

**SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE ACTINOMYCETOS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

**YESSICA YURLEY GIRALDO BAREÑO  
DAVID ARMANDO ROMERO GOMEZ**

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

**2015**

**SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE ACTINOMYCETOS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

**YESSICA YURLEY GIRALDO BAREÑO  
DAVID ARMANDO ROMERO GOMEZ**

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

**Director:**

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

**Codirector:**

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

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

**2015**

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo de grado, culminado con esfuerzo y amor a mis padres por todo su cariño y apoyo en el transcurso de esta meta, a mis abuelos Armando Gómez, Gloria Bolívar, Maritza Arias y Armando Romero por creer en mí y ayudarme en los momentos más difíciles*

*A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.*

*Gracias a esas grandes amistades cultivadas en este periodo de formación, con las cuales crecí como persona integral y debo parte de mi triunfo a ellos:  
Camila ballesteros, Angie Tovar, Cristian Palencia, Daniela Franco, Sara Gutiérrez y  
María Camila pineda*

*A mi compañera Yessica Giraldo, por brindarme su respeto y apoyo, en haber compartido solidaridad, dificultades y alegrías, durante todo el proceso de nuestro trabajo de graduación y superando obstáculos para alcanzar un objetivo en común.*

***David Armando Romero Gómez***

*Dedicado con todo mi amor a Dios, a mi papi Guillermo, a mi mami Beatriz, a mi abuelita Inés y a mis hermanos Christian y Sebastián quienes son el motor de mi vida y mi fuerza impulsora en los momentos de mayor dificultad.*

*A George por ser mi amigo, mi consejero incondicional y por haber creído en mí siempre*

*A mis grandes amigos Lichi, Gabo, Gina, Andrés Piña y Clarita por enseñarme el verdadero valor de la amistad*

*A mi amiga Nayis por enseñarme que existen personas con grandes valores y por quienes vale la pena construir un mundo mejor*

*A mi gloriosa selección UIS futsal femenina especialmente al profesor René Rincón por su paciencia y dedicación así como a mis compañeras M. Paula, Linda, Laura C, Laura G, Cata, D. Rondón y Mafe con quienes tantas alegrías compartí*

*A todos mis compañeros de estudio especialmente a Omitar, French, Nicole, Juli, Adolfo, Jised, Luz Da, Yuli, pipe, Jaja, Dani, Daniela Contreras, Karencilla, Ivonne y Lina con quienes pude compartir y adquirir conocimientos a lo largo de mi carrera.*

*A todo mi gran equipo de Brasil campeón de interroscas deportivas UIS 2014-1 quienes me enseñaron a trabajar en equipo y a disfrutar del fútbol.*

*Yessica Yurley Giraldo Bareño*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Ingeniería Química.

A la Facultad de Ingenierías Físicoquímica por el apoyo con la auxiliatura de investigación otorgada para realizar este trabajo.

A nuestros profesores por brindarnos las bases científicas e ingenieriles necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A los Doctores Viviana Sánchez y Gustavo E. Ramírez por permitirnos ser parte de este proyecto y habernos brindando sus conocimientos y dedicación.

Al grupo de Investigación CINBIN y al grupo de Investigación en Polímeros por habernos proporcionado las herramientas necesarias para el desarrollo de este proyecto.

A la Bióloga Oriana Serna Danuta por ser una guía en este proceso de investigación.

A la química Nathalia Bedoya por su paciencia, tiempo y disposición.

A la Ph.D Martha Barajas por su colaboración en el análisis de cromatografía.

A Camilo Parada y Alejandro Sayago por brindarnos su apoyo en los momentos difíciles.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS	19
1.2 ACTINOMYCETOS	21
1.3 ROJO DE NILO	22
1.4 BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS	22
1.5 PRODUCCIÓN DE PHAS A PARTIR DE RESIDUOS DE BODIESEL	23
2. METODOLOGÍA	24
2.1 SELECCIÓN CUALITATIVA DE CEPAS DE ACTINOMYCETOS	24
2.2 CEPAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	26
2.3 CRECIMIENTO EN MSMGC	27
2.4 CUANTIFICACIÓN DE PHAS	27
2.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS	28
2.5.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	28
2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	28
2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	28
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	30
3.1 SELECCIÓN CUALITATIVA	30
3.2 CRECIMIENTO EN MSMGC	32
3.3 CUANTIFICACIÓN DE PHAS	33
3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS	36
3.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	36

3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	38
3.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	39
4. CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	52

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Propiedades mecánicas de diversos PHAs y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo.	20

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema del proceso de producción del P3HB	18
Figura 2. Imagen de <i>Promicromonospora</i> actinobacteria productora de PHAs.	21
Figura 3. Esquema selección cualitativa de cepas nativas	24
Figura 4. Secuencia del proceso de inoculación en MSMGC	26
Figura 5. Selección de cepas productoras de PHA con tinción de Rojo de Nilo en medio sólido.	30
Figura 6. Tinción con rojo de Nilo en medio líquido.	31
Figura 7. Curvas de crecimiento en MSMGC	32
Figura 8. Pérdida de peso por degradación de una muestra de poli-3-hidroxibutirato comercial	33
Figura 9. Pérdida de peso de una muestra de ACPG10 en MSMGC	34
Figura 10. Pérdida de peso de una muestra de MFSR3 en MSMGC	34
Figura 11. Pérdida de peso de una muestra de ACPG13 en MSMGC	35
Figura 12. Porcentaje de acumulación de PHAs en las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3.	36
Figura 13. Espectrometría infrarroja para las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3.	37
Figura 14. Espectrometría infrarroja para las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3.	38
Figura 15. Cromatografía de una muestra de ACPG13 en MSMGC	39
Figura 16 Termograma de una muestra de ACPG 13 en MSMGC	40

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Procedencia de las cepas de Actinomycetos	52
Anexo B. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo	53
Anexo C. Análisis termo gravimétrico	54
Anexo D. Metodología de metanólisis	55
Anexo E. Método de análisis GC-MS	57
Anexo F. Preparación de la muestra en el DSC	58

## RESUMEN

**TÍTULO:** SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE ACTINOMYCETOS PARA LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS\*

**AUTORES:** David Armando Romero Gómez  
Yessica Yurley Giraldo Bareño\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Actinomycetos, polihidroxicanoatos, Rojo de Nilo, biopolímero.

### DESCRIPCIÓN:

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son sustancias poliméricas de origen biológico catalogadas como fuentes de materiales biorrenovables y biodegradables, estos poseen amplios usos, desde materiales de empaque hasta implantes médicos. Se producen cuando los nutrientes esenciales como fuentes de nitrógeno o fosfatos, son limitados junto con un exceso en la fuente de carbono. Este trabajo se realizó con el objetivo principal de mejorar los rendimientos en la producción de PHAs y ante la necesidad de la obtención de cepas con mayor potencial de acumulación de biopolímero intracelular. Además se utilizó el glicerol crudo, subproducto de la industria del biodiesel como fuente de carbono o sustrato para los microorganismos, para ello fueron seleccionados cualitativamente 3 cepas de actinomycetos de 24 provenientes de fuentes hídricas próximas a zonas de procesamiento de café en Santander, Colombia. Las tres cepas fueron cultivadas en un medio mínimo de sales con glicerol crudo, encontrándose que las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3 presentaron un porcentaje máximo de acumulación de biopolímero de 23,23%, 21,43% y 12,88% respectivamente. Se procedió a seleccionar la cepa de mayor acumulación y realizarle pruebas de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, Análisis Termogravimétrico, Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y Calorimetría Diferencial de Barrido, con las cuales se pudo determinar la presencia de Poli-3-Polihidroxitirato (P3HB) en mayor proporción.

---

\* 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

**TÍTULO:** SELECTION OF NATIVE STRAINS OF ACTINOMYCETES FOR POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTIONS\*

**AUTHORS:** David Armando Romero Gómez  
Yessica Yurley Giraldo Bareño\*\*

**KEY WORDS:** Actinomycetes, polyhydroxyalkanoates, Nile Red, biopolymer.

### DESCRIPTION:

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymeric substances of biological origin, which are classified as bio-renewable sources, and biodegradable materials, such materials have large uses, from package materials to medical implants. It occurs when essential nutrients such as phosphates or nitrogen sources are limited with an excess carbon source. The main aim of this degree work was improve the efficiency in the production of PHAs and the necessity of obtaining strains with greater potential for accumulation of intracellular biopolymer. The crude glycerol, which is a sub-product of the biodiesel industry, as a source of carbon or substrate for microorganisms was selected 3 of 24 strains of actinomycetes qualitatively, from nearby water sources to processing coffee areas in Santander, Colombia.

The three strains were cultivated in a minimal environment of salts with crude glycerol and were found that these strains were cultivated in a minimal environment of salts with crude glycerol and were found that the following strains: ACPG13, and MFSR3 ACPG10 showed a maximum percentage of biopolymer accumulation of 23,23%, 21,43% and 12,88% respectively. To proceed, the strain with the higher accumulation was selected and it was subjected to Infrared Spectroscopy tests for Fourier Transform, Gas chromatography coupled to mass spectrometry and differential Scanning Calorimetry with which it was determined the presence of poly-3-Polyhydroxybutyrate (P3HB).

---

\* Final Degree Project.

\*\* Physicochemical Faculty of Engineering. School of Chemical Engineering. Director Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Co-director Ph.D. Gustavo E. Ramírez Caballero

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>PHAs</b>	Polihidroxialcanoatos
<b>P3HB</b>	Poli-3-hidroxibutirato
<b>MSMGC</b>	Medio mínimo de sales con glicerol crudo

**MFSR3, MFSR4, MFSR7, MFSR12, MFSR13, MFSR6, MFSR8, MFSR9, MFSR10, MFSR2, MFSR1, MFSR15, ACPG1, ACPG2, ACPG3, ACPG4, ACPG5, ACPG6, ACPG7, ACPG9, ACPG10, ACPG11, ACPG12, ACPG13** Las cepas ACPG son aisladas de compost y las MFSR son aisladas de aguas de las lagunas de tratamiento de mucílago.

## INTRODUCCIÓN

Los plásticos son sustancias de origen orgánico conformadas por cadenas macromoleculares largas que contienen en su estructura principalmente carbono e hidrógeno [1], las cuales debido a su costo relativamente bajo, su facilidad de fabricación, versatilidad e impermeabilidad al agua, se utilizan en una amplia variedad de productos; actualmente estos materiales han reemplazado a otros convencionales como el papel, madera, metales, vidrio y cerámica en la mayoría de sus antiguos usos [2]. Además son sintetizados principalmente a partir de derivados del petróleo y en menor proporción de algodón, sin embargo debido a su lenta degradación se está generando un problema de acumulación de residuos y de toxicidad para el medio ambiente, pues en la actualidad la producción de materiales sintéticos es cada vez mayor, acumulándose a un ritmo de 25 millones de toneladas por año [3].

