

**TAMIZADO DE ACTINOBACTERIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES**

**CARLOS RODRIGO CACERES BARRERA
DANCY LIZETH TOLOZA MALDONADO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

**TAMIZADO DE ACTINOBACTERIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES**

**CARLOS RODRIGO CACERES BARRERA
DANCY LIZETH TOLOZA MALDONADO**

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

Director:

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

Codirector:

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

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

2016

DEDICATORIA

A Dios que es quien hace posible todo.

Dedicado a mi madre Ana Lucía por su gran esfuerzo y su apoyo incondicional, a mi padre Rodrigo por su ejemplo y mi hermana Andrea por el gran cariño que nos une. Ellos son el motor que me impulsa a salir adelante.

A mi tía Guíllermína por su apoyo y por la confianza depositada.

A todos mis familiares, compañeros y amigos por brindarme muchas enseñanzas a lo largo de este proceso.

Carlos Rodrigo Cáceres Barrera

A Dios y a la vida.

A mi madre María Esperanza Maldonado por enseñarme a ser valiente, guerrera y a creer que los sueños sí se hacen realidad.

A mi padre Timoleón Toloza López por todos los valores inculcados y por enseñarme que el arma más poderosa en la vida es la educación.

Gracias por ser el motivo que me inspira a levantarme todos los días a perseguir mis sueños. Esto es por ustedes y para ustedes.

Dancy Lizeth Toloza Maldonado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander y especialmente a la Escuela de Ingeniería Química por ayudarnos en nuestro crecimiento profesional y personal.

Al grupo de Investigación CINBIN y a todos sus integrantes por brindarnos su apoyo y permitirnos las herramientas para realizar nuestra investigación.

A nuestra directora la Dra. Viviana Sánchez por su inmensa dedicación, por sus consejos y por compartir sus conocimientos con nosotros.

A nuestro codirector el Dr. Gustavo Ramírez y al Grupo de Investigación en Polímeros por facilitarnos el uso de sus equipos para el desarrollo de este trabajo.

A la Bióloga Oriana Danuta Serna por su apoyo, amabilidad y colaboración constante.

A la Ingeniera Química Jenny Carolina Osma por su disposición y su paciencia.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS	17
1.2 ACTINOMICETOS	19
1.3 ROJO DE NILO	20
1.4 SÍNTESIS BACTERIANA DE POLIHIDROXIALCANOATOS	20
1.5 PRODUCCIÓN DE PHAS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES	21
2. METODOLOGÍA.....	23
2.1 CEPAS BACTERIANAS, FUENTES DE CARBONO Y MEDIOS DE CULTIVO.....	23
2.1.1 Cepas bacterianas.....	23
2.1.2 Fuentes de carbono.....	24
2.1.3 Cuantificación de azúcares reductores totales.....	25
2.1.4 Medios de cultivo.....	25
2.2 SELECCIÓN CUALITATIVA	25
2.3 SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA	26
2.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA).....	26
2.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	27
2.3.3 Curva de crecimiento.....	27
2.4 EXTRACCIÓN DEL POLÍMERO	28
2.4.1 Protocolo de extracción.....	28
2.4.2 Prueba de solubilidad.....	28

2.4.3 Elaboración de láminas del polímero.....	28
2.5 CARACTERIZACIÓN DE PHAs	29
2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	29
2.5.2 Análisis termogravimétrico (TGA).....	29
2.5.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	29
2.5.4 Análisis Mecánico Diferencial.....	29
3. RESULTADOS	31
3.1 AJUSTE DEL MEDIO MINIMO DE SALES.....	31
3.2 SELECCIÓN CUALITATIVA	31
3.3 SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA	33
3.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA).....	33
3.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	34
3.3.3 Curva de crecimiento.....	36
3.4 EXTRACCIÓN DEL POLÍMERO.....	37
3.5 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PRODUCIDO	38
3.5.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	38
3.5.2 Análisis termogravimétrico (TGA).....	39
3.5.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	40
3.5.4 Análisis Mecánico Diferencial.....	41
4.CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43
ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Gránulos de PHA en el interior de células bacterianas.....	17
Figura 2. Estructura general de los polihidroxicanoatos.	18
Figura 3. Metodología experimental.....	23
Figura 4. Selección de cepas productoras de PHA con tinción de Rojo de Nilo.	32
Figura 5. Pérdida de peso de una muestra de ACPG16B en MSMGC (línea azul) y programa de temperatura utilizado (línea verde)	34
Figura 6. Espectros GC-MS a) Masa celular seca de la cepa ACPG16B b) Polímero extraído de la cepa ACPG16B c) PHB comercial.	35
Figura 7. Crecimiento de ACPG16B en MSMGC	36
Figura 8. Lámina de PHB extraído de la cepa ACPG16B.....	37
Figura 9. Termograma DSC polímero extraído (verde) y del polímero comercial (azul).....	38
Figura 10. Termograma del polímero extraído (verde) y polímero comercial (azul).....	39
Figura 11. Espectro IR del polímero extraído (azul) y del PHB comercial (rojo)	40
Figura 12. Curva esfuerzo - deformación para el polímero extraído.	41

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Resultados finales selección cualitativa	32
---	----

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Ruta metabólica de síntesis y degradación de PHB.....	40
Anexo B. Cepas y caracterización molecular.....	41
Anexo C. Cuantificación de azúcares reductores totales	42
Anexo D. Medios de cultivo	44
Anexo E. Análisis termo gravimétrico	46
Anexo F. Metodología de metanólisis	47
Anexo G. Método de análisis GC-MS	48
Anexo H. Protocolo de extracción	49
Anexo I. Protocolo calorimetría diferencial de barrido (DSC)	50

RESUMEN

TÍTULO: TAMIZADO DE ACTINOBACTERIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES*

AUTORES: Carlos Rodrigo Cáceres Barrera
Dancy Lizeth Toloza Maldonado**

PALABRAS CLAVE: actinobacterias, polihidroxicanoatos, glicerol crudo, láminas.

DESCRIPCIÓN:

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres usados como material de reserva por algunos microorganismos en condiciones de estrés nutricional que pueden alcanzar hasta un 80 % del peso seco en la célula. Tienen propiedades mecánicas y térmicas similares a plásticos convencionales con la ventaja de que se producen a partir de fuentes renovables, son reciclables, biodegradables y biocompatibles. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de 20 cepas de actinobacterias nativas para la producción de polihidroxicanoatos a partir de residuos agroindustriales como fuentes de carbono. Los residuos usados fueron mucílago de café fermentado, efluente de aceite de palma y glicerol crudo. Se realizó primero una selección cualitativa mediante tinción con Rojo de Nilo hasta obtener 2 cepas potencialmente productoras por cada fuente de carbono. Posteriormente mediante análisis termogravimétrico y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se verificó la presencia del biopolímero. Mediante estas técnicas se confirmó que la cepa nativa ACPG16B produce PHAs usando como sustrato glicerol crudo. Se realizaron cultivos de dicha cepa durante 72 horas, se realizó la extracción del polímero utilizando cloroformo como solvente permitiendo la obtención de láminas del polímero. El rendimiento del polímero producido fue 0,108 g/L. El polímero recuperado fue caracterizado por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier para estudiar la estructura química. También la calorimetría diferencial de barrido y el análisis termogravimétrico fueron usados para estudiar las propiedades térmicas. Se realizó análisis mecánico diferencial para obtener las propiedades mecánicas. Los resultados de la caracterización permiten identificar el polímero producido como polihidroxibutirato (PHB).

* Trabajo de Grado

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

ABSTRACT

TITLE: SCREENING OF ACTINOBACTERIA FOR PRODUCTION OF POLYHYDROXYALCANOATES FROM AGRO-INDUSTRIAL WASTES

AUTHORS: Carlos Rodrigo Cáceres Barrera
Dancy Lizeth Toloza Maldonado

KEYWORDS: Actinobacteria, polyhydroxyalkanoates, polymer film, crude glycerol

DESCRIPTION:

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters used as storage materials by various microorganisms under nutritional stress conditions; they can reach almost 80% of cell dry weight. They have mechanical and thermal properties close to those of conventional plastics with the advantages that they can be produced from renewable resources, they are recyclable, biodegradable and biocompatible. In this work it was evaluated the ability of 20 strains of actinobacteria to produce polyhydroxyalkanoates using agro-industrial wastes as carbon source. Wastes used were: coffee mucilage, palm oil mill effluent and crude glycerol. First a qualitative screening was performed via staining with Nile Red until selecting 2 potentially producing strains from each carbon source. Thermogravimetric analysis and gas chromatography-mass spectrometry were performed to corroborate the presence of the biopolymer. Using these techniques it was demonstrated that the native strain ACPG16B produces PHAs using as substrate crude glycerol. This strain was grown in minimal salt media for 72 hours, the polymer was extracted using chloroform as solvent allowing the preparation of polymer films. The polymer yield measured was 0,108 g /L. The recovered polymer was characterized by Fourier Transform Infrared spectroscopy to study the chemical structure. Also, Differential Scanning Calorimetry and Thermogravimetric Analysis were used to study the thermal properties. Dynamic Mechanical Analysis was used to evaluate mechanical properties. Characterization results indicates that polymer produced is polyhydroxybutirate (PHB).

* Undergraduate degree project

** Faculty of Physical-chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Co-director Ph.D. Gustavo E. Ramírez Caballer

INTRODUCCIÓN

Los plásticos se obtienen en la mayoría de los casos a partir del petróleo, tienen un uso extendido debido a sus propiedades y son imprescindibles en el estilo de vida actual¹. Sin embargo existe dificultad en su disposición final debido a su larga durabilidad; 45% de los plásticos producidos anualmente son descartados en rellenos sanitarios y miles de toneladas son arrojadas en ecosistemas marinos. A esto se suma el hecho de que son generados a partir de fuentes no renovables. Se han intentado reducir estos impactos a través de procesos de incineración, reciclaje o reutilización los cuales han sido insuficientes².

