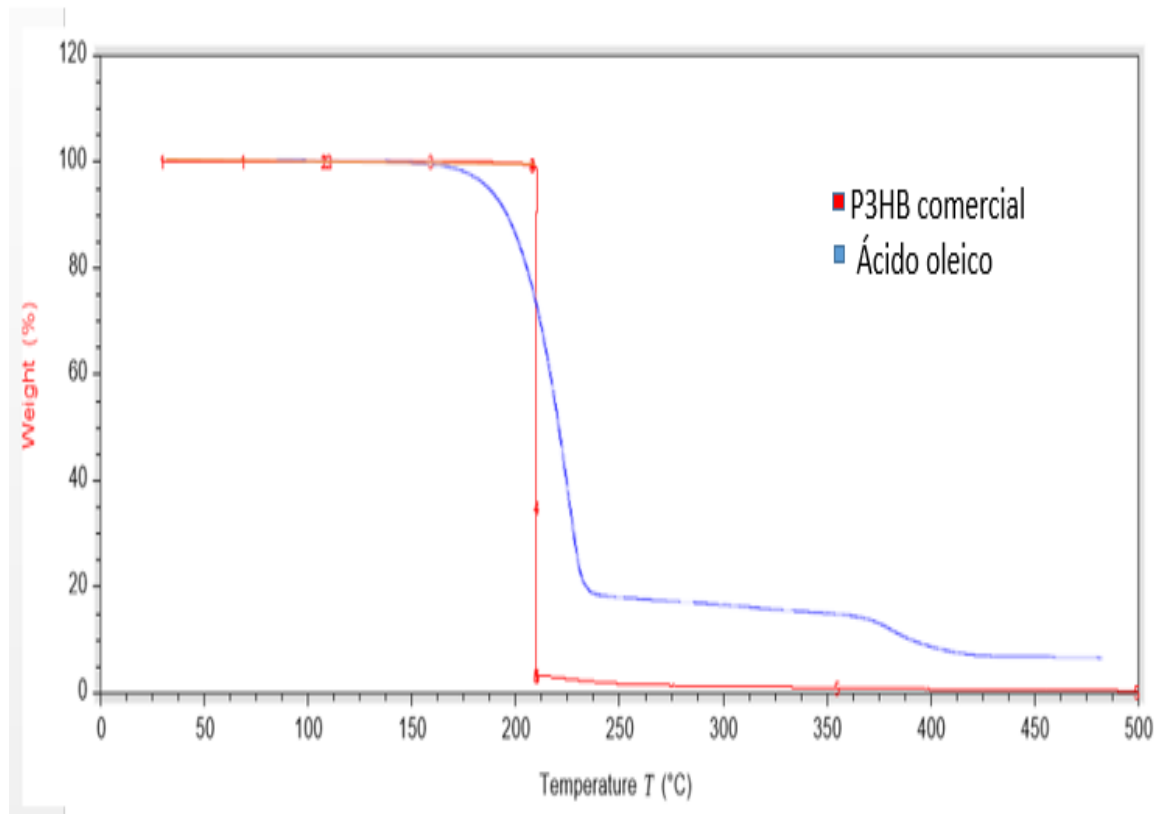
⁴⁰ STEEN E. J., KANG Y., BOKINSKY G., HU Z., SCHIRMER A., Mcclure A., DEL CARDAYRE S. B. y KEASLING J. D., «Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass,» *nature*, vol. 463, pp. 559-562, 2010.

⁴¹ DIJKSTRA, A. J., HAMILTON, R. J., & HAMM, W. (Eds.). «Trans fatty acids». John Wiley & Sons. 2008

⁴² ISHIGURO, S. ADACHI y R. MATSUNO, «Thermogravimetric Analysis of Cyclodextrin-Fatty Acid Complex Formation and Its Use for Predicting Suppressed Autoxidation of Fatty Acids,» *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 59, No 1, pp. 51-54, 1995.

derivados de estos en lugar de PHAs. Sin embargo en las pruebas preliminares con la formulación original del medio sí se evidenció producción de P3HB por la cepa ACPG13 y en un trabajo de grado anterior se confirmó que el control negativo (*E. coli*) no produjo P3HB en estas condiciones⁴³.

Figura 15. Pérdida de peso de una muestra de P3HB comercial y Ácido oleico



Fuente: Base de datos del grupo de Investigación de Polímeros.