Los polihidroxicanoatos (PHAs) un tipo de bioplástico, se presenta como una alternativa dirigida a atenuar la cantidad de residuos acumulados así como la contaminación, debido a sus interesantes propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad y su síntesis a partir de recursos renovables [4]. Los PHAs más comunes son poli(3-hidroxi-butirato) (P3HB) y poli(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)). Estas sustancias tienen propiedades mecánicas similares a las del polipropileno y polietileno, aunque presentan mayor fragilidad ya que son de corta elongación [5].

Para realizar la síntesis industrial de estos biopolímeros se han utilizado bacterias como *Alcaligenes latus*, *Ralstonia eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, algunos metilótrofos, *Pseudomonas oleovorans* y *Escherichia coli* recombinante quienes

necesitan de condiciones de crecimiento especiales para sintetizar PHAs como limitaciones nutricionales de nitrógeno [6], [7].

Con el objetivo de mejorar los rendimientos en la producción PHAs y ante la necesidad de la obtención de cepas con mayor potencial de acumulación, se realizaron estudios de bioprospección con proyectos de aislamiento y caracterización de actinomicetos, realizados por el Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN). Dentro de los intereses del grupo de investigación CINBIN está evaluar el potencial del cepario de actinomicetos para producir otros productos a parte de hidrógeno, por eso hicimos el screening para PHAs. El proyecto con el cual se hizo el aislamiento es VIE 1334 “Aislamiento y caracterización de cepas nativas de actinomicetos para la producción de hidrógeno a partir de mucílago de café”.

Se seleccionaron cepas bacterianas productoras de PHAs, se aplicó una metodología de cultivo, finalmente se caracterizó el PHA intracelular evaluando las propiedades térmicas y su composición esquematizado en la Figura 1.

**Figura 1. Esquema del proceso de producción del P3HB**



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los PHAs son polímeros biológicos que actúan como un almacén de carbono y energía situados en el citoplasma en forma de gránulos intracelulares para más de 300 especies de bacterias [8]. Dependiendo del sustrato utilizado y de la fase de crecimiento microbiana, éstos pueden representar parte relevante de su peso en seco, se ha encontrado microorganismos como la *Rhizobium meliloti* y la *Ralstonia eutropha* en los cuales el porcentaje de acumulación máximos encontrados son de 61% y el 90% del peso seco celular respectivamente [9]. Se producen cuando los nutrientes esenciales como fuentes de nitrógeno o fosfatos son limitados junto con un exceso en la fuente de carbono. Los biopolímeros resultantes son hidrófobos, termoplásticos y/o elastómeros [10].

Se dividen en tres grupos: PHAs de longitud de cadena corta (scl-PHAs) con unidades de monómero entre 3 y 5 átomos de carbono como poli(3-hidroxi butirato) (P3HB) y poli(3-hidroxi valerato) (P3HV), PHAs de longitud de cadena media (mcl-PHAs) formados por monómeros entre 6 y 18 átomos de carbono como el copolímero [P(3HB-co-3HV)] y PHAs de longitud de cadena mixta, que combinan los dos anteriores y tienen unidades de monómero entre 3 y 4 átomos de carbono. Las características físicas y químicas de los biopolímeros dependen de su composición monomérica, la cual es altamente variable [11].

P3HB un tipo de homopolímero, es impermeable al oxígeno y tiene un tiempo estimado de degradación que varía de algunos meses (en medio aerobio) a años (en agua marina), además su estructura de hélice levógira compacta es similar a la del polipropileno [12], sin embargo el copolímero [P(3HB-co-3HV)] con

temperaturas de fusión y transición vítrea más cercanas a las del polipropileno como se muestra en la Tabla 1, se constituye en un material más flexible y resistente y como consecuencia de mayor interés industrial [13], el cual fue producido comercialmente con el nombre de BioPol TM por Bio Zeneca Products [14].

**Tabla 1. Propiedades mecánicas de diversos PHAs y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo.**

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1.5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0.7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1.7	34.5	400	45
Polietileno-tereftalato	262	2.2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3.1	50	*	21
Nylon- 6,6	265	2.8	83	60	*

\* Información no disponible

Fuente: [15]

Adicionalmente los PHAs presentan las siguientes ventajas:

- La síntesis y uso de PHAs es una alternativa sustentable para el medio ambiente ya que son completamente biodegradables.
- Puede ser obtenidos a partir de fuentes de carbono renovables a diferencia de los plásticos convencionales producidos por combustibles fósiles.
- Permiten la liberación de compuestos químicos de manera dosificada, para aplicación de fertilizantes, fungicidas y herbicidas.
- Los PHAs tienen aplicaciones médicas gracias a su biocompatibilidad con el tejido humano y a que son reabsorbidos a una baja velocidad.

## 1.2 ACTINOMYCETOS

Estos microorganismos son abundantes en suelos secos y cálidos donde alcanzan grandes cantidades poblacionales [16], los caracteriza la presencia de un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina [17]. Son heterótrofos usando como fuentes de carbono compuestos moleculares orgánicos y como fuentes de nitrógeno: amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y gran cantidad de proteínas [18]. La mayoría de los actinomicetos son mesófilos y su crecimiento se da en un rango entre 25°C y 30°C [19]. Los suelos alcalinos y neutros suelen ser los más favorables para éstas bacterias, en un rango de pH óptimo entre 6,5 y 8,0 [20].

Se ha identificado en este grupo bacteriano producción de antifúngicos, antibióticos, metabolitos antitumorales y PHAs, los cuales son sintetizados por *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* [21], más recientemente por *Kineosphaera limosa* [22] así como por *Promicromonospora* como se puede apreciar en la Figura 2 en la cual la flecha señala el biopolímero intracelular.

**Figura 2. Imagen de *Promicromonospora* actinobacteria productora de PHAs.**



Fuente: [11]

### 1.3 ROJO DE NILO

El Rojo de Nilo (también conocido como oxazona del Azul de nilo) que se produce ebulviendo el Azul de nilo con ácido sulfúrico, se emplea para desarrollar un método de tinción simple y altamente sensible que identifica PHAs de forma directa en colonias de bacterias en desarrollo. La inserción de este colorante lipofílico se hace en el agar o medio en el que se nutren los microorganismos sin afectar su crecimiento [23].

### 1.4 BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

La biosíntesis de PHAs se puede resumir en ocho vías, en la vía más estudiada intervienen 3 enzimas clave:  $\beta$ - cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH y la PHA sintetasa, codificadas respectivamente por los genes *phaA*, *phaB*, *phaC* quienes se encuentran en un mismo operon y cuya expresión es relativamente constante durante la producción de PHAs [24].

El grupo bacteriano utilizado en la síntesis de PHAs y la cantidad de sustrato consumido por la PHA sintetasa quien es la responsable de incorporar el monómero específico a cada polímero son los factores más importantes a la hora de definir el tipo de biopolímero a producir [25].

En la naturaleza, existen microorganismos capaces de degradar los PHAs hasta dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias, y hasta metano en condiciones anaerobias por medio de enzimas despolimerasas sin la formación de productos tóxicos, este es el caso de algunas actinobacterias como *Actinomadura*, *Microbispora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* y *Saccharomonospora* con capacidad degradadora de biopolímeros a altas temperaturas [26]

## 1.5 PRODUCCIÓN DE PHAS A PARTIR DE RESIDUOS DE BIODIESEL

Los biocombustibles como el etanol y el biodiesel se encuentran entre las fuentes más prometedoras para la sustitución de los combustibles fósiles. En la síntesis de biodiesel se obtienen alrededor de 10% (w/w) de glicerol como subproducto principal [27], sin embargo éste glicerol tiene muchas impurezas que junto con el aumento de su producción lo convierten en un material de desecho que genera un problema ambiental de disposición de residuos [28].

El uso del glicerol como fuente de carbono para la producción de PHAs contribuye a la mitigación del impacto ambiental ocasionado por su acumulación excesiva además disminuye el costo de producción de los bioplásticos el cual es relativamente alto frente a los plásticos de origen petroquímico. El glicerol crudo está compuesto principalmente por: glicerol, ácidos grasos libres, metil ésteres de ácidos grasos y algunas trazas de sales [29].

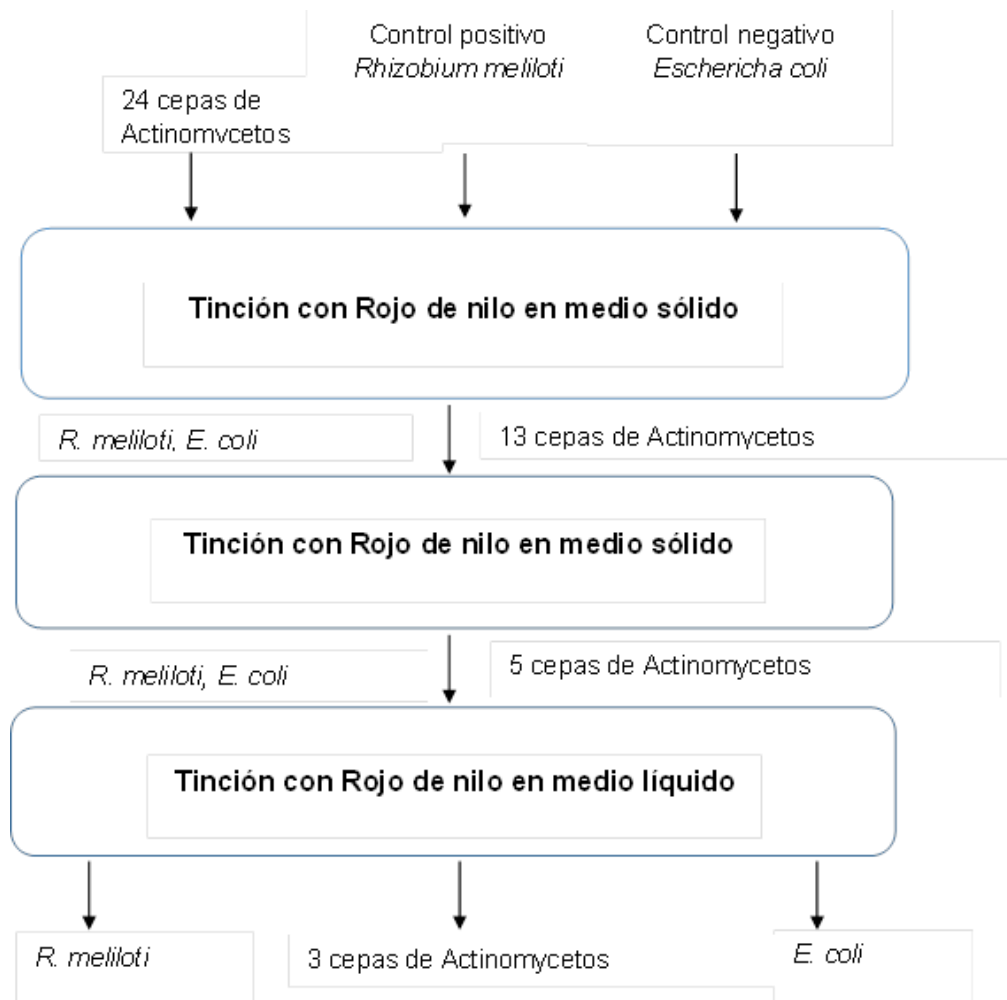
Ashby *et al.*, (2005) mostraron que hasta un 5% (v/v) de glicerol podía ser usado para la obtención de P3HB por *P. oleovorans* y PHAs de longitud de cadena media por *P. corrugata*, además se presenta como el sustrato más energéticamente favorable para la formación de acetil-CoA quien es un precursor para la síntesis de PHAs.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 SELECCIÓN CUALITATIVA DE CEPAS DE ACTINOMYCETOS

La Figura 3, muestra el resumen del procedimiento llevado a cabo en la etapa de selección cualitativa de cepas nativas de Actinomycetos

**Figura 3. Esquema selección cualitativa de cepas nativas**



24 cepas fueron aisladas en medio selectivo para Actinomycetos y tomadas del cepario bacteriano del Grupo de investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) de la Universidad Industrial de Santander ANEXO A.