Los bioplásticos son una alternativa para la sustitución de plásticos convencionales debido a que son biodegradables y pueden ser obtenidos a partir de fuentes renovables. Dentro de este grupo están los polihidroxicanoatos, los cuales son sintetizados por una amplia variedad de microorganismos a partir de diferentes fuentes de carbono. Se han descubierto más de 150 tipos de PHAs distintos, lo que ha abierto el campo de aplicaciones para estos compuestos³. Debido al alto costo de producción, el enfoque actual es reducir costos relacionados con las materias primas y la búsqueda de cepas con potencial para realizar una producción a escala industrial⁴.

¹ 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*. 2013, vol. 29, nro. 1, pp.77-115.

² REDDY, M., VIVEKANANDHAN, S., MISRA, M., BHATIA, S. K., & MOHANTY, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*. 2013, vol. 38, nro.10, pp. 1653–1689.

³ REDDY et al. *Ibíd.*

⁴ NARANJO VASCO, J. M. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Tesis de maestría. Caldas: Universidad Nacional de Manizales. Grupo de Investigación de procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos, 2010. 127p.

En este trabajo se usaron 20 cepas de actinomicetos procedentes del Grupo de investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), las cuales fueron aisladas a partir de compost de la industria cafetera y fueron identificadas morfológica y molecularmente en una investigación previa⁵. El objetivo de este trabajo es seleccionar entre estas cepas microorganismos capaces de acumular polihidroxicanoatos a partir de diferentes residuos agroindustriales. Para ello se tuvieron en cuenta estudios previos que han evidenciado la capacidad de diversas especies de actinomicetos para la producción de estos compuestos⁶. Luego de seleccionar las cepas productoras mediante métodos indirectos (tinción con Rojo de Nilo y análisis termogravimétrico) y directos (cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas), se realizaron cultivos en medio mínimo de sales, se aplicó una metodología de extracción que permitió la obtención de láminas del polímero y finalmente se caracterizó el PHA extraído evaluando su composición, propiedades térmicas y propiedades mecánicas.

⁵PEÑA GAMBOA, A.; HERNÁNDEZ TORRES, J. & SERNA DAZA, O. Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico. Trabajo de grado Biología. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2015. 43p.

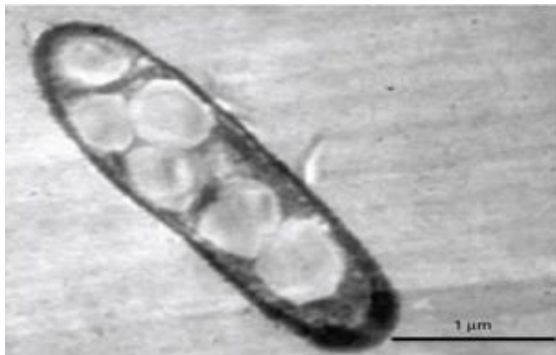
⁶ PIEPER, U., & STEINBIICHEL, A. Identification, cloning and sequence analysis of the Poly (3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. FEMS Microbiology Letters. 1992, vol. 96, pp. 73–80.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Los PHAs son poliésteres usados como material de reserva de carbono y energía por algunos microorganismos, los cuales se acumulan en el citoplasma en forma de gránulos como se muestra en la Figura 1. Se han reportado más de 300 especies productoras, algunas pueden alcanzar un porcentaje de acumulación de hasta 80 % del peso celular en base seca⁷. En la mayoría de los casos, el polímero es sintetizado en condiciones de exceso de la fuente de carbono junto a una limitación de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno⁸.

Figura 1. Gránulos de PHA en el interior de células bacterianas.



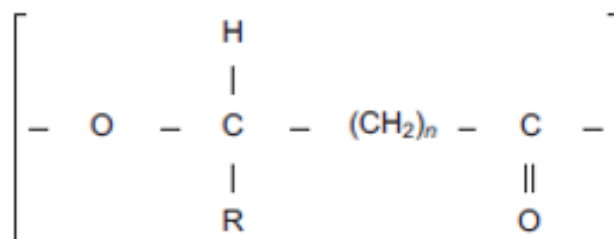
Fuente: GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013, vol. 29, nro. 1, pp.77-115.

⁷ GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. Op. Cit.

⁸ FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos, *Revista Peruana de Biología*. 2009, vol. 16, pp. 115-118.

La estructura química general de los polihidroxicanoatos se muestra en la Figura 2. Estos compuestos pueden estar presentes como homopolímeros o copolímeros y se clasifican según la longitud de la cadena: PHA de cadena corta (PHASCL) con monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, PHA de cadena media (PHAMCL) con monómeros de 6 a 14 átomos de carbono y PHA de cadena mixta que combinan los dos anteriores⁹. Debido a su conformación estructural las propiedades varían: los PHASCL son catalogados como termoplásticos y los PHAMCL son elastómeros¹⁰.

Figura 2. Estructura general de los polihidroxicanoatos.



Fuente: REDDY, M., VIVEKANANDHAN, S., MISRA, M., BHATIA, S. K., & MOHANTY, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. Progress in Polymer Science. 2013, vol. 38, nro.10, pp. 1653–1689.

Los polihidroxicanoatos tienen propiedades mecánicas y térmicas similares a plásticos convencionales como el polietileno y polipropileno, con ventajas como: producción a partir de fuentes renovables, reciclabilidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad. La principal barrera para su implementación son los altos costos de producción. Se han descubierto casi 150 monómeros distintos lo que se traduce en un amplio rango de potenciales

⁹ SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M., & SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of Polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. Biotechnology Advances.2007, vol. 25, nro.2, pp. 148-175.

¹⁰ CASTILLO, D. Efecto del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Sao Paulo: Pontificia Universidad Javeriana, 2008. 70p.

usos incluyendo contenedores, botellas, empaques, fibras, aplicaciones médicas, etc [8].

Existen 2 principales técnicas de extracción. La primera requiere del uso de solventes que modifican la permeabilidad de la membrana celular y disuelven el PHA, con este método se logra alta pureza pero se requieren grandes cantidades de sustancias químicas que podrían generar problemas de contaminación si no se da un manejo adecuado. El segundo método consiste en la digestión ya sea por agentes químicos o enzimas de todos los componentes celulares excepto el polímero. Su inconveniente en el caso del tratamiento químico es la baja pureza y en el uso de enzimas el alto costo del proceso¹¹.

1.2 ACTINOMICETOS

Son bacterias aerobias filamentosas en su mayoría Gram-positivas¹², las cuales se encuentran en diversos ambientes desde superficies rocosas y suelos ricos en humus hasta hojarasca y estiércol. Son mesófilos y crecen en temperaturas entre los 25°C y los 30°C. Mayoritariamente son heterótrofos y requieren pH neutros para un crecimiento óptimo¹³.

¹¹ GUMEL, A. M., ANNUAR, M. S. M., & CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*. 2013, vol. 21, nro.2, pp.580–605.

¹² MCNEIL, M., & BROWN, J. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994, vol. 7, nro.3, pp. 357- 417.

¹³ JIMÉNEZ, T. Los Actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal. Trabajo de grado microbiología. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2010. 37p.

Distintos géneros pertenecientes a los actinomicetos como *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* presentan acumulación de PHA¹⁴. Se han reportado rendimientos de hasta un 27% del polímero en peso seco para cepas nativas de actinomicetos¹⁵.

1.3 ROJO DE NILO

El Rojo de Nilo es un colorante que fluoresce intensamente en diferentes tonos cuando está en contacto con solventes orgánicos o lípidos hidrófobos a determinadas longitudes de onda¹⁶. Se utiliza en un método de tinción sensible para la detección de PHAs presentes en bacterias en estado de crecimiento. El método consiste en la aplicación directa del Rojo de Nilo en el medio de cultivo, de tal manera que la reacción entre el colorante y el polímero intracelular produce fluorescencia al ser expuesto a radiación UV¹⁷.

1.4 SÍNTESIS BACTERIANA DE POLIHIDROXIALCANOATOS

El microorganismo sintetiza estos compuestos cuando se encuentra expuesto a condiciones de estrés debido a la limitación de nutrientes esenciales y exceso en la fuente de carbono. El tipo de PHA formado depende del sustrato utilizado y de la infraestructura metabólica del microorganismo. La producción de PHAs

¹⁴ MATIAS, F., BONATTO, D., PADILLA, G., RODRIGUES, M. F. D. A., & HENRIQUES, J. A. P. Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009, vol. 55, nro.7, pp. 790–800.

¹⁵ FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. Op.cit.

¹⁶ GREENSPAN, P., MAYER, E. P., & FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*. 1985, vol. 100, nro.10, pp. 965–973.

¹⁷ SPIEKERMANN, P., REHM, B. H. A., KALSCHEUER, R., BAUMEISTER, D., & STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*. 1999, vol. 171, nro. 2, pp. 73–80.

de cadena corta comienza a partir de acetil-CoA y se lleva a cabo en una secuencia de tres reacciones catalizadas por las enzimas ketiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHA sintasa¹⁸. Existen 2 clases de PHA sintasa, que se distinguen por su afinidad ya sea por sustratos de cadena corta o media. En el caso de polímeros de cadena media la vía más común para la síntesis es la beta oxidación¹⁹. Cuando las condiciones de estrés desaparecen la bacteria utiliza este polímero de reserva²⁰; en el proceso de degradación intervienen varias enzimas despolimerasas. La ruta de síntesis y degradación del polihidroxiбутirato (PHB), el cual es el PHA más utilizado se encuentra en el ANEXO A.

1.5 PRODUCCIÓN DE PHAS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

La fuente de carbono empleada constituye un factor importante en la producción de PHAs, representando hasta 50% del costo total. En nuestro país la actividad agroindustrial tiene un alto impacto en la economía y al mismo tiempo genera grandes cantidades de desechos, por lo tanto el uso de estos residuos como materia prima para la producción de PHAs trae 2 ventajas: disminución del impacto ambiental ocasionado por su acumulación y reducción de costos del proceso²¹. Los residuos evaluados en este trabajo son: mucílago fermentado, efluentes del proceso de beneficio de palma africana y glicerol crudo.