⁴³ BERMÚDEZ MÁRQUEZ RA, ORDÓÑEZ FRANCO MC, SANCHEZ TORRES V, RAMÍREZ CABALLERO GE. «Biosíntesis bacteriana de polihidroxicanoatos a partir de glicerol CRUDO ». Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, 2014

4. CONCLUSIONES

Pruebas realizadas sugieren que en MSMGC la cepa ACPG13 produce P3HB y en las condiciones del experimento 6 es potencial productora de ácidos grasos o compuestos derivados.

El tiempo no es una variable significativa en la producción del polímero por la cepa ACPG13.

Los factores que favorecen la acumulación de productos intracelulares en base seca son las altas concentraciones de glicerol; por otro lado, si se eliminan los elementos traza del medio y se inocula con una alta densidad celular, la acumulación intracelular se ve desfavorecida.

La técnica de TGA no es fiable a la hora de identificar el contenido de PHAs en cepas cuyos productos o intermediarios metabólicos pueden estar relacionados con ácidos grasos, ya que estos pueden ser interpretados erróneamente como PHAs.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de otra técnica analítica diferente al TGA para la cuantificación de PHAs en cepas con las capacidades de síntesis mencionadas, para evitar falsos positivos. Una alternativa podría ser la GC-MS con patrón interno.

BIBLIOGRAFÍA

ALDOR, I. S., & KEASLING, J. D. «Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates». *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 14, No. 5, pp. 475-483. 2003.

BANACORE A., MARTÍNEZ G. y SARAVIA V., «Producción de polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono», Instituto de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay

BEN-OMAR N., MERROUN M.L., ARIAS J.M. y GONZALEZ M.T., «Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass», *Chemosphere*, vol. 35, No. 10, pp. 2217-283, 1997.

BENTLEY, R.. «Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs». *Perspectives in biology and medicine*, Vol. 40, No. 3, pp. 364-394. 1997.

BERMÚDEZ MÁRQUEZ RA, ORDÓÑEZ FRANCO MC, SANCHEZ TORRES V, RAMÍREZ CABALLERO GE. «Biosíntesis bacteriana de polihidroxicanoatos a partir de glicerol CRUDO ». Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, 2014

CRAGG, G. M., & NEWMAN, D. J. «Plants as a source of anti-cancer agents». *Journal of ethnopharmacology*, Vol. 100 No.1, pp. 72-79. 2005.

DA SILVA G.P, MACK M. y CONTIERO J., «Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology,» *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 3039, 2009.

DIJKSTRA, A. J., HAMILTON, R. J., & HAMM, W. (Eds.). «Trans fatty acids». John Wiley & Sons. 2008

DIONISI, D., PETRANGELI-PAPINI, M., BECCARI, M., MARÍN, F. C., MAJONE, M., & CARUCCI, G. «Los polihidroxicanoatos: Plásticos biodegradables producidos por microorganismos.» *Ingeniería química*, No. 414, pp.244-251. 2004

DOI, Y. «Microbial polyesters». VCH Publishers. 1990.

EZZIYYANI M., PÉREZ C., REQUENA M., AHMED A. y CANDELA M., «Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*», *Anales de Biología*, vol. 36, pp. 61-68, 2004.

FEDEBIOCOMBUSTIBLES Indicador producción Biodiesel de Palma de aceite, 2015; [en línea] Disponible en: http://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm

FERNÁNDEZ ESCAPA, I., CERRO, C. D., GARCIA, J. L., & PRIETO, M. A.. «Sistema para mejorar la producción de polihidroxicanoatos (bioplástico) por fermentación a partir de glicerol utilizando una cepa de *Pseudomonas putida* modificada genéticamente». 2013

FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. «Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos», *Revista Peruana de Biología*, Vol. 16, pp 1-2, 2009.

GIRALDO BAREÑO YY, ROMERO GOMEZ DA, SANCHEZ TORRES V, RAMÍREZ CABALLERO GE. «Selección de cepas de actinomycetos para la producción de polihidroxicanoatos». Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, 2015.

GÓMEZ CARDOZO, J. R. «Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos» (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Medellín).

GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. «Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano». Revista Internacional de Contaminación Ambiental, vol. 29, No. 1, pp.77-115. 2013

GONZÁLEZ IGUAVITA, M. P. «Obtención de poli-3-hidroxibutarato (p3hb) a partir de la Extracción de pectina del mucilago de café con streptomyces sp. Aislados de suelos de Boyacá (Colombia)» (Tesis Doctoral). 2014

GONZÁLEZ Y., MEZA J.C., GONZÁLEZ O. y CÓRDOVA J.A, «Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano», Revista Internacional de Contaminación Ambiental, vol. 29, No. 1, pp. 77-115, 2013.

GUERRERO J., TAYÀ C., GUIASOLA A. y BAEZA J. A., «Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal,» Water Research, vol. 445, pp. 2983-2991, 2012.

GUTIÉRREZ F. y ALBÁNCHÉZ I., Biología: la célula, Firms Press, 2010, pp. 14-17.

ISHIGURO, S. ADACHI y R. MATSUNO, «Thermogravimetric Analysis of Cyclodextrin-Fatty Acid Complex Formation and Its Use for Predicting Suppressed Autoxidation of Fatty Acids,» *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* , vol. 59, No 1, pp. 51-54, 1995.

JANßEN, H. J., & STEINBÜCHEL, A. «Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels». *Biotechnology for biofuels*, Vol. 7, No. 1, pp. 1, 2014.

KHANNA S. y SRIVASTAVA A. K., «Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates,» *Process Biochemistry*, pp. 607-619, 2005.

LEIVA, S., YÁÑEZ, M., ZAROR, L., RODRÍGUEZ, H., & GARCÍA-QUINTANA, H. «Actividad antimicrobiana de Actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile». *Revista médica de Chile*, vol. 132, No. 2, pp.151-159. 2004

MANN, J. «Natural products as immunosuppressive agents». *Natural Product Reports*. Vol. 18 pp. 417-430. 2001.

MARR, A. G., & INGRAHAM, J. L. «Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*». *Journal of Bacteriology*, Vol. 84, No. 6, pp. 1260-1267. 1962.

MAYORGA, M. A., & NARANJO, W. A. M. «Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1, 3-propanodiol (1, 3-pd) ». *TECCIENCIA*, Vol. 6, No. 12, pp. 80-93. 2012.

PEÑA GAMBOA, A. C. «Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico». Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander 2015

SHIVELY J. M., CANNON G. C., HEINHORST S., FUERST J. A., BRYANT D. A., GANTT E., MAUPIN-FARLOW J. A., SCHULER D., PFEIFER F., D. R, DAHL C., PRESS J., STEINBUCHER A. y FEDERICI B. A., «Intracellular structures of prokaryotes: Inclusions, compartments and assemblages» de Encyclopedia of Microbiology, tercera ed., M. Schaechter, Ed., oxford, 2009, pp. 404-424

STANIER R. Y., INGRAHAM J. L., WHEELIS M. L. y PAINTER P. R., «Microbiología», Reverte, 1996.

STEEN E. J., KANG Y., BOKINSKY G., HU Z., SCHIRMER A., McClure A., DEL CARDAYRE S. B. y KEASLING J. D., «Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass,» nature, vol. 463, pp. 559-562, 2010.

VASCO J. M. «Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales.» Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Manizales, Caldas, Colombia.

ANEXOS

Anexo A. Medios de cultivo

NOMBRE	COMPONENTE	CANTIDAD (1 litro)
Luria Bertani (LB)	NaCl	10,0 gramos
	Extracto de levadura	5,0 gramos
	Triptona	10,0 gramos
Medio mínimo de sales con glicerol (MSMG)	Glicerol	10,00 gramos
	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	6,70 gramos
	NaCl	10,00 gramos
	KH ₂ PO ₄	1,50 gramos
	NH ₄ Cl	0,10 gramos
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20 gramos
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 gramos
	Citrato de amonio ferroso	0,06 gramos
	Elementos traza:	1,00 mililitros
	- H ₃ BO ₃	0,30 gramos
	- CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,20 gramos
	- ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,10 gramos
	- MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,03 gramos
	- NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,03 gramos
	- NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,02 gramos
- CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 gramos	

MSMGP: para este se usan 10 gramos de glicerol puro / litro de medio

MSMGC: la concentración del glicerol dentro del glicerol crudo es aproximadamente del 85% por lo que para este medio se usan 12,15 gramos de glicerol crudo para de este modo obtener un contenido real de glicerol de 10 gramos.