Las cepas crecieron a 30°C en cajas de Petri con medio mínimo de sales con glicerol crudo (MSMGC) [30] con una concentración de 1µg/ml de Rojo de nilo [14], este es un tinte fluorescente que permite detectar la acumulación de PHAs intracelulares. Como control positivo se utilizó la cepa *Rhizobium meliloti* la cual produce PHA a partir de glicerol crudo y como control negativo *Escherichia coli* la cual no produce PHAs [31].

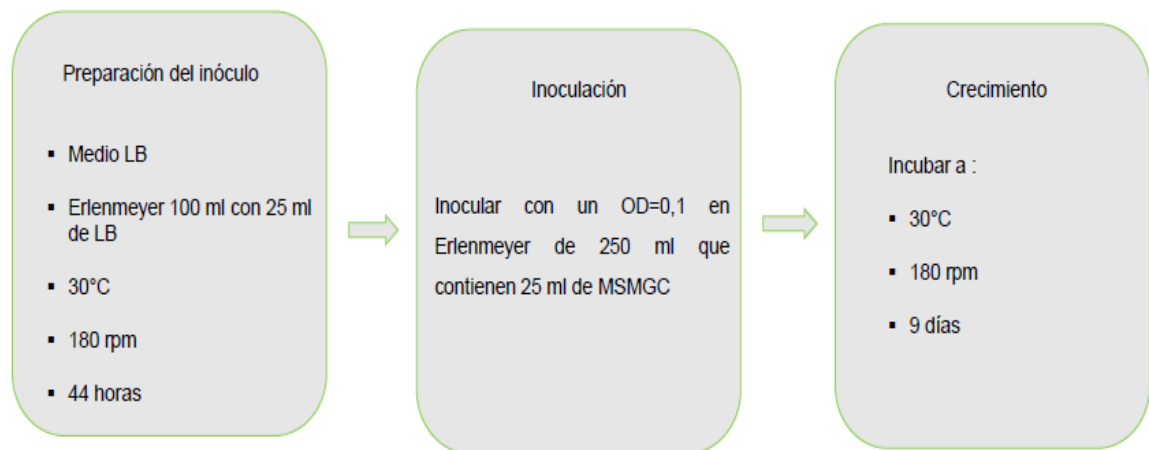
Las bacterias que al ser expuestas a radiación ultravioleta (UV) con longitud de onda de 302 nm proveniente del Transiluminador UVP BioDoct 220 Imagen System presentaron una fluorescencia similar en color al control positivo, fueron seleccionadas cualitativamente como posibles productoras de PHAs. Posteriormente se repitió progresivamente esta prueba con las cepas seleccionadas en cada etapa, hasta seleccionar las 5 cepas con mayor fluorescencia, lo cual sugiere una mayor capacidad para sintetizar PHAs. Para corroborar que las 5 cepas seleccionadas presentaron una alta fluorescencia con Rojo de nilo, se hizo una prueba de tinción en medio líquido. Las 5 cepas fueron cultivadas en un medio líquido Luria Bertani (LB) a 30°C, se centrifugaron y se re-suspendieron en una solución salina con 3,1 µg/ml de Rojo de nilo [14]. Finalmente fueron expuestas a radiación (UV) con longitud de onda de 302 nm. Se seleccionaron las tres cepas con mayor fluorescencia para continuar los ensayos de producción y caracterización de los PHAs [31].

De las 24 cepas seleccionadas se pudieron obtener las 3 cepas posibles productoras de PHAs según lo planteado en la figura 3.

## 2.2 CEPAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se procedió a realizar un precultivo de las tres cepas de actinomicetos seleccionadas y el control positivo *Rhizobium meliloti* a temperatura ambiente, luego se siguió el proceso resumido en la Figura 4. El glicerol crudo utilizado, fue proveído por la planta BioSC S.A (Biocombustibles Sostenibles del Caribe), cuyas propiedades fisicoquímicas se especifican en el ANEXO B [32].

**Figura 4. Secuencia del proceso de inoculación en MSMGC**



Las cepas de Actinomicetos crecieron a 30°C ya que son mesófilas, se inocularon por 9 días debido a estudios previamente realizados por el grupo de investigación CINBIN con la cepa *Rhizobium Meliloti* (control positivo) los cuales sugieren que se debe evaluar la producción de PHA a diferentes tiempos hasta 9 días para seleccionar el mejor tiempo de incubación [31]. Las cepas se agitaron a 180 rpm debido a que son aerobias y la agitación ayuda a airear el cultivo además permite la homogenización del medio [31].

### **2.3 CRECIMIENTO EN MSMGC**

Se hizo un seguimiento del crecimiento a 3 cepas bacterianas y su control positivo *Rhizobium Meliloti* para confirmar su capacidad de asimilar glicerol crudo como fuente de carbono, para esto se realizaron pruebas de densidad óptica (DO) a 600 nm usando un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25.

Las cepas fueron cultivadas a partir del precultivo en medio líquido LB, en las cuales se inició su crecimiento en duplicado a las mismas condiciones a una densidad óptica de 0,1 se realizaron las respectivas mediciones de DO a diferentes tiempos hasta los 9 días.

### **2.4 CUANTIFICACIÓN DE PHAs**

El análisis termogravimétrico llevado a cabo en la Balanza Termogravimétrica Discovery TGA 1-0207 permite realizar mediciones de la pérdida de peso de una muestra al aplicar determinada cantidad de calor para elevar la temperatura de dicha muestra al transcurrir el tiempo. Debido a que los PHAs son un producto intracelular, utilizando el TGA puede cuantificarse la cantidad de biopolímero acumulado en el transcurso de los días al conocer la temperatura de descomposición de este, sin necesidad de una anterior extracción y de esta forma identificar el tiempo en el cual se alcanza la mayor producción de PHAs. El protocolo utilizado para este experimento esta descrito en el Anexo C.

El polímero P3HB comercial (SIGMA ALDRICH) fue utilizado como patrón el cual tiene una temperatura de fusión de 172°C [34].

## **2.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS**

**2.5.1 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 tomaron muestras de las tres cepas seleccionadas previamente en sus respectivos días de máxima producción, se centrifugaron en una microcentrífuga Thermo Scientific Sorvall Legend micro21 a 15000 g durante 3 minutos y se les retiró el sobrenadante. La muestra se dejó secar en planchas de calentamiento Block Heater SBH200D/3 durante 6 horas a una temperatura de 65 °C, esto con el fin de asegurarse de eliminar todo rastro de humedad presente en ellas.

**2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).** 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 llevó a cabo siguiendo la metodología, descrita en el ANEXO D. La muestra extraída del actinomiceto de mayor porcentaje de acumulación en base seca se almacenó en recipientes de 1.5 ml y posteriormente 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 [28] detallado en el ANEXO E con el fin de identificar los monómeros del PHA.

**2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).** Para realizar dicho procedimiento se realizó el protocolo sólo con la cepa de mayor porcentaje de acumulación en base seca; gracias a esta técnica de DSC se logró determinar las transiciones térmicas del biopolímero, las cuales son la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de fusión ( $T_m$ ). Para este método se empleó el Calorímetro Diferencial de Barrido Discovery DSC 1-0237 en modo estándar con

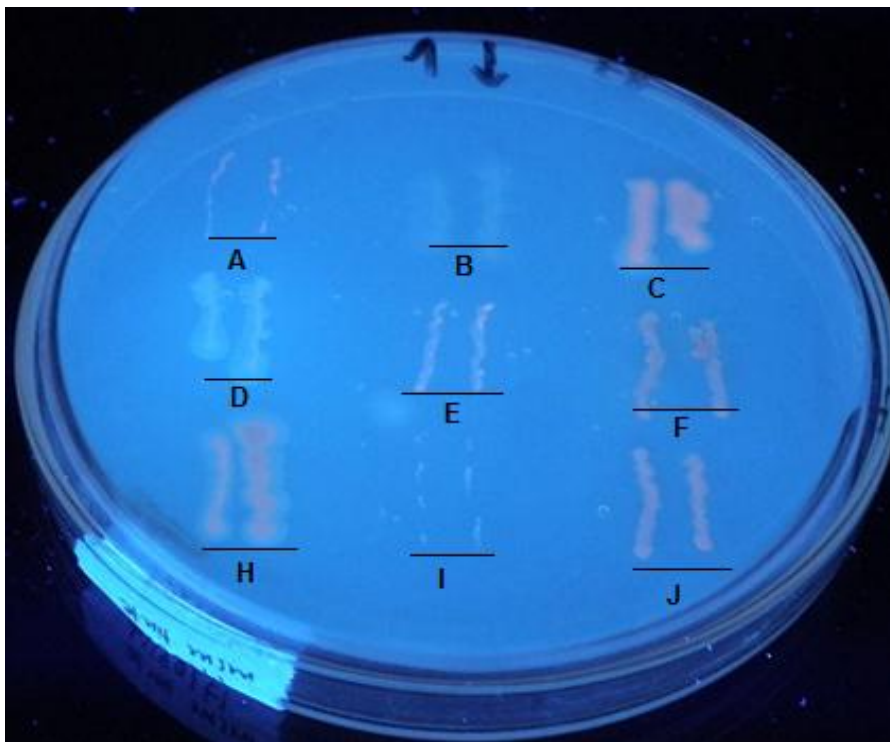
una rampa de calentamiento de 20 °C/min, desde 30°C hasta 115°C esto con el fin de eliminar el exceso de agua presente en la muestra. Luego se estabilizó la muestra a -20°C, después se aplicó una rampa de calentamiento de 3°C/min hasta llegar a los 225°C. Estas propiedades son de gran relevancia en el proceso de caracterización molecular del PHA, el procedimiento escrito en detalle se puede encontrar en el ANEXO F.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 SELECCIÓN CUALITATIVA

Se escogieron trece cepas de actinomicetos, las cuales presentaron fluorescencia similar al control positivo *Rhizobium meliloti* al crecer en platos con Rojo de nilo como se muestra en la Figura 5.