El mucílago es un subproducto del café del cual Colombia es el cuarto productor a nivel mundial. El mucílago representa entre 20 y 22% del peso del

¹⁸ NARANJO VASCO, J. M. Op., cit.

¹⁹ CASTILLO, D. Op., cit.

²⁰ NARANJO VASCO, J. M. Op., cit.

²¹ NARANJO VASCO, J. M. Op., cit.

fruto y conforma una importante proporción de la carga orgánica potencial. Su remoción se hace mediante la fermentación natural en tanques o pilas, lo cual genera una corriente líquida de residuos conocida como mucílago fermentado²².

La industria de la palma africana es también muy representativa en nuestro país, y en su proceso de transformación se generan grandes cantidades de efluentes líquidos con carga orgánica que generalmente se tratan en lagunas. Se ha reportado que estos residuos son adecuados para la producción de PHAs por una variedad de 75 géneros aproximadamente de bacterias Gram positivas y Gram negativas ²³.

El glicerol crudo es un subproducto del proceso de transesterificación de aceites o grasas para producir biodiesel, se obtiene en una relación en peso de 1 a 10 (kg glicerol crudo/kg biodiesel). El incremento en la producción de biodiesel ha ocasionado la disminución del precio del glicerol crudo y generado problemas de acumulación del mismo²⁴. Para mitigar este impacto diversos estudios se han enfocado en la acumulación del polímero en microorganismos que usan como sustrato el glicerol crudo²⁵.

²² ANACAFE. Manejo de los subproductos del café, 2016. [En línea]. Disponible en: https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Caficultura_ManejoSubproductos#El_Mucilago

²³ HASSAN, M. A., YEE, L. N., YEE, P. L., ARIFFIN, H., RAHA, A. R., SHIRAI, Y., & SUDESH, K. Sustainable production of polyhydroxyalkanoates from renewable oil-palm biomass. *Biomass and Bioenergy*. 2013, vol. 50, pp.1–9.

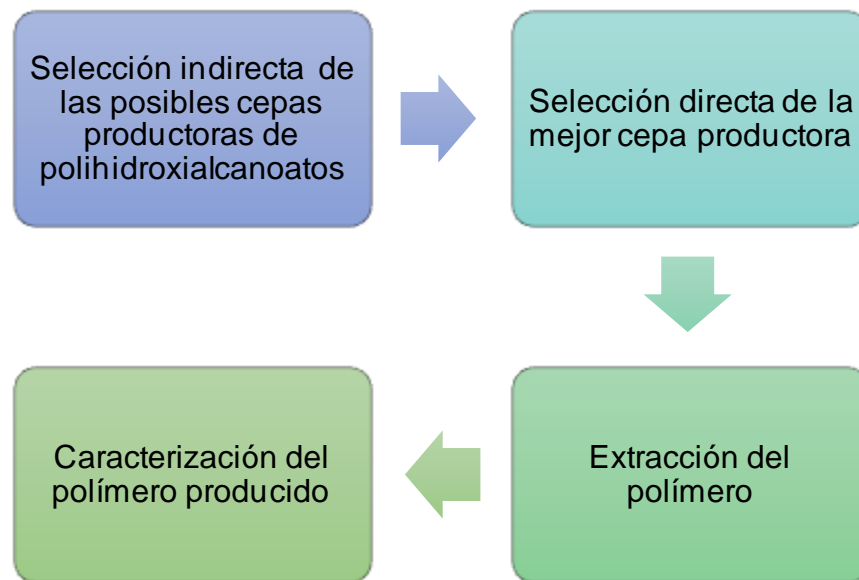
²⁴ NARANJO VASCO, J. M. Op., cit.

²⁵ BECERRA, M. Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. Tesis de maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 2013. 129p.

2. METODOLOGÍA

La metodología llevada a cabo se divide en cuatro etapas las cuales se muestran en la Figura 3.

Figura 3. Metodología experimental



2.1 CEPAS BACTERIANAS, FUENTES DE CARBONO Y MEDIOS DE CULTIVO

2.1.1 Cepas bacterianas. Se emplearon 20 cepas nativas aisladas en un trabajo de grado previo²⁶ procedentes del Grupo de investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) de la Universidad Industrial de Santander (ANEXO B). Las cepas fueron sembradas en medio selectivo para actinomicetos CYC.

²⁶ PEÑA GAMBOA, A.; HERNÁNDEZ TORRES, J. & SERNA DAZA, O. Op., cit.

Giraldo y Romero ²⁷ evaluaron la producción del polímero a partir de glicerol crudo para 12 cepas. En el presente trabajo se evaluaron las 8 cepas restantes en glicerol crudo y el total de 20 en mucílago de café fermentado y efluente de la industria del aceite de palma.

2.1.2. Fuentes de carbono. Las fuentes de carbono usadas son residuos agroindustriales de diferentes procedencias: glicerol crudo residuo de la producción de biodiesel, mucílago fermentado obtenido del beneficio húmedo del café y el efluente del proceso de beneficio de palma africana.

2.1.2.1 Glicerol crudo. El glicerol crudo fue proveído por Oleoflores S.A., empresa ubicada en Codazzi (Cesar) que realiza la cadena productiva del aceite de palma. Se obtiene como subproducto en el proceso de producción de biodiesel. Fue empleado sin ningún procesamiento.

2.1.2.2 Mucílago fermentado. El mucílago fermentado usado se obtuvo de una finca cafetera ubicada en el municipio de Los Santos, Santander. El mucílago fue separado del fruto mediante la fermentación natural en pilas, después se tamizó en serie usando mallas de 150 y 75 micrómetros (No.100 y 200) y se realizó la cuantificación de azúcares reductores totales.

2.1.2.3 Efluente de aceite de palma. El efluente proveniente de la planta de producción de Oleoflores S.A. se centrifugó a 5000 gravedades durante 2 minutos para eliminar los sólidos suspendidos presentes y se realizó la cuantificación de azúcares reductores totales (ART).

²⁷ GIRALDO, Y. & ROMERO, D. Selección de cepas nativas de Actinomicetos para la producción de Polihidroxialcanoatos. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015. 41 p.

2.1.3 Cuantificación de azúcares reductores totales. Se realizó con el fin de ajustar la composición de las fuentes de carbono en el medio de cultivo, los ART se cuantificaron usando el método colorimétrico de Miller (ANEXO C). Cuando se calienta el ácido 3,5 dinitro-salicílico este se reduce y cambia de color en contacto con azúcares reductores, permitiendo lecturas de densidad óptica por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm²⁸.

2.1.4 Medios de cultivo. Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 psi, 121° C durante 20 minutos. El precultivo se realizó en medio LB (ANEXO D) a temperatura ambiente y 180 rpm por 48 horas. Para la producción de PHAs se cultivaron las cepas (72 horas, 180 rpm, temperatura ambiente) usando el medio mínimo de sales - MSM (ANEXO B) con los diferentes residuos agroindustriales como fuente de carbono: 12,5 g/L de glicerol crudo (MSMGC), 15 g de ART /L para el mucílago fermentado (MSMMF) y 15 g de ART /L de efluente (MSME). El pH se ajustó a un valor de 7.

2.2 SELECCIÓN CUALITATIVA

Se realizó una selección cualitativa de las cepas potencialmente productoras de PHAs mediante la tinción con Rojo de Nilo en MSMGC, MSMMF, y MSME. Las cepas crecieron durante 72 horas a 30°C en cajas de Petri con una concentración de 1µg/ml Rojo de Nilo, colorante lipídico que permite visualizar la acumulación intracelular del polímero²⁹. Como controles positivos se usaron

²⁸ ÁVILA, R., RIVAS, B., HERNÁNDEZ, R., & CHIRINOS, M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*. 2012, vol.12, nro. 2, pp. 129–135.

²⁹ BERLANGA, M., MONTERO, M. T., FERNÁNDEZ-BORREL, J., & GUERRERO, R. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology*. 2006, vol. 9, nro.2, pp. 95–102.

2 cepas que producen PHAs a partir de glicerol crudo: ACPG13³⁰ y *Rhizobium meliloti*³¹ y como control negativo *Escherichia coli* la cual no produce PHAs³².

Se utilizó un Trasluminator UVP BioDocIt 220 Imagen System, en el cual las bacterias se expusieron a una longitud de onda de 302 nm y se tomaron como posibles productoras de polímero las que presentaron fluorescencia similar a los controles positivos. Este procedimiento se llevó a cabo en varias rondas de tamizado hasta seleccionar 2 cepas por cada residuo agroindustrial.

2.3 SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA

Se realizaron cultivos de las 6 cepas seleccionadas anteriormente en Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MSM con la fuente de carbono con la cual fueron seleccionados, durante 72 horas a 30°C y 180 rpm. Posteriormente se centrifugó a 10000 gravedades durante 6 minutos, se desechó el sobrenadante y la biomasa luego de ser secada en la incubadora a 37°C durante 12 horas, se sometió a análisis termogravimétrico (TGA) y metanólisis para posterior análisis por cromatografía acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Mediante el uso de estas técnicas se comprobó cuales cepas acumulan el polímero y se seleccionó la mejor cepa productora para cada residuo agroindustrial.

2.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA). El TGA fue efectuado con la Balanza Termogravimétrica Discovery TGA 1-0207 (TA Instruments, USA), esta técnica se basa en los cambios de masa de una muestra sometida a variaciones controladas de temperatura. Este método es usado en el estudio de reacciones

³⁰ GIRALDO, Y. & ROMERO, D. Op., cit.

³¹ BERMUDEZ, R. & ORDOÑEZ, M. Biosíntesis bacteriana de PHAs a partir de glicerol crudo. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2014. 41p.

³² BERMUDEZ, R. & ORDOÑEZ, M. Ibíd.

de descomposición de sólidos pero no permite conocer la composición química de la muestra³³. Talon y Berezina³⁴ probaron el TGA como método para estimar la producción de PHAs con muestras de biomasa seca (sin extracción) basados en la diferencia entre las temperaturas de degradación del polímero y los demás componentes de la célula. El programa de temperatura utilizado en este proyecto puede encontrarse en el ANEXO E.