Anexo B. Propiedades del Glicerol Crudo

Tabla A1. Ficha técnica del Glicerol residual

INFORME DE ANALISIS		Código:	FI-AL-001																							
		Versión:	01																							
		Pag.	1 de 1																							
		Fecha:	2012-10-08																							
Laboratorio de Ensayo de Oleoflores S.A. Km 5 vía Codazzi - Valledupar gestionlaboratorio@haciendalASFlores.com sheredia@haciendalASFlores.com																										
No de informe	NA	Fecha de Recepción de muestra:	26-ene-15																							
Cliente:	LUIS FERNANDO CASTRO	Fecha de Ejecución de Análisis:	26-ene-15																							
Dirección Cliente:	N.A																									
Entidad / Area:	laboratorio	Tiempo total de ensayo:	2 1/2 horas																							
Punto de Muestreo [1]:	N.A	Técnica de Muestreo [2]:	ISO 5555																							
Volumen observado [3]:	NA																									
CONDICIONES DE PRUEBA:																										
NOMBRE DE LA MUESTRA: glicerina cruda		CODIGO:																								
DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA MUESTRA: LIQUIDA																										
Los siguientes resultados son validos únicamente para las muestras identificadas con anterioridad. El laboratorio																										
CARACTERISTICA	UNIDAD	METODO	ESPECIFICACION		RESULTADO	CUMPLE																				
			MINIMO	MAXIMO																						
pH		I-GL-198	>0		4,45	SI																				
Glicerol		EA6-51	79		82,32	SI																				
Cloruros		GTC-3		5,5	4,78	SI																				
humedad y volatiles		CA2C-25		13,500	11,24	SI																				
MONG				4,00	1,76	SI																				
Cenizas	%	CA11-55		5,5	4,68	SI																				
Declaraciones y Observaciones: [1], [2], [3]: E																										
Comentarios del cliente:																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: small;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;"></th> <th style="width: 25%;">Nombre</th> <th style="width: 25%;">Cargo</th> <th style="width: 20%;">Firma</th> <th style="width: 15%;">Fecha (AAAA-MM-)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Realizado por:</td> <td>YESID ARGOTE</td> <td>analista</td> <td>YCA</td> <td style="text-align: center;">26/01/2015</td> </tr> <tr> <td>Aprobado por:</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Recibido por:</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>								Nombre	Cargo	Firma	Fecha (AAAA-MM-)	Realizado por:	YESID ARGOTE	analista	YCA	26/01/2015	Aprobado por:					Recibido por:				
	Nombre	Cargo	Firma	Fecha (AAAA-MM-)																						
Realizado por:	YESID ARGOTE	analista	YCA	26/01/2015																						
Aprobado por:																										
Recibido por:																										
Este informe no se puede reproducir de forma parcial, ni se debe reproducir en su totalidad sin la previa autorización del																										
----- FIN DEL INFORME -----																										
Oleoflores S.A. Barranquilla: Cra 58 No. 64 - 82 PBX: 3441086 serviciocliente@haciendalASFlores.com																										

Anexo C. Análisis Termogravimétrico

1. Se tomaron muestras de los cultivos las cuales se centrifugaron a 10000 gravedades por 2 minutos utilizando tubo Eppendorf , tomando muestra de tal manera que se obtuviera un pellet apreciable
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 [34] fue:
 - 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 300°C.

Anexo D. Protocolo de Metanólisis

A las muestras de masa celular se les realizó el siguiente protocolo de metanólisis

- 15 mg de biomasa
- 1,7 ml de metanol
- 0,3 ml de ácido sulfúrico
- 2 ml de cloroformo

Este procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 100°C durante 140 minutos, pasado este tiempo se enfrían los tubos de ensayo rápidamente introduciéndolos en agua a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona 1 mL de agua destilada autoclavada y se agitan por medio de un vortex para favorecer así la separación de las fases.

Con ayuda de una pipeta de 1 ml se tomó la fase del fondo que contiene los ésteres del polímero disueltos en cloroformo y se introducen en un vial para posteriormente ser llevados a cromatografía.

Anexo E. Programa usado en GC-MS

Columna y condiciones de operación para el cromatógrafo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas para la identificación de PHAs [35].

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+