**Figura 5. Selección de cepas productoras de PHA con tinción de Rojo de Nilo en medio sólido.**

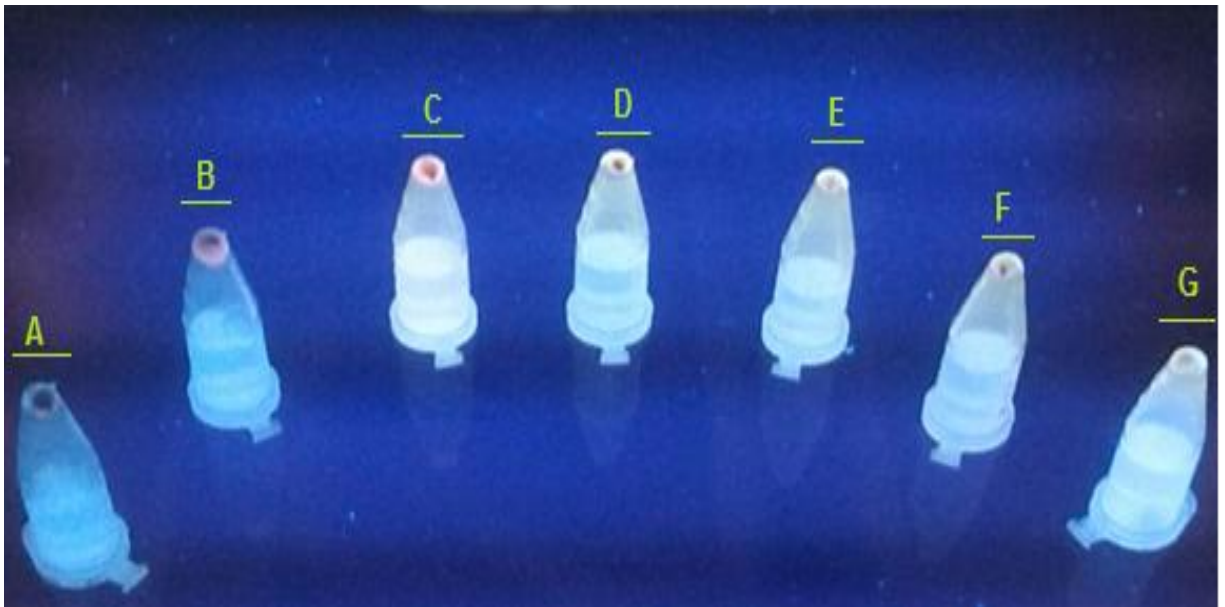


La posición D corresponde al control negativo *Escherichia coli* y la posición E corresponde a *Rhizobium meliloti* quien es el control positivo. Se puede ver en la Figura 5 que las cepas en las posiciones A, C, F, H y J presentaron una mayor

fluorescencia rosada lo cual indica que son potencialmente productoras de PHAs, las cepas ubicadas en las posiciones B y I no producen PHAs, pues se ven brillantes pero blancas.

La prueba se llevó a cabo una vez más con las cepas seleccionadas anteriormente hasta obtener las cinco cepas que presentan la mayor fluorescencia rosada las cuales son ACPG13, MFSR3, ACPG10, ACPG1 y MFSR9. Nuevamente se llevó a cabo la tinción con rojo de Nilo con las cinco cepas seleccionadas en el experimento anterior, pero esta vez en medio líquido. Se determinaron las tres cepas de actinomicetos con mayor fluorescencia, por orden de intensidad: ACPG13, ACPG10 y MFSR3 las cuales se encuentran en las posiciones C, E y D que se pueden apreciar en la Figura 6.

**Figura 6. Tinción con rojo de Nilo en medio líquido.**

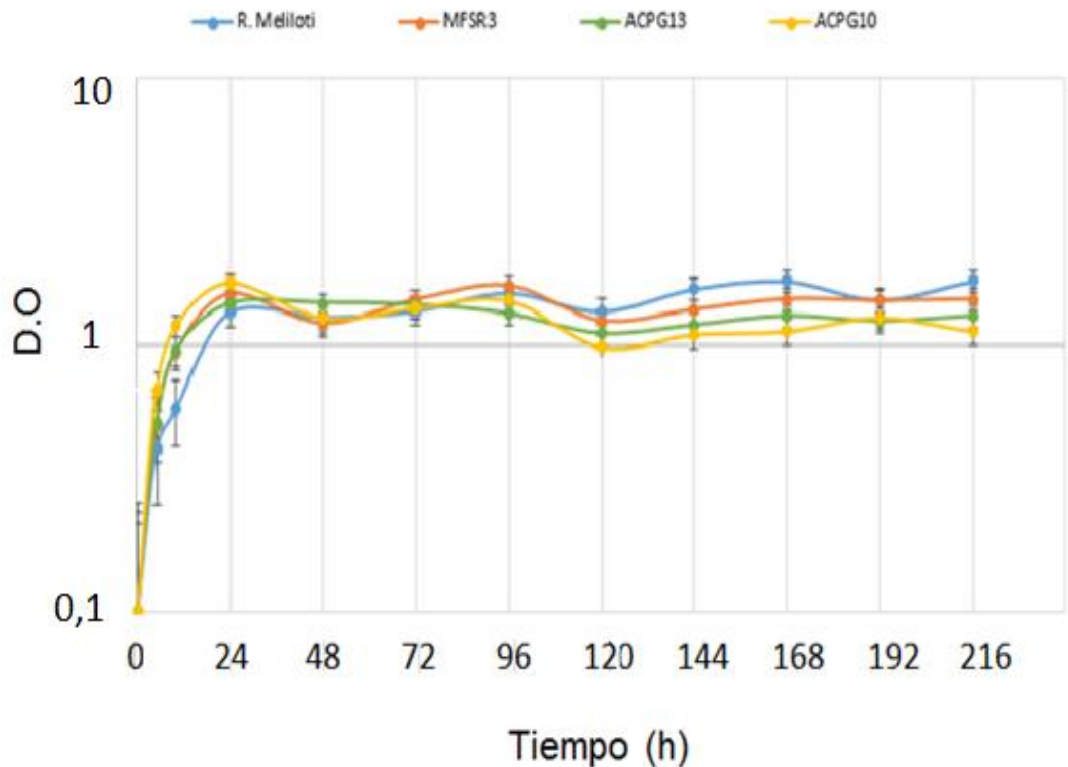


A) *E.coli* JM109 (control negativo) B) *R.Melliloti* (Control positivo) C) ACPG13 D) MFSR3 E) ACPG10 F) ACPG1 G) MFSR9.

### 3.2 CRECIMIENTO EN MSMGC

Con este experimento se evaluó el crecimiento de las cepas MFSR3, ACPG10 y ACPG13 en MSMGC, junto con su control positivo durante 9 días (Figura 7).

**Figura 7. Curvas de crecimiento en MSMGC**

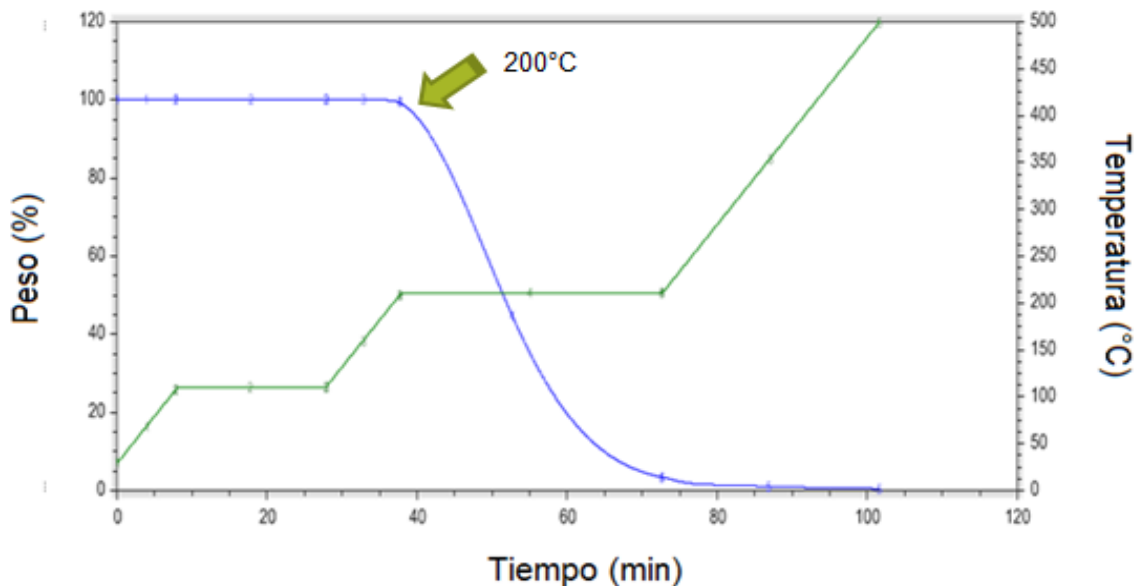


A partir de la gráfica y del análisis estadísticos se determinaron las velocidades de crecimiento máximas a partir de regresiones en la fase exponencial de crecimiento de cada una de las cepas: *R. meliloti*, MFSR3, ACPG10 y ACPG13 las cuales son:  $0,17 h^{-1}$ ,  $0,22 h^{-1}$ ,  $0,24 h^{-1}$  y  $0,22 h^{-1}$  respectivamente, las cuales al ser comparadas se puede concluir que todas las cepas tienen la misma habilidad para metabolizar el glicerol crudo pues tienen velocidades específicas de crecimiento cercanas. Gráficamente se puede evidenciar que las primeras 24 horas las cepas de actinomicetos presentaron una fase de crecimiento exponencial.