2.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se realiza para confirmar la presencia del polímero en la célula. Este análisis permite identificar la composición monomérica del polímero; se requiere realizar previamente la metanólisis del polímero para obtener los ésteres metílicos que componen el PHA³⁵. La metodología detallada se encuentra en el ANEXO F. Se realizó el análisis con el cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, USA) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C VL MSD con detector de triple eje. El método detallado se encuentra en el ANEXO G.

2.3.3 Curva de crecimiento. Se evaluó el crecimiento de la cepa ACPG16B en MSMGC. Para ello se registró la densidad óptica (DO) a 600 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS 1800 (Shimadzu, Japón). Se calculó el volumen de precultivo necesario para inocular 100 ml del MSM con un DO inicial de 0,1. Los cultivos se realizaron a temperatura ambiente y 180 rpm. Se realizaron las respectivas mediciones de DO por triplicado a diferentes intervalos hasta las 72 horas.

³³ RODRÍGUEZ, E. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. Métodos Y Materiales.2012, vol.2, pp. 26–32.

³⁴ TALON, O. & BEREZINA, N. Method for rapid control of bacterial PHA production through thermogravimetric analysis. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2011, vol. 86, nro.9, pp. 1195–1197.

³⁵ GONZÁLEZ GARCÍA, Y., CONTRERAS, M., Carlos, J., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. Op. Cit.

2.4 EXTRACCIÓN DEL POLÍMERO

2.4.1 Protocolo de extracción. Se realizaron cultivos de 1 L en MSMGC de la cepa ACPG16B. Se realizó la extracción del polímero tomando como referencia el método usado por Panigrahi y Bavdeli³⁶, el cual consiste en agregar hipoclorito de sodio comercial para realizar la digestión de todos los componentes de la célula excepto el polímero, centrifugar y descartar el sobrenadante. Posteriormente los gránulos del polímero se disolvieron en cloroformo caliente. La metodología de extracción detallada se encuentra en el ANEXO H.

2.4.2 Prueba de solubilidad. Para conocer el tiempo y temperatura óptimos para disolver el polímero en cloroformo se llevó a cabo una prueba de solubilidad usando Poli[(R)-3-ácido hidroxibutírico] comercial (Sigma-Aldrich, USA). Se agregaron 0,1 g y 0,06 g del polímero en 3 mL de cloroformo en tubos de ensayo herméticos, manteniéndolos en agitación constante y con revisión periódica cada 30 minutos a 2 temperaturas distintas (37° C, 55°C).

2.4.3 Elaboración de láminas del polímero. 5 mL de cloroformo con el polímero obtenido disuelto fueron filtrados a través de un papel filtro con diámetro de poro de 11µm, posteriormente la solución de polímero en cloroformo se vertió en cajas de Petri y se dejó evaporar el cloroformo quedando como resultado la formación de películas del polímero. Pesando primero la biomasa seca y posteriormente las láminas obtenidas, se pudo cuantificar el rendimiento expresado en gramos de polímero por litro de cultivo y gramos de polímero por gramos de biomasa seca. El cálculo del rendimiento se evaluó por duplicado.

³⁶ PANIGRAHI, S. & BADVELI, U. Screening, Isolation and Quantification of PHB- Producing Soil Bacteria. International Journal of Engineering Science Invention. 2013, vol. 2, nro. 9, pp. 1–6.

2.5 CARACTERIZACIÓN DE PHAs

2.5.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). El DSC permite determinar propiedades tales como temperatura de transición vítrea y punto de fusión. Se empleó el equipo Discovery DSC 1-0237 en modo estándar. Se evaluaron las láminas del polímero extraído y láminas realizadas con Poli[(R)-3-ácido hidroxibutírico] comercial (Sigma-Aldrich, USA). Se requiere introducir al programa el peso de la muestra y del pan hermético, se utiliza un programa de calentamiento-enfriamiento-calentamiento. Los detalles de la operación del equipo se encuentran en el ANEXO I.

2.5.2 Análisis termogravimétrico (TGA). La estabilidad térmica del polímero se analizó usando la Balanza Termogravimétrica Discovery TGA 1-0207(TA Instruments, USA). La muestra fue calentada desde 30 °C hasta 500° C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se determinó la temperatura de degradación del polímero extraído y del PHB comercial.

2.5.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se utiliza para detectar los grupos funcionales característicos de los PHAs. Para llevar a cabo este análisis, se preparó una pastilla pulverizando la muestra del polímero en un mortero de ágata añadiendo KBr. El análisis de la pastilla se realizó en el espectrómetro FTIR-A8400S (Shimadzu, Japón) en el modo de transmitancia en el rango de infrarrojo medio (4000 a 400 cm^{-1}).

2.5.4 Análisis Mecánico Diferencial (DMA). Algunas propiedades mecánicas del polímero extraído de la cepa ACPG16B fueron evaluadas usando un analizador mecánico diferencial DMA Q800 (TA Instruments, USA). Láminas rectangulares de 35 mm de largo, 5.42 mm de ancho y 0.05 mm de espesor

fueron evaluadas bajo el modo de tensión hasta obtener la ruptura de las mismas.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

De la prueba de azúcares reductores totales se obtuvieron valores de 54,8 g de ART/L para el efluente de la industria del aceite de palma y de 1 g de ART/L para el mucílago fermentado. Los valores de pH fueron: 6.14 para el glicerol crudo, 3.65 para el mucilago fermentado y 3.86 para el efluente.

3.2 SELECCIÓN CUALITATIVA

Esta selección se llevó a cabo durante tres rondas de tamizado. Para el mucílago fermentado y efluente de aceite de palma se partió de las 20 cepas. De la primera ronda 11 cepas mostraron una fluorescencia similar a la del control positivo en mucílago y 12 para el efluente. De la segunda ronda se seleccionaron 5 cepas para cada sustrato y de la tercera ronda se escogieron 2 cepas cada sustrato.

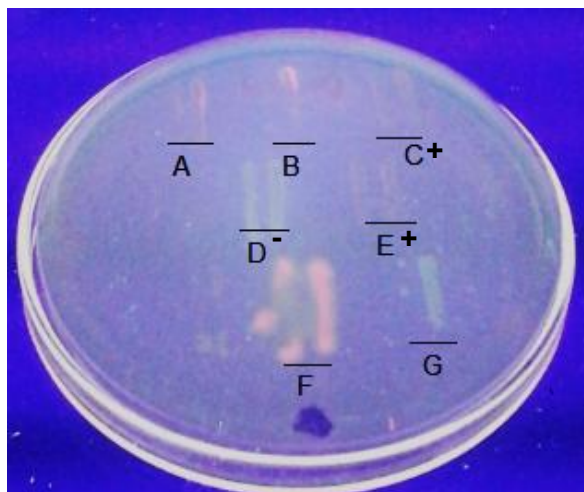
Para las pruebas con glicerol crudo se tuvo en cuenta el trabajo previo realizado por Giraldo y Romero³⁷ quienes evaluaron 12 de las 20 cepas, en el presente trabajo se evaluaron las 8 cepas restantes. Se escogieron 5 cepas por comparación con los controles, finalmente se seleccionaron 2.

En la Figura 4 se muestra la selección cualitativa con Rojo de Nilo en platos de agar con medio MSM y glicerol crudo como fuente de carbono. La posición D⁻ corresponde al control negativo *E. coli*, las posiciones C⁺ y E⁺ corresponden a

³⁷ GIRALDO, Y. & ROMERO, D. Op., cit.

los controles positivos *R. meliloti* y ACPG13, respectivamente. Se observan con mayor fluorescencia las cepas ACPG6 y ACPG16B identificadas con las letras B y F, por lo tanto son las dos escogidas para usar glicerol crudo como sustrato.

Figura 4. Selección de cepas productoras de PHA con tinción de Rojo de Nilo.



La selección cualitativa arrojó como resultado 6 cepas posibles productoras de PHAs para los diferentes sustratos (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados finales de la selección cualitativa

Residuo Agroindustrial	Cepas seleccionadas
Efluente de aceite de palma	ACPG3, ACPG16A
Glicerol crudo	ACPG16B, ACPG6
Mucilago fermentado	ACPG3, ACPG11

Spiekermann destaca las ventajas de la tinción con Rojo de Nilo por ser un método que detecta cantidades muy pequeñas de PHAs de una forma rápida, siendo muy útil en la selección de cepas potencialmente productoras³⁸. Sin embargo este procedimiento no es totalmente efectivo, ya que el colorante puede formar complejos fluorescentes con compuestos de naturaleza lipídica distintos al polímero dando lugar a falsos positivos³⁹. Es necesario comprobar mediante otras técnicas la presencia del polímero.

3.3 SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA

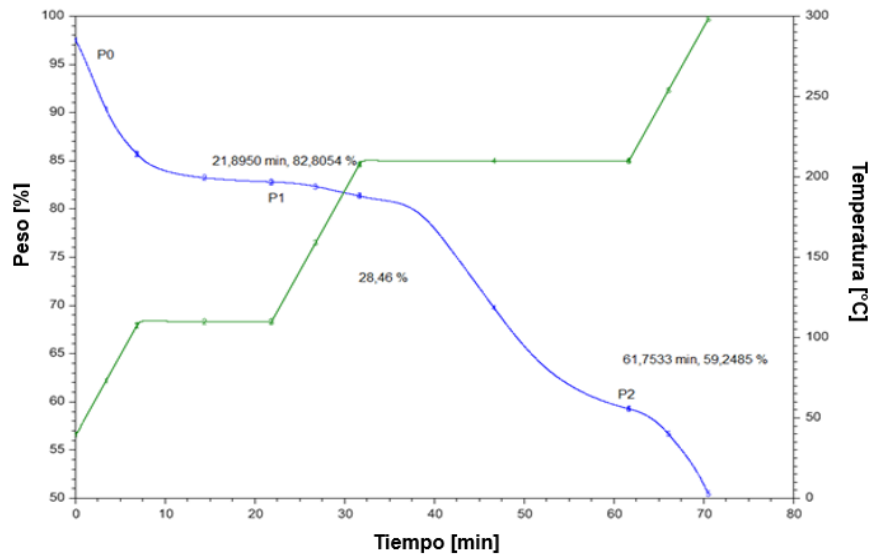
3.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA). El análisis realizado se muestra en la Figura 5. Debido a la diferencia entre las temperaturas de degradación del polímero y los demás componentes celulares podemos observar tres intervalos. Entre los puntos P0 y P1 se observa la pérdida de humedad de la muestra, entre P1 y P2 hay pérdida de masa por la degradación térmica del polímero, después del punto P2 se degradan los demás componentes celulares⁴⁰.