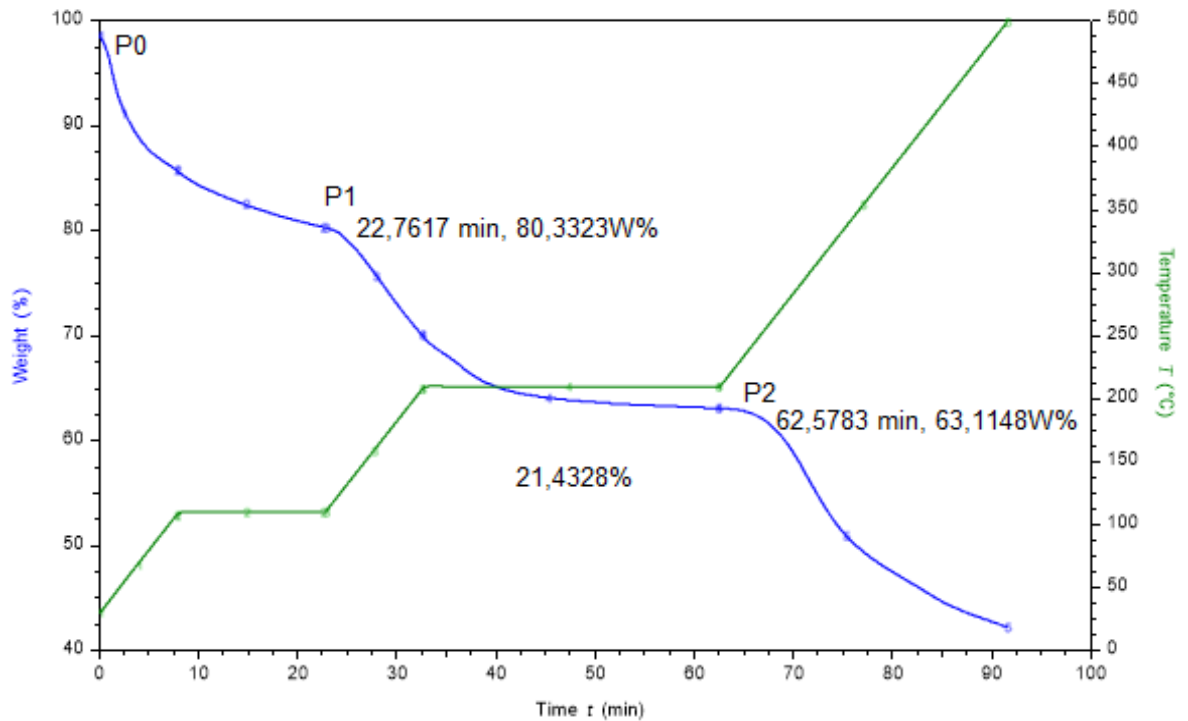
### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE PHAS

El análisis termogravimétrico realizado se realizó en las tres cepas de actinomicetos en el día de sus respectivas máximas producciones, dichos resultados se pueden evidenciar en las Figuras 9,10 y 11. El delta entre los puntos P0 y P1, representa la pérdida de peso por el agua presente en la muestra, la diferencia entre los puntos P1 y P2 corresponde a la pérdida de peso por descomposición del biopolímero en la muestra, esto ocurre una vez se alcanzan los 210°C, la pérdida de peso luego de este punto corresponde a la degradación de la biomasa restante [26]. Este análisis se llevó a cabo con un polímero patrón de P3HB proveniente de la empresa Sigma-aldrich, cuya temperatura de fusión y de degradación son 172 °C y 200 °C respectivamente; Esta última propiedad se puede corroborar en la Figura 8.

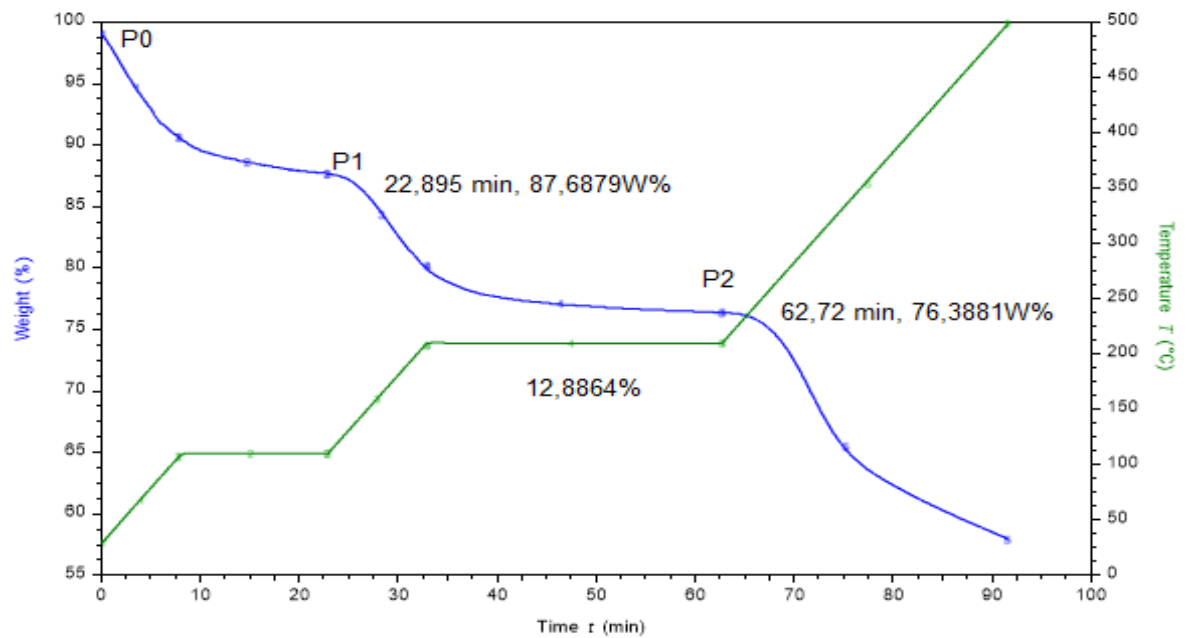
**Figura 8. Pérdida de peso por degradación de una muestra de poli-3-hidroxi-butirato comercial**



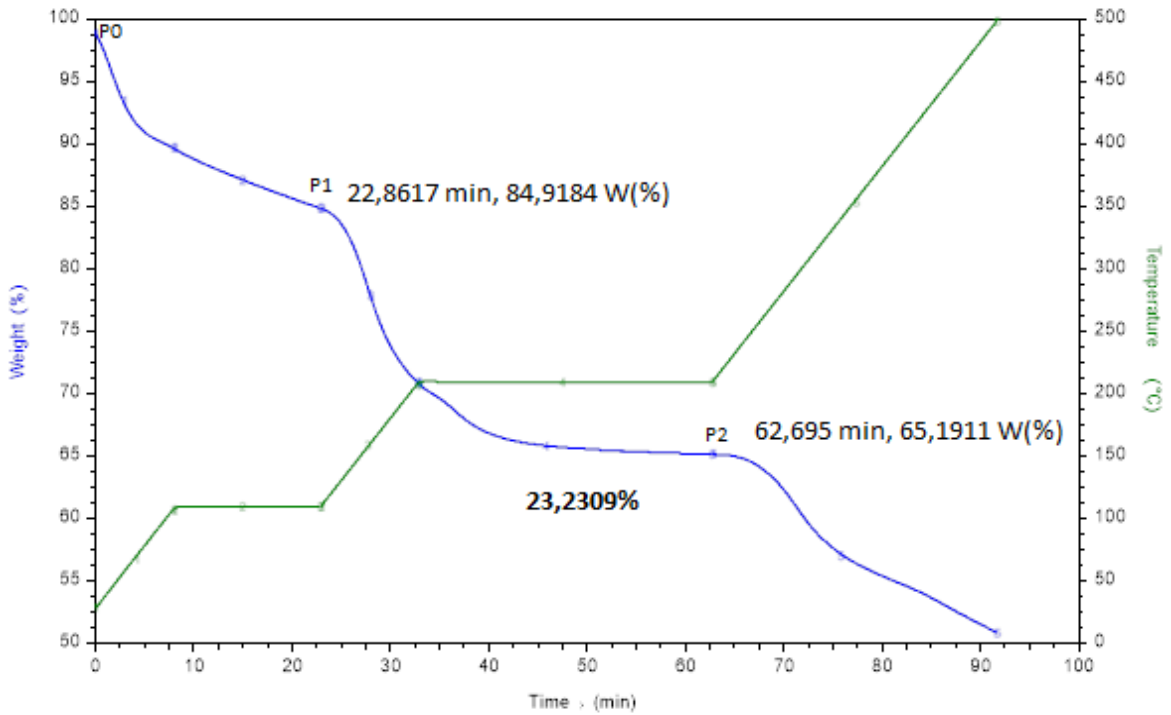
**Figura 9. Pérdida de peso de una muestra de ACPG10 en MSMGC**



**Figura 10. Pérdida de peso de una muestra de MFSR3 en MSMGC**



**Figura 11. Pérdida de peso de una muestra de ACPG13 en MSMGC**



La línea azul corresponde a la pérdida de peso de la muestra correspondiente al día noveno y la línea verde indica el programa de temperatura utilizado. El porcentaje en peso seco de la muestra a causa de la degradación del biopolímero, se representa por la ecuación (1)

$$(1) Y_{P/X} = \frac{P1-P2}{P1}$$

Donde:  $Y_{P/X}$ : corresponde al peso seco de la muestra por degradación del PHA [%]

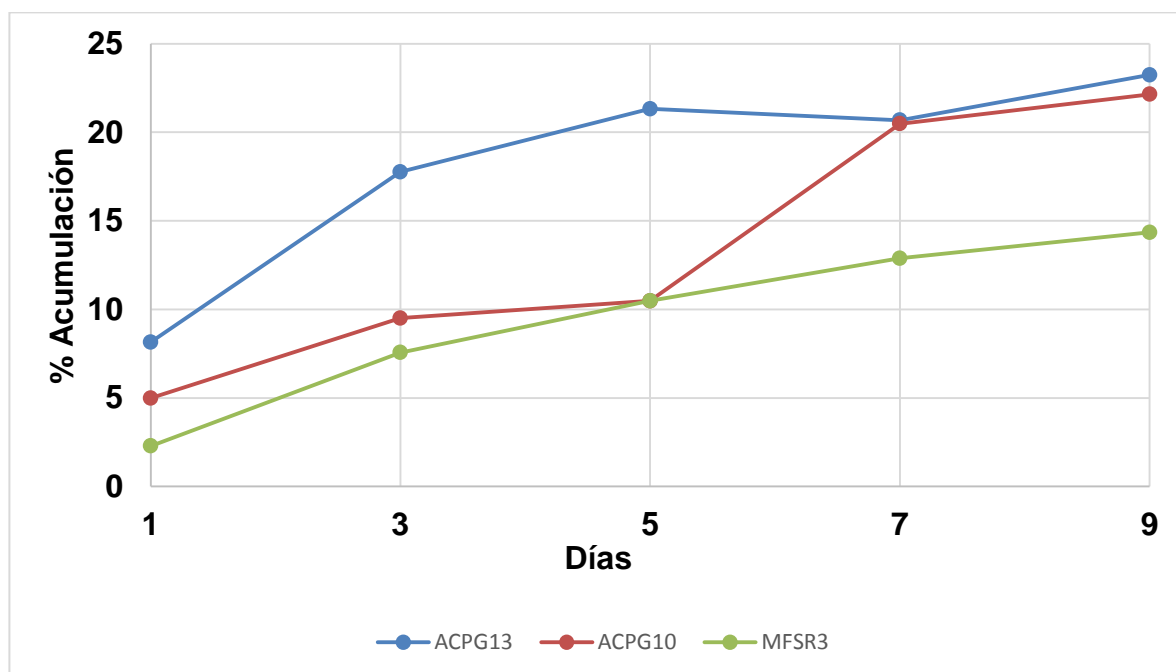
$P1$  : peso seco de la muestra en el punto 1 [%]

$P2$  : peso seco de la muestra en el punto 2 [%]

El porcentaje de acumulación de PHAs en base seca de cada una de las cepas en el medio MSMGC, se encuentra en la Figura 12. El valor máximo de producción se

presentó en el día número 9 en la cepa ACPG13 con un porcentaje de 23,23% de acumulación de PHA, cercano a un estudio que se realizó sobre actinomicetos nativos en suelos colombianos en el cual el porcentaje de acumulación de biopolímero fue del 27,48% [33]. Por lo tanto se procedió a trabajar con ella y a realizarle las respectivas pruebas de caracterización.

**Figura 12. Porcentaje de acumulación de PHAs en las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3.**



### 3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAS

**3.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).** Se realizó el análisis respectivo de espectroscopia infrarrojo para las muestras de ACPG13, ACPG10 y MFSR3 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 C=O [27]. La locación exacta del pico en las bandas reportadas se conoce que varía con la longitud de cadena del polímero y la cristalinidad del PHAs [28]. 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 Intracelular [29]. Para realizar este análisis se comparó con la espectrometría infrarroja para una muestra comercial de P3HB proveniente de la empresa Sigma-Aldrich, la cual se encuentra en la Figura 13.

**Figura 13. Espectrometría infrarroja para las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3.**

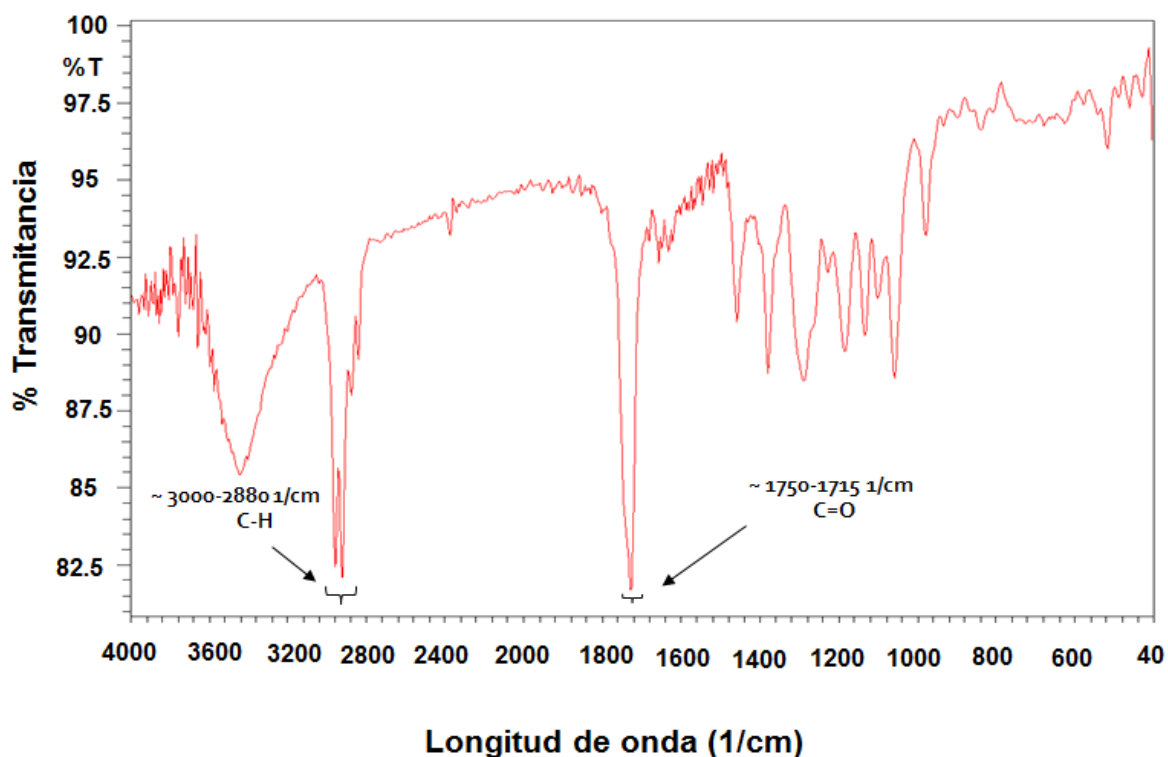
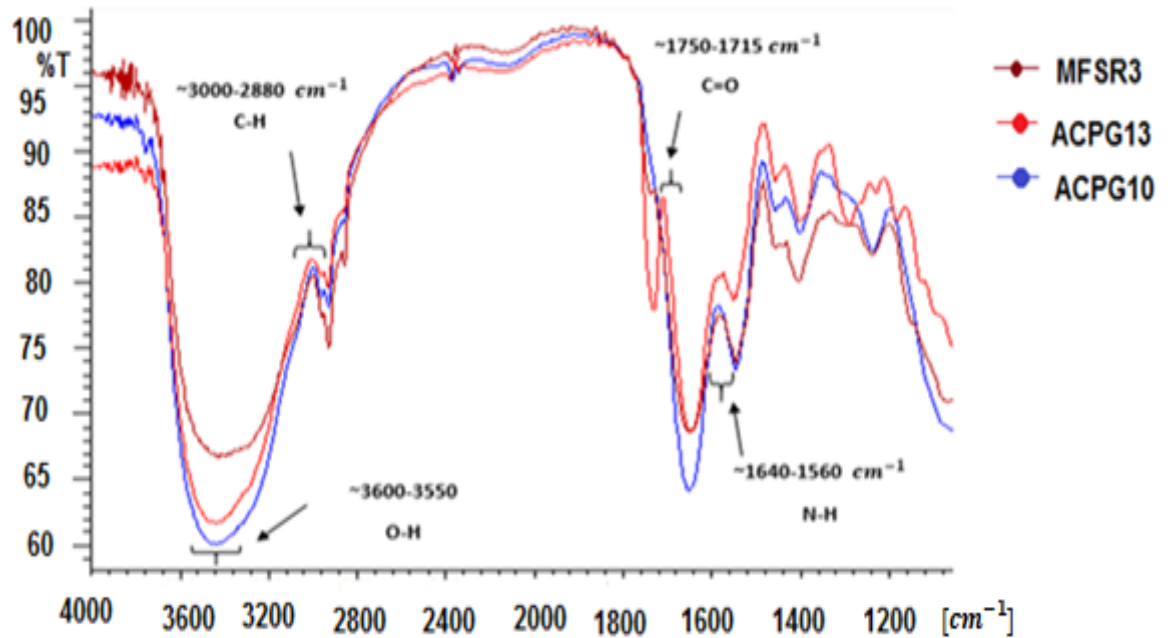


Figura 14. Espectrometría infrarroja para las cepas ACPG13, ACPG10 y MFSR3.

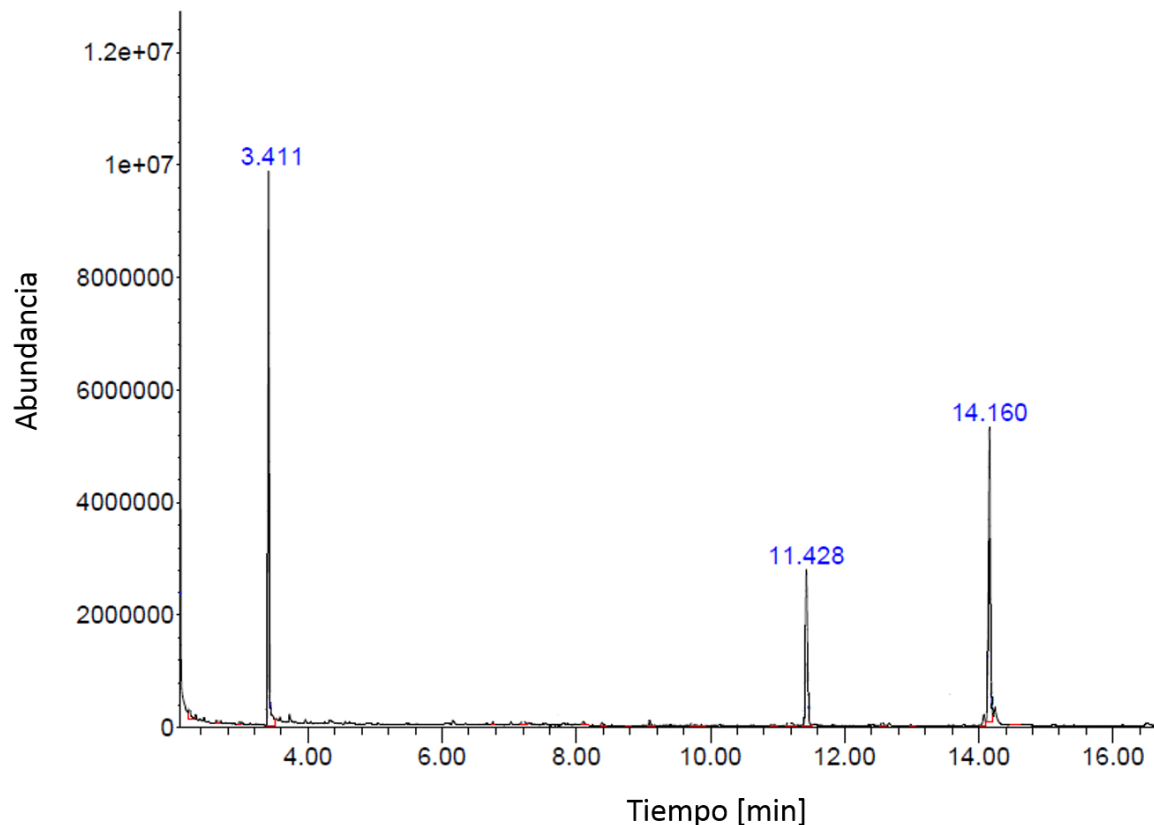


Basado en este análisis se puede inferir la presencia de PHAs en las tres cepas de Actinomycetos.

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

Los resultados finales de esta prueba aplicados a la cepa de mayor rendimiento (ACPG13) dan como resultado 3 picos destacados los cuales pueden ser apreciados en la Figura 9.