³⁸ SPIEKERMANN, P., REHM, B. H. A., KALSCHEUER, R., BAUMEISTER, D., & STEINBÜCHEL, A. Op.,cit.

³⁹ SÁNCHEZ, S. A., MORA, A. L., MARÍN MONTOYA, M. A., & YEPES, M. Identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in soils contaminated with fique wastes. Rev. Colomb. Biotecnol. 2012, vol. 14, nro.2, pp. 89–100.

⁴⁰ TALON, O. & BEREZINA, N. Op., cit.

Figura 5. Pérdida de peso de una muestra de ACPG16B en MSMGC (línea azul) y programa de temperatura utilizado (línea verde)



El PHB contenido en las células puede ser obtenido a través de la fórmula⁴¹:
 $Y(P/X) = (P1 - P2)/P1$. De acuerdo al TGA, el valor máximo de acumulación del polímero dentro de la célula entre las 6 cepas fue de 28,46%, el cual corresponde a la cepa ACPG16B la cual pertenece al género *Rhodococcus*. Este valor es cercano al 27,48% reportado para producción de PHAs con actinomicetos⁴².

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

El análisis cromatográfico permite determinar la presencia de los monómeros de los PHAs obtenidos en la metanólisis⁴³. De las 6 cepas evaluadas sólo la

⁴¹ TALON, O. & BEREZINA, N. Op., cit.

⁴² FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. Op.cit.

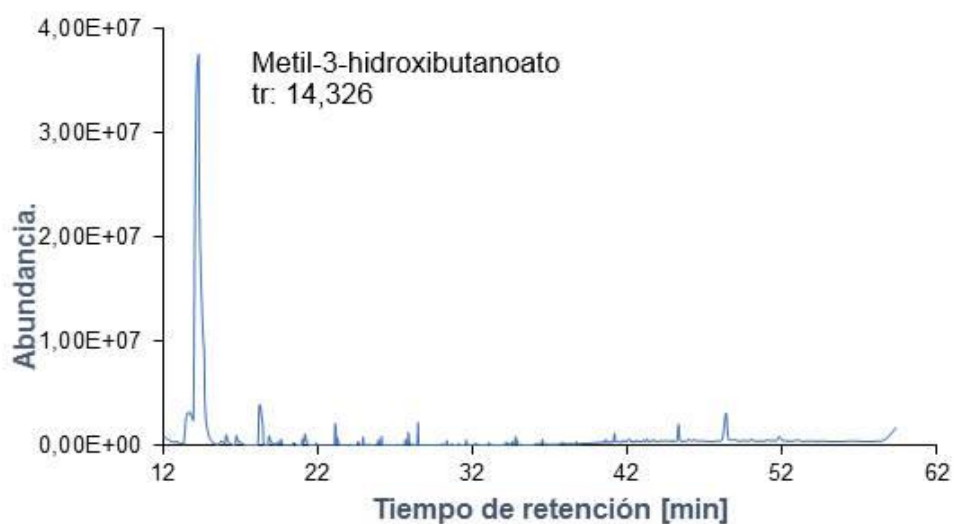
⁴³ CUI, Y., BARFORD, J. P., & RENNEBERG, R. Gas Chromatographic Determination of Poly(3-hydroxybutyrate) with Alkaline Hydrolysis and Acid Esterification. Analytical Letters. 2007, vol. 40, pp. 2915–2924.

cepa ACPG16B presentó el pico correspondiente al metil-3-hidroxi-butanoato, unidad del PHB. Estos espectros se muestran en la Figura 6.

Figura 6. Espectros GC-MS a) Masa celular seca de la cepa ACPG16B b) Polímero extraído de la cepa ACPG16B c) PHB comercial.

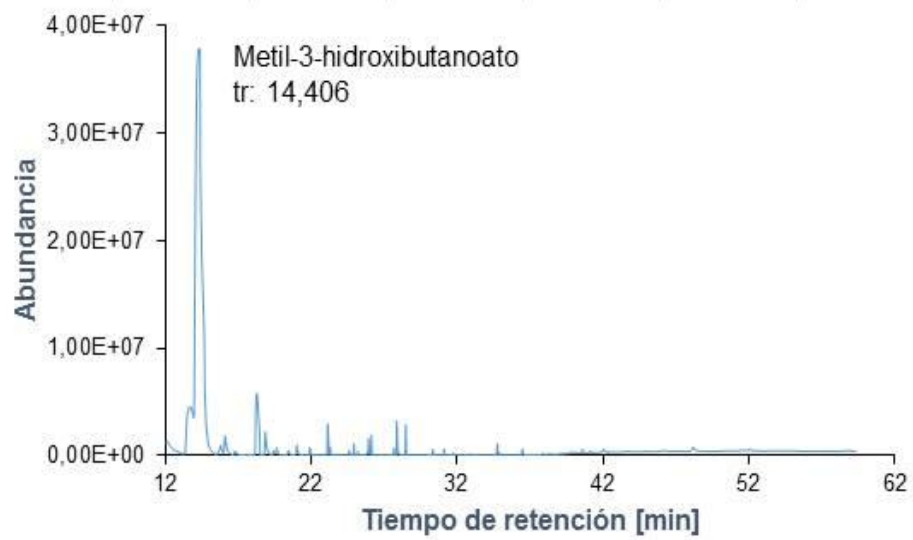


(a)



(b)

Figura 6. (Continuación)

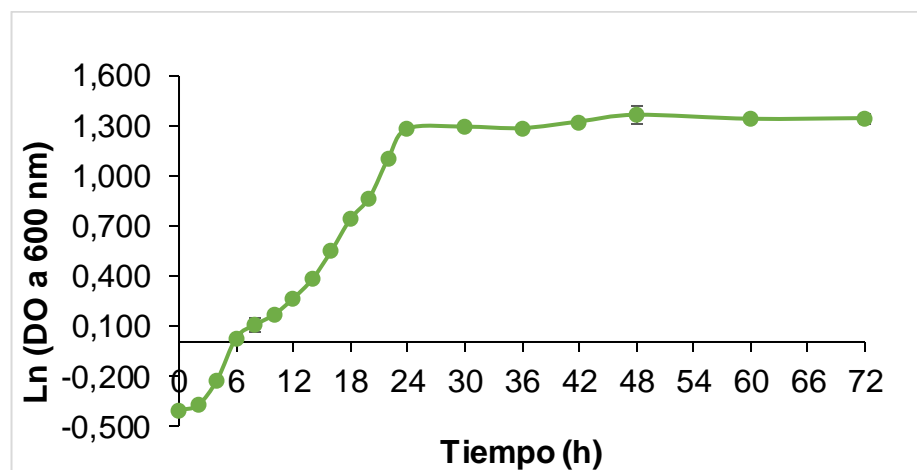


(c)

El pico más abundante corresponde al metil-3-hidroxi-butanoato, el cual se observa en un tiempo de retención similar en todos los espectros.

3.3.3 Curva de crecimiento. La curva de crecimiento obtenida para la cepa ACPG16B usando como sustrato glicerol crudo se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Crecimiento de ACPG16B en MSMGC



Gráficamente se puede apreciar que durante las primeras 24 horas se presenta la fase de crecimiento exponencial, la velocidad específica de crecimiento fue de $0,081 \text{ h}^{-1}$. Desde las 24 hasta las 72 horas las bacterias se encuentran en una fase estacionaria.

3.4 EXTRACCIÓN DEL POLÍMERO

De la prueba de solubilidad se obtuvo que es necesaria una temperatura de 55°C durante 2 horas para disolver completamente el polímero en cloroformo. Luego de realizar el protocolo descrito en la sección 2.4, se obtuvieron láminas de polímero como puede verse en la Figura 8.

Se calculó el rendimiento pesando por duplicado la biomasa seca y las láminas obtenidas, obteniendo valores promedio de $0,108 \pm 0,007 \text{ g PHB /L}$ de cultivo y $0,253 \pm 0,021 \text{ g PHB /g}$ de biomasa seca (25,3 %). Este valor es inferior al rendimiento de 38% en peso reportado para la producción de PHB con otra bacteria del género *Rhodococcus* en MSM⁴⁴.

Figura 8. Lámina de PHB extraído de la cepa ACPG16B.