**Figura 15. Cromatografía de una muestra de ACPG13 en MSMGC**

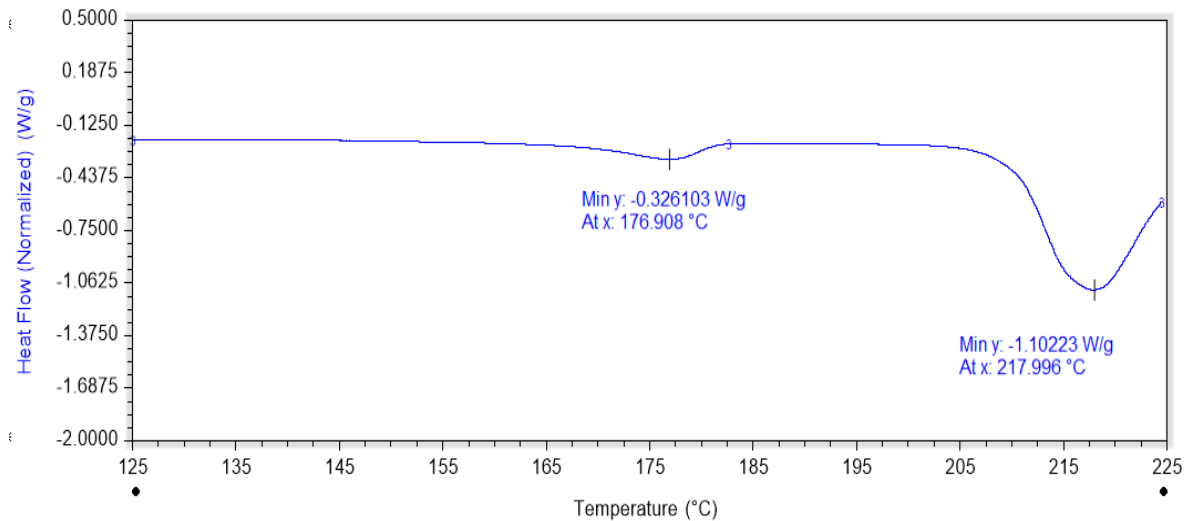


En cromatografía de gases el área de cada pico es proporcional a la cantidad en la muestra, los picos más representativos son: 3,411 min, 3-hidroxibutanoato el cual sugiere la presencia del P3HB en mayor proporción; el pico a 11,428 min corresponde al ácido hexadecanoico y el pico a 14,160 min corresponde al ácido octadecenoico. Estos dos últimos compuestos corresponden al ácido palmítico y esteárico respectivamente, los cuales se encuentran presentes en la muestra debido al glicerol crudo (Anexo B).

**3.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** El análisis de calorimetría diferencial de barrido se realizó a la cepa bacteriana ACPG 13, que es aquella que produce mayor porcentaje en peso de PHA según lo arrojado en el análisis termogravimétrico; los resultados se muestran en la Figura 10. Dos puntos

representativos se pueden evidenciar: la temperatura de degradación del polímero a 217,9 °C y la temperatura de fusión a 176,9°C.

**Figura 16 Termograma de una muestra de ACPG 13 en MSMGC**



Cuando el grupo R de PHA es un metil y se presentan 3 átomos de carbono en la molécula, la estructura resultante es la de P3HB, según la literatura la temperatura de fusión del P3HB oscila entre los 177-179°C [25], con lo cual se puede evidenciar la presencia del monómero metil-3-hidroxibutanoato encontrando en el análisis de cromatografía. La temperatura de transición vítrea no puede ser claramente identificada, debido a la presencia de proteínas celulares.

#### **4. CONCLUSIONES**

Los resultados permitieron seleccionar tres cepas nativas de actinomicetos: ACPG13, ACPG10 y MFSR3 productoras de PHAs a partir de glicerol crudo.

De las tres cepas seleccionadas cualitativamente, el actinomiceto ACPG13 en un medio mínimo de sales, presenta la mayor acumulación de PHAs. El porcentaje de acumulación máximo alcanzado por esta cepa fue de 23,23 %, cercano al estudio realizado en suelos Colombianos en el cual alcanzaron un rendimiento de 27,48%.

Las metodologías utilizadas para la caracterización de PHAs sugieren la presencia de poli-3-hidroxi-butirato en la cepa de actinomiceto ACPG13.

## REFERENCIAS

- [1] Instituto mexicano del plástico industrial, Enciclopedia del plástico, México, 1997.
- [2] American chemistry council, Lifecycle of a Plastic Product, 2011.
- [3] D. Segura, R. Noguez y G. Espín, “Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables,” *Biotechnología*, vol. 14, pp. 361-372, 2007.
- [4] G.-Y.A. Tan, C.-L. Chen, L. Ge, L. Li, L. Wang, L. Zhao, Y. Mo, S.S. Tan y J.-Y. Wang, «Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis, » *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 117 No. 3, pp. 379-382, 2014.
- [5] Gómez, B. M, Utilización de marcadores lipídicos en el estudio de la biomasa, la estructura y el estado nutricional de las comunidades de los tapices microbianos del Delta del Ebro, Universidad Autónoma de Barcelona, 1998.
- [6] G. Du y J. Yu, Green technology for conversion of food scraps to biodegradable thermoplastic polyhydroxyalkanoates, *Environmental science & technology*, vol. 36, pp. 5511-5516, 2002.
- [7] S.Y. Lee, «Bacterial polyhydroxyalkanoates, » *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 49 pp. 1-14, 1996.

- [8] B.H.A. Rehm, «Polyester synthases: natural catalysts for plastics,» *Biochemical Journal*, vol. 376, pp. 15-33, 2003.
- [9] C.S.K. Reddy, R. Ghai y V.C. Kalia, «Polyhydroxyalkanoates: an overview,» *Bioresource Technology*, vol. 87, No. 2, pp. 137-146, 2003.
- [10] M. Pötter y A. Steinbüchel, «Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation,» *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 60-552, 2005.
- [11] F. Matias, D. Bonatto, G. Padilla, M.F. Rodrigues y J.A. Pêgas, «Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil,» *NRC Research Press*, vol. 55, No. 7, pp. 790-800, 2009.
- [12] N.V. Ramadas, S.K. Singh, C.R. Soccol y A. Pandey, «Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM5149,» *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 52, No. 1 pp. 17-23, 2009.
- [13] P.M. Halami, «Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CRFo6,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, No. 6, pp. 805-812, 2008.
- [14] P.A. Holmes and G.B. Lim, "Separation process". United States Patent 4910145, 1990.
- [15] W. Babel y A. Steinbüchel, *Biopolyesters: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1° Edición, Springer-Verlag, Berlín, Alemania, pp. 342, 2011.

- [16] N. Ben-Omar, M.L. Merroun, J.M. Arias y M.T. Gonzalez, «Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass,» *Chemosphere*, vol. 35, No. 10, pp. 2217-283, 1997.
- [17] M. Ezziyyani, C. Pérez, M. Requena, A. Ahmed y M. Candela, «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.
- [18] J.Y. Leveau y M. Bouix, «Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial,» *Acribia Zaragoza*, 2000.
- [19] Y. Stanley, «The family *Streptomycetacea*,» *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 605-669, 2344-2347, 1994.
- [20] A. Titus y G.N. Pereira, «The role of Actinomycetes in coffe plantation ecology,» [En línea], <http://www.ineedcoffe.com/05/actinomycetes/print.asp>, citado el 27 de marzo de 2015.
- [21] U. Pieper and A. Steinbüchel, «Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*,» *FEMS Microbiology Letters*, vol. 75, No. 1, pp. 73-79, 1992.
- [22] W.T. Liu, S. Hanada, T.L. Marsh, Y. Kamagata and K. Nakamura, «*Kineosphaera limosa* gen. nov., sp. Nov., a novel Gram-positive polyhydroxyalkanoate-accumulating coccus isolated from activated sludge,» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, pp. 1845-1849, 2002.

- [23] P. Spiekermann, B.H.A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister y A. Steinbüche, «A sensitive viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacterial that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, » *Archives of Microbiology*, vol. 171, pp. 73-80, 1999.
- [24] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker and P. Lant, «The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates,» *Progress in Polymer Science*, vol. 39, pp. 397-442, 2014.
- [25] Y. González, J.C. Meza, O. González y J.A. Córdova, «Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano,» *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 29, No. 1, pp. 77-115, 2013.
- [26] K. Yamashita, M. Yamada, K. Numata y S. Taguchi, «Nonspecific hydrophobic interactions of a repressor protein PhaR, with poly((R)-3-hydroxybutyrate) film studied with a quartz crystal microbalance,» *Macromolecules*, vol. 7, pp. 2449-2454, 2006.
- [27] G.P da Silva, M. Mack y J. Contiero, «Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology,» *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 30-39, 2009.
- [28] J. Guerrero, C. Tayà, A. Guisasola y J.A. Baeza, «Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal,» *Water Research*, vol. 445, pp. 2983-2991, 2012.
- [29] A. Banacore, G. Martínez y V. Saravia, «Producción de polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* utilizando glicerol como fuente de carbono, Instituto de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay.

[30] M. Berlanga, M. T. Montero, J. Hernandez-Borrell y R. Guerrero, «Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats,» *International*.

[31] R. Martínez, M. Ordoñez «Biosíntesis bacteriana de PHAs a partir de glicerol crudo», Centro de Investigación CINBIN, Bucaramanga, Colombia.

[32] A. Steinbüchel, «Production of rubber-like polymers by microorganisms,» *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, No. 3, pp. 261-270, 2003.

[33] Franco-Correa, M., Gómez-Méndez, D., Castro-Medina, N., & Rendón-Ruiz, M. «Polihidroxialcanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos,» *Revista peruana de Biología*, Vol. 16, pp 1-2, 2009.

[34] [Enlínea]  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363502?lang=en&region=CO>  
citado el 14 de mayo de 2015

## BIBLIOGRAFÍA

A. Banacore, G.Martínez y V. Saravia, «Producción de polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* utilizando glicerol como fuente de carbono, Instituto de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay.

A. Steinbüchel, «Production of rubber-like polymers by microorganisms,» *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, No. 3, pp. 261-270, 2003.

A. Titus y G.N. Pereira, «The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology,» [En línea], <http://www.ineedcoffee.com/05/actinomycetes/print.asp>, citado el 27 de marzo de 2015.

American chemistry council, Lifecycle of a Plastic Product, 2011.

B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker and P. Lant, «The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates,» *Progress in Polymer Science*, vol. 39, pp. 397-442, 2014.

B.H.A. Rehm, «Polyester synthases: natural catalysts for plastics,» *Biochemical Journal*, vol. 376, pp. 15-33, 2003.

C.S.K. Reddy, R. Ghai y V.C. Kalia, «Polyhydroxyalkanoates: an overview,» *Bioresource Technology*, vol. 87, No. 2, pp. 137-146, 2003.

D. Segura, R. Noguez y G. Espín, «Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables,» *Biotechnología*, vol. 14, pp. 361-372, 2007.

F. Matias, D. Bonatto, G. Padilla, M.F. Rodrigues y J.A. Pêgas, «Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil,» *NRC Research Press*, vol. 55, No. 7, pp. 790-800, 2009.

Franco-Correa, M., Gómez-Méndez, D., Castro-Medina, N., & Rendón-Ruiz, M. «Polihidroxiálcanoatos en actinomicetos nativos de suelos Colombianos,» *Revista peruana de Biología*, Vol. 16, pp 1-2, 2009.

G. Du y J. Yu, Green technology for conversion of food scraps to biodegradable thermoplastic polyhydroxyalkanoates, *Environmental science & technology*, vol. 36, pp. 5511-5516, 2002.

G.P da Silva, M. Mack y J. Contiero, «Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology,» *Biotechnology Advances*, vol. 27, pp. 30-39, 2009.

G.-Y.A. Tan, C.-L. Chen, L. Ge, L. Li, L. Wang, L. Zhao, Y. Mo, S.S. Tan y J.-Y. Wang, «Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis, » *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 117 No. 3, pp. 379-382, 2014.

Gómez, B. M, Utilización de marcadores lipídicos en el estudio de la biomasa, la estructura y el estado nutricional de las comunidades de los tapices microbianos del Delta del Ebro, Universidad Autónoma de Barcelona, 1998.

Instituto mexicano del plástico industrial, Enciclopedia del plástico, México, 1997.

J. Guerrero, C. Tayà, A. Guisasola y J.A. Baeza, «Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal,» *Water Research*, vol. 445, pp. 2983-2991, 2012.

J.Y. Leveau y M. Bouix, «Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial,» *Acribia Zaragoza*, 2000.

K. Yamashita, M. Yamada, K. Numata y S. Taguchi, «Nonspecific hydrophobic interactions of a repressor protein PhaR, with poly((R)-3-hydroxybutyrate) film studied with a quartz crystal microbalance,» *Macromolecules*, vol. 7, pp. 2449-2454, 2006.

M. Berlanga, M. T. Montero, J. Hernandez-Borrell y R. Guerrero, «Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats,» *International*.

M. Ezziyani, C. Pérez, M. Requena, A. Ahmed y M. Candela, «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.

M. Pötter y A. Steinbüchel, «Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation,» *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 60-552, 2005.

N. Ben-Omar, M.L. Merroun, J.M. Arias y M.T. Gonzalez, «Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass,» *Chemosphere*, vol. 35, No. 10, pp. 2217-283, 1997.

N.V. Ramadas, S.K. Singh, C.R. Soccol y A. Pandey, «Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM5149,» *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 52, No. 1 pp. 17-23, 2009.

P. Spiekermann, B.H.A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister y A. Steinbüche, «A sensitive viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacterial that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, » *Archives of Microbiology*, vol. 171, pp. 73-80, 1999.

P.A. Holmes and G.B. Lim, "Separation process". United States Patent 4910145, 1990.

P.M. Halami, «Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CRFo6,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, No. 6, pp. 805-812, 2008.

R. Martinez, M. Ordoñez «Biosíntesis bacteriana de PHAs a partir de glicerol crudo», Centro de Investigación CINBIN, Bucaramanga, Colombia.

S.Y. Lee, «Bacterial polyhydroxyalkanoates, » *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 49 pp. 1-14, 1996.

Sigmaldrich [En línea]  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363502?lang=en&region=CO>  
citado el 14 de mayo de 2015

U. Pieper and A. Steinbüchel, «Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*,» *FEMS Microbiology Letters*, vol. 75, No. 1, pp. 73-79, 1992.

W. Babel y A. Steinbüchel, *Biopolyesters: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 1° Edición, Springer-Verlag, Berlín, Alemania, pp. 342, 2011.

W.T. Liu, S. Hanada, T.L. Marsh, Y. Kamagata and K. Nakamura, «*Kineosphaera limosa* gen. nov., sp. Nov., a novel Gram-positive polyhydroxyalkanoate-accumulating coccus isolated from activated sludge,» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, pp. 1845-1849, 2002.

Y. González, J.C. Meza, O. González y J.A Córdova, «Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano,» *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 29, No. 1, pp. 77-115, 2013.

Y. Stanley, «The family *Streptomycetacea*,» *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 605-669, 2344-2347, 1994.

## ANEXOS

### Anexo A. Procedencia de las cepas de Actinomycetos

Tabla A1 Aislamiento de las cepas de Actinomycetos

<b>Procedencia</b>	<b>Aisladas de compostaje</b>	<b>Aisladas de aguas de las lagunas de tratamiento de mucílago</b>
CEPAS	ACPG1	MFSR1
	ACPG2	MFSR2
	ACPG3	MFSR3
	ACPG4	MFSR4
	ACPG5	MFSR6
	ACPG6	MFSR7
	ACPG7	MFSR8
	ACPG9	MFSR9
	ACPG10	MFSR10
	ACPG11	MFSR12
	ACPG12	MFSR13
	ACPG13	MFSR15

Las cepas de Actinomycetos son de una finca donde se realiza el beneficio del café en Los Santos (Santander) con coordenadas: 6°45'22" Norte y 73°6'8" oeste. Las aguas residuales del proceso de beneficio del café se tratan en una laguna de oxidación propia de la finca y los residuos sólidos del beneficio del café con un proceso de compostaje. Este trabajo de grado hace parte del proyecto VIE 1334 "Aislamiento y caracterización de cepas nativas de actinomycetos para la producción de hidrógeno a partir de mucílago de café". El aislamiento y caracterización de las cepas nativas corresponden a trabajos de grado que están siendo desarrollados por estudiantes de biología.

## Anexo B. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo

Tabla B1 Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo

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

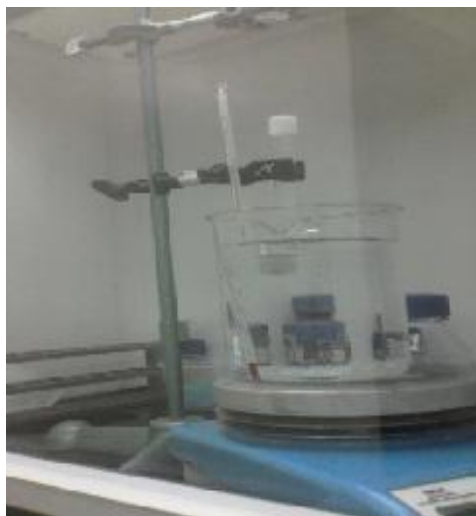
## **Anexo C. Análisis termo gravimétrico**

1. Se tomaron muestras de los cultivos especificados en el numeral 2.2 cepas y condiciones de crecimiento, los días 1, 3, 5, 7 y 9 utilizando tubo Eppendorf de 2 ml tomando muestra de tal manera que se obtuviera un pellet apreciable centrifugando a 15000g durante 3 minutos y retirando el sobrenadante.
2. La muestra puede ser conservada en el tubo Eppendorf a -20°C por varios días sin sufrir alteración alguna.
3. EL programa de temperatura usado en el TGA para la cuantificación del polímero intracelular fue :
  - Equilibrar la temperatura a 30°C.
  - Rampa de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup> hasta 110°C.
  - Isotherma durante 15 min.
  - Rampa de calentamiento de 10°C min<sup>-1</sup> hasta 210°C.
  - Isotherma durante 30 min.
  - Rampa de calentamiento de 10°C hasta 500°C.

## Anexo D. Metodología de metanólisis

Aproximadamente 8 mg de biomasa se agregaron a un tubo de ensayo de 12 ml, para posteriormente ser agregados 0,9 ml de metanol, 0,16 ml de ácido sulfúrico y 1,1 ml de cloroformo. Es necesario asegurarse que la biomasa y el tubo de ensayo se encuentren lo más secos posible debido a la violenta reacción entre el ácido sulfúrico y el agua. Mediante agitación por vórtex se asegura que entren en contacto ambas fases para posteriormente proceder a realizar el montaje como se describe en la Figura D1.

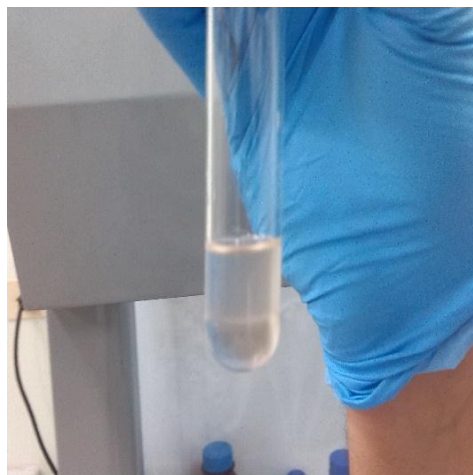
Figura D1. Montaje reacción de metanólisis



La reacción debe estar a una temperatura de 100°C por 140 min, tiempo en el cual debe haber una constante supervisión por parte del investigador para que el nivel del agua de calentamiento no disminuya y así la temperatura se mantenga en el valor deseado adicionando agua a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo de reacción se enfrían los tubos de ensayo rápidamente reemplazando el agua caliente por agua a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 0,53 ml

de agua destilada autoclavada al tubo de ensayo y se agitó mediante vórtex para favorecer la separación de las 3 fases, encontrando los detritos en la interfase y en el fondo del tubo de ensayo como la fase más clara, el polímero diluido en el cloroformo utilizado como solvente.

Figura D2. Fases



## Anexo E. Método de análisis GC-MS

**Tabla E2. Columna y condiciones de operación para el cromatógrafo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas para la identificación de PHAs.**

PHAs.

<b>Columna</b>	<b>Wax-DB5MS</b>
Altura de la columna	30 m
Diámetro de la columna	250 $\mu$
Gas fase móvil	Helio
Temperatura del inyector	250 °C
Volumen de la muestra	1 $\mu$ 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+

## **Anexo F. Preparación de la muestra en el DSC**

### 1. Preparación de la muestra.

- Se tomó una muestra de cultivo en su día óptimo de producción de biopolímero y se dejó secando durante toda una noche en la incubadora a 37°C.
- Finalmente la muestra se colocó en tubos Eppendorf, se centrifugó a 15000 g durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante.

### 2. Montaje de la muestra en el equipo DSC.

- La preparación de la muestra en el DSC requiere el uso de un portamuestra el cual debe ser pesado con la muestra y sin la muestra, antes de ser incorporado al aparato, teniendo sumo cuidado de que el peso de la muestra no supere los 20 mg.
- El equipo posee un portamuestra de referencia el cual también debe ser pesado.
- Los valores de los pesos del portamuestra vacío, la muestra y el pan hermético de referencia deben ser introducidos al software.
- El programa de temperatura utilizado en el equipo fue:
  - I. Equilibrar la temperatura a 30°C
  - II. Rampa de calentamiento de 20°C min<sup>-1</sup> hasta 115°C para el agua remanente
  - III. Equilibrar la temperatura a -20°C
  - IV. Rampa de calentamiento de 3 °C min<sup>-1</sup> hasta 225°C