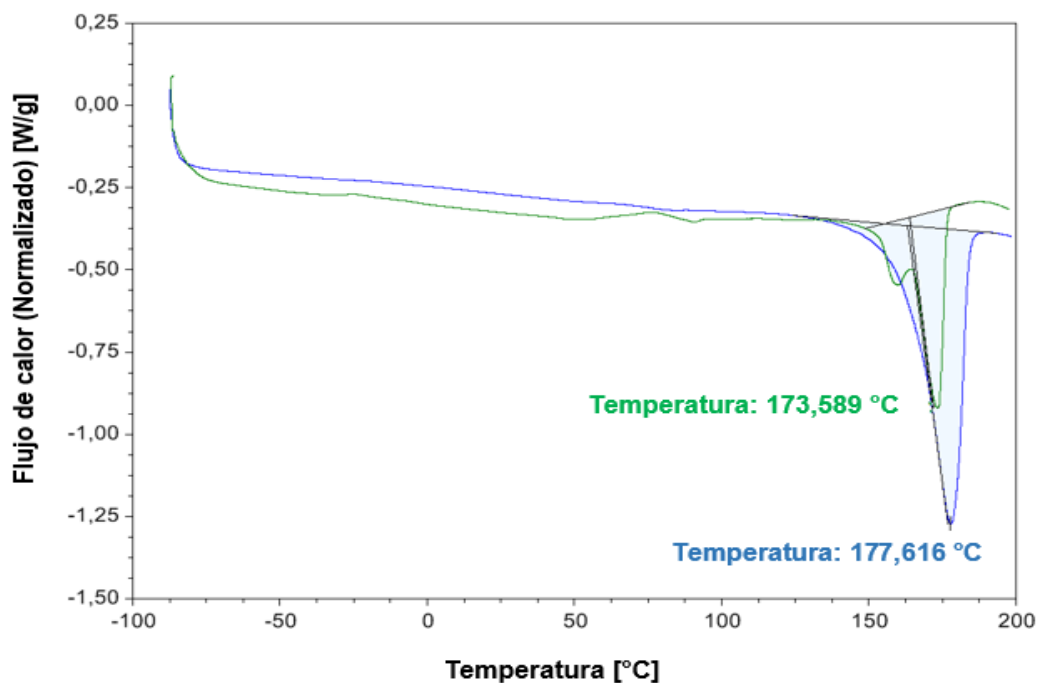


⁴⁴ ALTAEE, N., FAHDIL, A., YOUSIF, E., & SUDESH, K. Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil. *Journal of Taibah University for Science*. 2016, vol.10, nro.19, pp.543-550.

3.5 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PRODUCIDO

3.5.1 Calorimetría diferencial de barrido. Se realizó la prueba de DSC a las láminas del polímero comercial y del polímero extraído de la cepa ACPG16B. En la Figura 9 observa claramente el pico correspondiente a la temperatura de fusión del polímero.

Figura 9. Termograma DSC polímero extraído (verde) y del polímero comercial (azul)



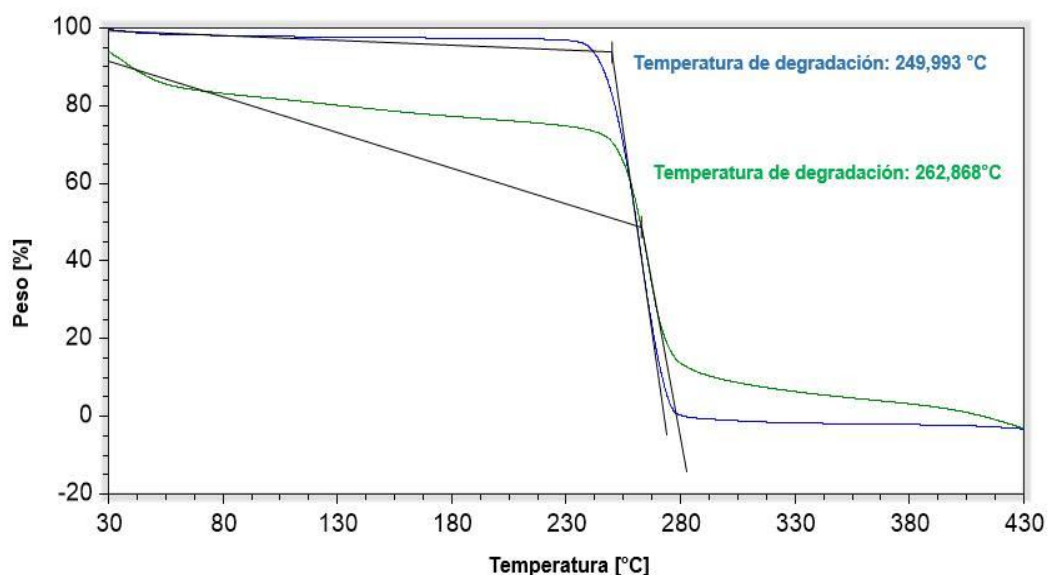
El polímero comercial presenta una temperatura de fusión de 177,6° C. El polímero extraído de la cepa ACPG16B presenta una temperatura de fusión de 173,6°C similar al valor reportado de 173 °C para la temperatura de fusión de PHB producido por una cepa de actinomiceto⁴⁵. La forma del pico en la muestra

⁴⁵ SHRISVASTAV, A., MISHRA, S. K., PANCHHA, I., JAIN, D., BHACATTACHARY, S., PATEL, S., & MISHRA, S. Biodegradability studies of polyhydroxyalkanoate (PHA) film produced by a marine bacteria using *Jatropha* biodiesel byproduct as a substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.2011, vol. 27, nro.7, pp. 1531– 1541

del polímero extraído se debe a la presencia de componentes distintos al polímero que no pudieron ser eliminados durante el proceso de extracción.

3.5.2 Análisis termogravimétrico. El análisis con TGA se representa en la Figura 10. La temperatura de degradación se obtiene con el análisis de los resultados realizado por el software.

Figura 10. Termograma del polímero extraído (verde) y polímero comercial (azul)

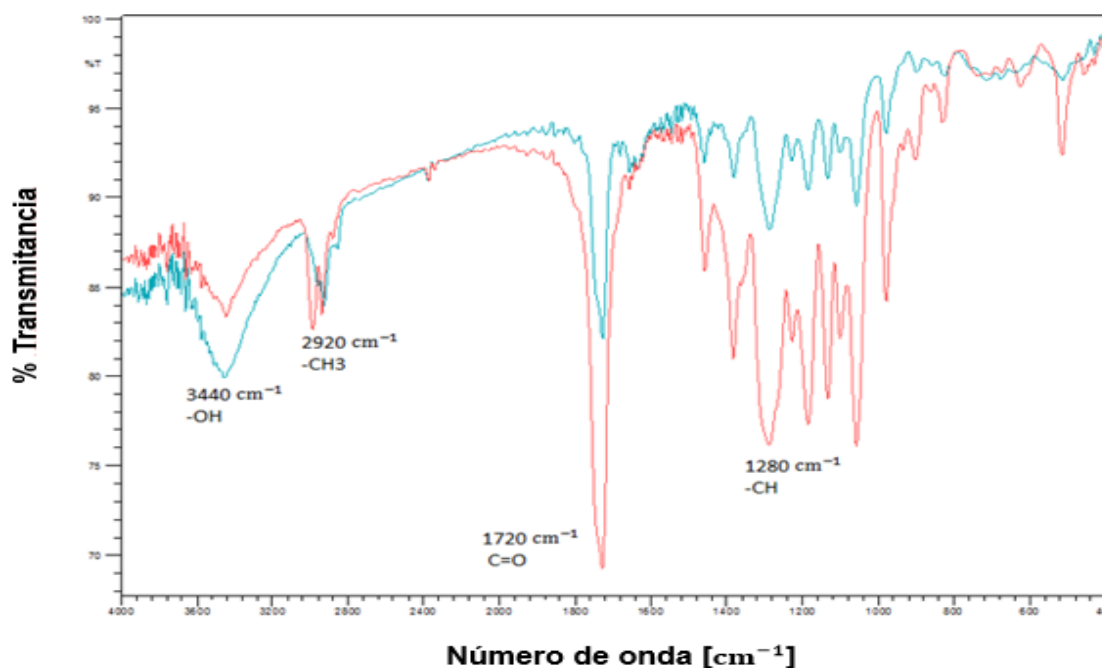


La degradación del polímero comercial inicia aproximadamente a los 250 °C y termina en 286° C. El polímero extraído de la cepa se degrada a partir de los 262.8°C y tiene una temperatura máxima de degradación de 430 °C, estos resultados se pueden comparar con las temperaturas de 274,12 °C y 410 °C reportados para la descomposición de PHB producido por *Ralstonia eutropha*⁴⁶.

⁴⁶ ROJAS, E., Hoyos, J. Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial. 2016, vol. 14, pp.19–26.

3.5.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). El espectro infrarrojo obtenido de las láminas del polímero comercial y del polímero extraído de la cepa ACPG16B se observa en la Figura 11. Al comparar el espectro del polímero comercial con el polímero extraído se observa la presencia de picos característicos reportados en la literatura. Los dos picos más importantes son el ubicado en $1720\text{ [cm}^{-1}\text{]}$ correspondiente al grupo funcional éster carbonilo y el pico ubicado en $1280\text{ [cm}^{-1}\text{]}$ correspondiente al grupo -CH .

Figura 11. Espectro IR del polímero extraído (azul) y del PHB comercial (rojo)



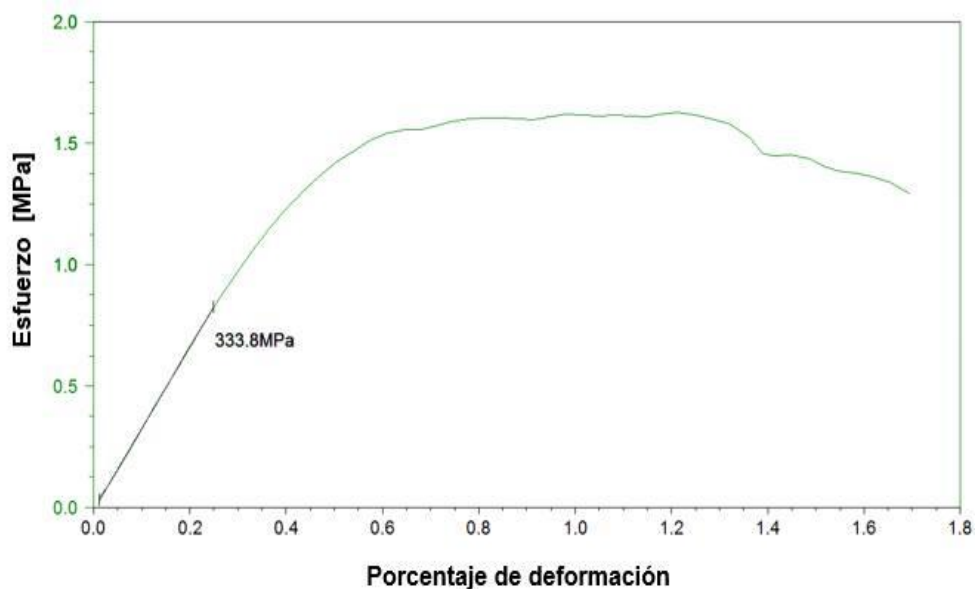
Adicionalmente las bandas entre $1000\text{ y }1300\text{ [cm}^{-1}\text{]}$ corresponden al ensanchamiento del enlace C-O del grupo éster, mientras que la banda a $2920\text{ [cm}^{-1}\text{]}$ indica la presencia de un grupo metilo⁴⁷. Estos resultados confirman que el polímero extraído es PHB.

⁴⁷RAMEZANI, M., AMOOZEGAR, M. A., & VENTOSA, A. Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhoooni Wetland in Iran and

3.5.4 Análisis Mecánico Diferencial (DMA). Se evaluaron láminas del polímero extraído en el modo de tensión. La curva esfuerzo - deformación obtenida se muestra en la Figura 12.

El módulo de Young es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, se puede obtener como la pendiente de la recta que corresponde a la región elástica en la curva esfuerzo- deformación.

Figura 12. Curva esfuerzo - deformación para el polímero extraído.



Para el caso del polímero extraído se obtuvo un valor para el módulo de Young de 333.8 MPa. Este valor difiere considerablemente del reportado por Sudesh de 3.5 GPa⁴⁸. Esta diferencia puede explicarse debido a problemas para obtener una lámina del polímero que cumpliera con las características mencionadas en la norma técnica ASTM D638, la cual estandariza los ensayos de tensión para polímeros.

evaluation of poly- β -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas sp.* GK1. *Annals of Microbiology*.2015, vol. 65, nro.1, pp. 517–526.

⁴⁸ SUDESH, K., ABE, H., & DOI, Y. Op., cit.

CONCLUSIONES

-La cepa nativa ACPG16B perteneciente al género *Rhodococcus* sintetiza PHB usando glicerol crudo como fuente de carbono.

-El PHB sintetizado por la cepa ACPG16B puede ser extraído y laminado con un proceso de digestión con hipoclorito de sodio de la masa celular seca y posterior solubilización en cloroformo de los gránulos del polímero.

-Las propiedades térmicas obtenidas de la caracterización del polímero extraído: temperatura de fusión y temperatura de descomposición, coinciden con valores reportados en la literatura para producción de PHB.

BIBLIOGRAFIA

GIRALDO, Y. & ROMERO, D. Selección de cepas nativas de Actinomicetos para la producción de Polihidroxicanoatos. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015. 41 p.

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. 2013, vol. 29, nro. 1, pp.77-115.

NARANJO VASCO, J. M. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. Tesis de maestría. Caldas: Universidad Nacional de Manizales. Grupo de Investigación de procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos, 2010. 127p.

PANIGRAHI, S. & BADVELI, U. Screening, Isolation and Quantification of PHB-Producing Soil Bacteria. International Journal of Engineering Science Invention. 2013, vol. 2, nro. 9, pp. 1–6.

PEÑA GAMBOA, A.; HERNÁNDEZ TORRES, J. & SERNA DAZA, O. Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico. Trabajo de grado Biología. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. 2015. 43p.

SPIEKERMANN, P., REHM, B. H. A., KALSCHEUER, R., BAUMEISTER, D., & STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for

direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. Archives of Microbiology. 1999, vol. 171, nro. 2, pp. 73–80.

CITAS

ALTAEE, N., FAHDIL, A., YOUSIF, E., & SUDESH, K. Recovery and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate from *Rhodococcus equi* cells grown on crude palm kernel oil. Journal of Taibah University for Science. 2016, vol.10, nro.19, pp.543-550.

ANACAFE. Manejo de los subproductos del café, 2016. [En línea]. Disponible en:

https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Caficultura_ManejoSubproductos#El_Mucilago

ÁVILA, R., RIVAS, B., HERNÁNDEZ, R., & CHIRINOS, M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. Multiciencias.2012, vol.12, nro. 2, pp. 129–135.

BECERRA, M. Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. Tesis de maestría. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 2013. 129p.

BERLANGA, M., MONTERO, M. T., FERNÁNDEZ-BORREL, J., & GUERRERO, R. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-

producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology*. 2006, vol. 9, nro.2, pp. 95–102.

BERMUDEZ, R. & ORDÓÑEZ, M. Biosíntesis bacteriana de PHAs a partir de glicerol crudo. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2014. 41p.

CASTILLO, D. Efecto del gen *fadH1* en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Sao Paulo: Pontificia Universidad Javeriana, 2008. 70p.

CUI, Y., BARFORD, J. P., & RENNEBERG, R. Gas Chromatographic Determination of Poly(3-hydroxybutyrate) with Alkaline Hydrolysis and Acid Esterification. *Analytical Letters*. 2007, vol. 40, pp. 2915–2924.

FRANCO-CORREA, M., GÓMEZ-MÉNDEZ, D., CASTRO-MEDINA, N., & RENDÓN-RUIZ, M. Polihidroxialcanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos, *Revista Peruana de Biología*. 2009, vol. 16, pp. 115-118.

GREENSPAN, P., MAYER, E. P., & FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*. 1985, vol. 100, nro.10, pp. 965–973.

GUMEL, A. M., ANNUAR, M. S. M., & CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*. 2013, vol. 21, nro.2, pp.580–605.

HASSAN, M. A., YEE, L. N., YEE, P. L., ARIFFIN, H., RAHA, A. R., SHIRAI, Y., & SUDESH, K. Sustainable production of polyhydroxyalkanoates from renewable oil-palm biomass. *Biomass and Bioenergy*. 2013, vol. 50, pp.1–9.

JIMÉNEZ, T. Los Actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal. Trabajo de grado microbiología. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2010. 37p.

MATIAS, F., BONATTO, D., PADILLA, G., RODRIGUES, M. F. D. A., & HENRIQUES, J. A. P. Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009, vol. 55, nro.7, pp. 790–800.

MCNEIL, M., & BROWN, J. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994, vol. 7, nro.3, pp. 357- 417.

PIEPER, U., & STEINBIICHEL, A. Identification, cloning and sequence analysis of the Poly (3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. *FEMS Microbiology Letters*.1992, vol. 96, pp. 73–80.

RAMEZANI, M., AMOOZEGAR, M. A., & VENTOSA, A. Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly- β -hydroxybutyrate

production by halotolerant bacterium *Oceanimonas sp.* GK1. *Annals of Microbiology*.2015, vol. 65, nro.1, pp. 517–526.

REDDY, M., VIVEKANANDHAN, S., MISRA, M., BHATIA, S. K., & MOHANTY, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*. 2013, vol. 38, nro.10, pp. 1653–1689.

RODRÍGUEZ, E. Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos Y Materiales*.2012, vol.2, pp. 26–32.

ROJAS, E., Hoyos,J. Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*. 2016, vol. 14, pp.19–26.

SÁNCHEZ, S. A., MORA, A. L., MARÍN MONTOYA, M. A., & YEPES, M. Identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in soils contaminated with fique wastes. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2012, vol. 14, nro.2, pp. 89–100.

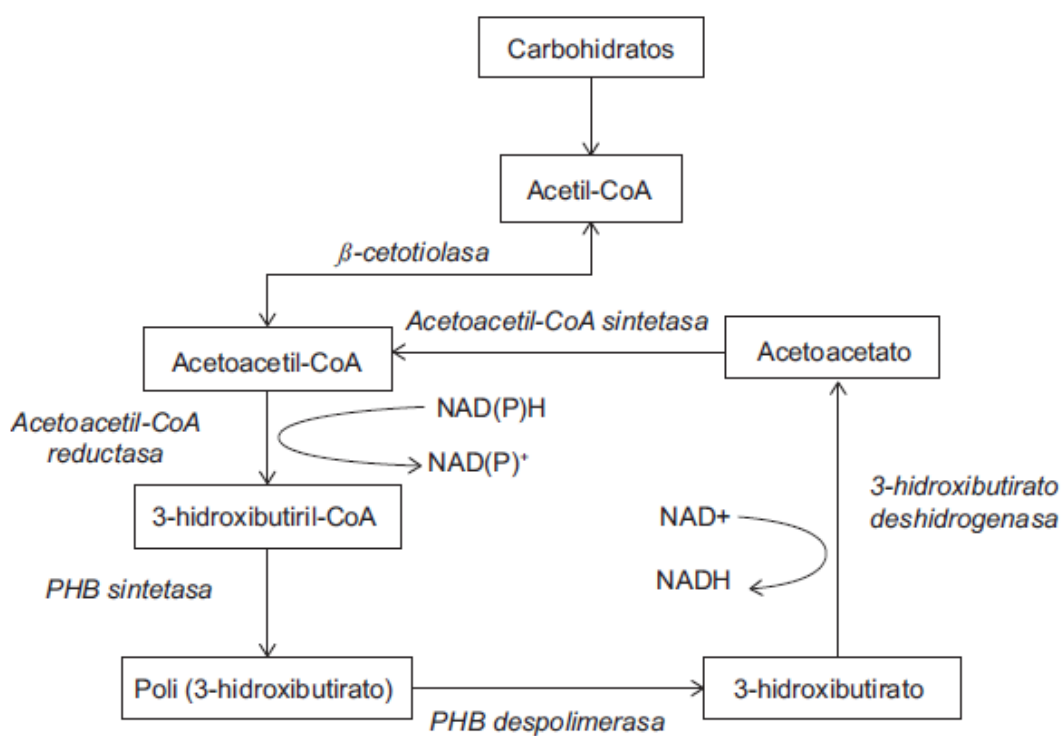
SHRISVASTAV, A., MISHRA, S. K., PANCHA, I., JAIN, D., BHACATTACHARY, S., PATEL, S., & MISHRA, S. Biodegradability studies of polyhydroxyalkanoate (PHA) film produced by a marine bacteria using *Jatropha* biodiesel byproduct as a substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.2011, vol. 27, nro.7, pp. 1531– 1541.

SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M., & SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of Polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. *Biotechnology Advances*.2007, vol. 25, nro.2, pp. 148-175.

TALON, O. & BEREZINA, N. Method for rapid control of bacterial PHA production through thermogravimetric analysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2011, vol. 86, nro.9, pp. 1195–1197.

ANEXOS

ANEXO A. RUTA METABOLICA DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE PHB



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

ANEXO B. CEPAS Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Las cepas fueron aisladas e identificadas morfológica y molecularmente en un trabajo de grado previo⁴⁹, para algunas cepas no fue posible su identificación.

Tabla B1. Asignación taxonómica de las cepas del phylum Actinobacteria

Cepa	Género más cercano
ACPG1	<i>Micrococcus</i>
ACPG2	<i>Streptomyces</i>
ACPG3	<i>Micrococcus</i>
ACPG4	<i>Nocardiosis</i>
ACPG5	<i>Nocardiosis</i>
ACPG6	<i>Microbacterium</i>
ACPG7	<i>Micrococcus</i>
ACPG8	No identificada
ACPG9	<i>Cellulomonas</i>
ACPG10	<i>Cellulomonas</i>
ACPG11	No identificada
ACPG12	<i>Micrococcus</i>
ACPG13	<i>Arthrobacter</i>
ACPG14	<i>Streptomyces</i>
ACPG15	No identificada
ACPG16A	No identificada
ACPG16B	<i>Rhodococcus</i> *
ACPG17	<i>Cellulomonas</i>
ACPG18	No identificada
ACPG19	No identificada
ACPG20	<i>Streptomyces</i>

Fuente: PEÑA , A.; HERNÁNDEZ , J. & SERNA DAZA, O. Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico. Trabajo de grado Biología. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. 2015. 43p.

⁴⁹ PEÑA GAMBOA, A.; HERNÁNDEZ TORRES, J. & SERNA DAZA, O. Op., cit.

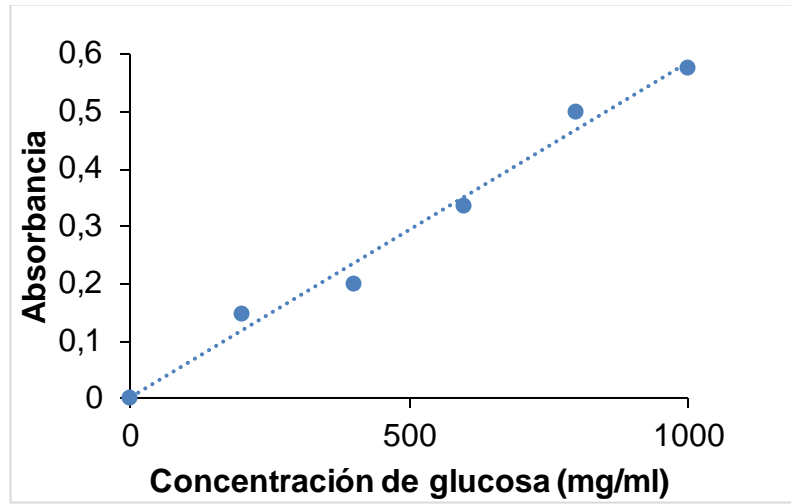
El sistema de nomenclatura son las iniciales del biólogo que aisló las cepas seguido de un número de identificación asignado. La cepa ACPG16B fue identificada en un trabajo del grupo CINBIN (aun sin publicar) dirigido por la bióloga Oriana Serna.

ANEXO C. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

Para la cuantificación de azúcares reductores totales se usó el protocolo tomado del artículo de Ávila [19] el cual consiste en:

1. Realizar la curva de calibración preparando 5 muestras que contengan concentraciones de glucosa en un rango de 200 a 1000 mg/L. Se debe utilizar una muestra denominada "Blanco" con una concentración de 0 mg/L de glucosa.
2. Mezclar 0,5 mL de cada una de las muestras preparadas anteriormente con 0,5 mL del reactivo DNS almacenado.
3. Ebulir por 5 minutos en baño de María e inmediatamente detener la reacción con baño de agua y hielo.
4. Agregar 5mL de agua destilada a cada muestra.
5. Agitar y dejar en reposo por 15 min.
6. Determinar la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
7. Realizar el procedimiento anterior por triplicado.
8. Preparar las muestras de mucílago y efluente, repitiendo los pasos anteriormente descritos. Diluir las muestras en caso de que la absorbancia sea mayor a 1.

Figura C1. Curva de calibración con glucosa



ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVO

Tabla D1. Medio Luria Bertani (LB)

Componente	Concentración (g/L)
Triptona	10,00
NaCl	10,00
Extracto de Levadura	5,00
Agar (para medio sólido)	15,00

Tabla D2. Medio mínimo de sales (MSM)

Componente	Concentración (g/L)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,70
NaCl	10,00
KH_2PO_4	1,50
NH_4Cl	0,10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01
Citrato de amonio ferroso	0,06
Elementos traza:	1,00 mililitro
- H_3BO_3	0,30
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01

Fuentes de Carbono MSM

MSMGC: 12,15 g de glicerol crudo / litro de medio

MSMMF: 1 litro de mucílago/ litro de medio

MSME: 183 mL de efluente/ litro de medio

Tabla D3. Medio selectivo para Actinobacterias (CYC)

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	30,00
Nitrato de sodio	3,00
Sulfato de magnesio	0,50
Cloruro de potasio	0,50
Sulfato de hierro (III)	0,01
Fosfato dipotásico	1,00
Extracto de levadura	2,00
Casaminoácidos	6,00
Agar	15,00

ANEXO E. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

1. Se tomaron muestras de los cultivos luego de 3 días, utilizando tubo Eppendorf de 2 ml. Las muestras se tomaron centrifugando a 15000 gravedades durante 3 minutos y retirando el sobrenadante hasta obtener un pellet apreciable.

2. La muestra puede ser almacenada a -20°C por varios días sin sufrir ningún cambio.

3. El programa de temperatura usado para cuantificar el polímero intracelular fue:

- Equilibrar la temperatura a 30°C .
- Rampa de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 110°C .
- Isotherma durante 15 min.
- Rampa de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 210°C .
- Isotherma durante 30 min.
- Rampa de calentamiento de 10°C hasta 500°C .

ANEXO F. METODOLOGÍA DE METANÓLISIS

1. Agregar 15 mg de biomasa a un tubo de ensayo de 12 ml, posteriormente agregar 1,7 ml de metanol, 0,3 ml de ácido sulfúrico y 2 ml de cloroformo. Es necesario asegurarse que la biomasa y el tubo de ensayo se encuentren secos debido a la violenta reacción entre el ácido sulfúrico y el agua.
2. Agitar con vórtex para asegurar el contacto entre ambas fases.
3. Realizar el montaje de los tubos en baño de agua a una temperatura de 100°C por 140 min, supervisando periódicamente el nivel del agua de calentamiento. Después de transcurrido el tiempo de reacción se enfrían los tubos de ensayo rápidamente reemplazando el agua caliente por agua a temperatura ambiente.
4. Agregar 1 mililitro de agua destilada autoclavada a cada tubo de ensayo y agitar mediante vórtex para favorecer la separación de las 3 fases: metanol en la fase superior, restos celulares en la interfase y en el fondo del tubo de ensayo como la fase más clara, el polímero diluido en cloroformo.
5. Recolectar la fase del fondo para posterior análisis por GC-MS

ANEXO G. MÉTODO DE ANÁLISIS GC-MS

Tabla G1. Columna y condiciones de operación para el cromatógrafo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas para la identificación de PHAs.

Columna	HP-1 Agilent Technologies Inc.
Altura de la columna	100 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	Mantener a 70°C por 2 min Rampa de 20°C/min hasta 230°C
Detector	Espectrómetro de Masas
Rango escáner	30-350 EI+
Tiempo de encendido del detector	12 minutos

ANEXO H. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN

El protocolo de extracción del polímero es el siguiente:

1. Recuperar las células bacterianas que contienen el polímero luego de tres días de cultivo, centrifugando a 10000 gravedades durante 10 minutos.
2. Lavar el pellet obtenido con 20 ml de agua destilada para eliminar los residuos de glicerol y centrifugar nuevamente a las mismas condiciones.
3. Secar la biomasa obtenida en la incubadora a una temperatura de 37° C durante 12 horas.
4. En un recipiente cerrado agregar 1 ml de hipoclorito de sodio comercial (5% P/V) por cada 0.01 g de biomasa seca. La reacción se efectúa en la incubadora a 37°C durante 30 minutos con agitación magnética, se debe observar la digestión del pellet.
5. Centrifugar nuevamente a 10000 gravedades durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
6. El pellet que contiene los gránulos del polímero se disuelve en cloroformo caliente. Se agrega la mitad del volumen de hipoclorito empleado. La reacción se efectúa a una temperatura de 55°C durante 2 horas con agitación constante.
7. El polímero disuelto en cloroformo se separa de los restos celulares usando papel filtro con un tamaño de poro de 11 μm y se recolecta para su uso posterior.

ANEXO I. PROTOCOLO CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

1. Montaje de la muestra en el equipo DSC.

- i. La preparación de la muestra en el DSC requiere la utilización de un pan hermético, el cual debe ser pesado vacío y con la muestra, teniendo especial cuidado en el peso máximo el cual no puede superar los 20 mg. El equipo utiliza un pan hermético de referencia el cual debe ser pesado.
- ii. Los pesos del pan hermético vacío, la muestra y el pan hermético de referencia deben ser introducidos al software.

2. Programa de temperatura

Equilibrar la temperatura a 30°C

Rampa de calentamiento de 10°C min⁻¹ hasta -90°C

Isoterma durante 1 min

Rampa de calentamiento de 10°C min⁻¹ hasta 200°C

Isoterma durante 5 min

Rampa de calentamiento de 10°C min⁻¹ hasta -90°C

Rampa de calentamiento de 10°C min⁻¹ hasta 200°C