

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO
PRODUCIDO A PARTIR DE *Bacillus megaterium* ATCC 14581 UTILIZANDO
GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DE BODIESEL COMO FUENTE DE
CARBONO

CAMILO JOSÉ YÁÑEZ DÍAZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO
PRODUCIDO A PARTIR DE *Bacillus megaterium* ATCC 14581 UTILIZANDO
GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DE BODIESEL COMO FUENTE DE
CARBONO

CAMILO JOSÉ YÁÑEZ DÍAZ

Trabajo de grado presentado para optar a título de Químico

Directora

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA

Química, Ph. D.

Codirectoras

CAROLINA GUZMÁN LUNA

Microbióloga Ambiental y Biotecnóloga, Ph. D

PAALO ANDREA MORENO YAÑEZ

Ing. Química, candidata a doctor en Ing. Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a toda mi familia por todo su apoyo moral durante mi vida.

A mí querida Paolo Moreno quien además de ser mi invaluable amiga, es mi modelo a seguir como investigador.

A Natalia Tarazona con quien compartí no solo trabajo exhaustivo sino innumerables momentos de amistad

A la doctora Marianny Combariza por darme la oportunidad de investigar junto a ella y ser mi guía en el proceso de aprendizaje.

A la doctora Carolina Gúzmán por la paciencia y el apoyo brindado en la realización del proyecto.

A mis amigos y compañeros quienes hicieron de mis años en la universidad los mejores de mi vida.

Camilo José Yáñez Díaz

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)	14
1.2. GRIB	17
1.3. PRODUCCIÓN MICROBIOLÓGICA DE PHA	18
1.4. EXTRACCIÓN DE PHB	20
1.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS	21
2. METODOLOGÍA	23
2.1. MATERIALES Y REACTIVOS	24
2.2. CARACTERIZACIÓN DEL GLICEROL	24
2.2.1. Medición del pH	25
2.2.2. Densidad	25
2.2.3. Cenizas	25
2.2.5. Nitrógeno total	25
2.2.6. Contenido de jabones	26
2.2.7. Contenido de glicerol y metanol	27
2.3. PRODUCCIÓN DE PHB	27
2.3.1. Determinación del FEX	27
2.4. ESTABLECIMIENTO DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN.	29
2.4.1. Metodología de extracción	29
2.4.2. Cuantificación	31
2.4.3. Caracterización mediante espectroscopia de resonancia magnética Nuclear	32

2.4.4.	Caracterización mediante espectroscopia en la región de infrarrojo	33
2.5.	DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE PRODUCCIÓN	33
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1.	CARACTERIZACIÓN DEL GLICEROL	35
3.2.	PRODUCCIÓN DE PHB	36
3.3.	ESTABLECIMIENTO DE METODOLOGIAS DE EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	37
3.3.1.	Metodología de extracción.....	37
3.3.2.	Metodología de cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis.	41
3.3.3.	Caracterización mediante RMN	45
3.3.4.	Caracterización mediante espectroscopia en la región de infrarrojo .	47
3.4.	DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE PRODUCCIÓN	49
4.	CONCLUSIONES	53
5.	RECOMENDACIONES.....	54
	BIBLIOGRAFIA	55
	ANEXO 1: LISTA DE MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	61
	ANEXO 2: RESULTADOS CICTA.....	62
	ANEXO 3.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del Polihidroxi butirato parte de los <i>scl</i> -PHA.....	15
Figura 2. Reacción de transesterificación(ACD LABS CHEMSKETCH Software)	18
Figura 3. Gráfica semilogarítmica de la curva de crecimiento bacteriano	19
Figura 4. Representación de la conversión de PHB a ácido crotonico para la cuantificación por UV-Vis	21
Figura 5. Metodología desarrollada	23
Figura 6. Curva de crecimiento y consumo de glicerol de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono.	36
Figura 7. Gráfico de Pareto estandarizado para la pureza experimentos	39
Figura 8. Gráfico de los efectos principales para la pureza en función de las variables evaluadas.....	40
Figura 9. Gráfico de interacción entre el tiempo y la temperatura	40
Figura 10. Espectro de absorbancia de soluciones de ácido crotonico obtenidas	42
Figura 11. Curvas de calibración de ácido crotonico. a) Rango de concentraciones 0-17 ppm. b) Rango de concentraciones de 270-3300 ppm.	43
Figura 12. Espectro de ¹ H-RMN del estándar de PHB (Sigma-Aldrich)	46
Figura 13. Espectro de ¹ H-RMN del PHB producido por <i>B. megaterium</i> ATCC 14581	46
Figura 14. Espectro IR del estándar de PHB (Sigma-Aldrich)	48
Figura 15. Espectro IR del PHB producido por <i>B. megaterium</i> ATCC 14581	48
Figura 16. Curva de producción de PHB y concentración de glicerol de <i>B.</i> <i>megaterium</i> ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono	49
Figura 17. Foto de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC14581 a las 12 horas de fermentación después del FEX	50
Figura 18. Biomasa y concentración de glicerol de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas del PHB	16
Tabla 2. Revisión bibliográfica de los métodos de extracción utilizando SDS.....	30
Tabla 3. Diseño experimental para encontrar variables favorables en el proceso de extracción con SDS	31
Tabla 4. Resultados de la caracterización del GRIB	35
Tabla 5. Resultados de la metodología de referencia y diseño de experimentos .	37
Tabla 6. ANOVA de los datos del diseño de experimentos	38
Tabla 7. Cuantificación de PHB utilizando diferentes diluciones	44
Tabla 8. Resultados de la caracterización del PHB producido mediante RMN	47

RESUMEN

TÍTULO: EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO PRODUCIDO A PARTIR DE *Bacillus megaterium* ATCC 14581 UTILIZANDO GLICEROL RESIDUO DE LA INDUSTRIA DE BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO*

AUTOR: Camilo José Yáñez Díaz**

PALABRAS CLAVE: Polihidroxitirato, Cuantificación, Extracción, Caracterización, Glicerol, *Bacillus megaterium*.

DESCRIPCIÓN

El polihidroxitirato es un poliéster sintetizado intracelularmente por un gran número de microorganismos como *Bacillus megaterium*. Este biopolímero puede ser utilizado en el reemplazo de materiales plásticos como el polipropileno o para la fabricación de implantes o suturas en la industria biomédica gracias a sus propiedades físicas y de biocompatibilidad. Diversos métodos de extracción han sido implementados para la obtención de este metabolito intracelular usando cloroformo o hipoclorito de sodio resultando en desventajas ambientales o de disminución de las propiedades físicas del biopolímero.

Este trabajo se centra en la implementación de métodos de extracción, cuantificación y caracterización del PHB producido por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 utilizando glicerol residuo de la industria del biodiesel (GRIB) como fuente de carbono. Para esto se estableció una metodología de producción y se realizaron ensayos con un patrón certificado. Todas las metodologías fueron posteriormente aplicadas en el análisis de la producción de PHB por parte del microorganismo de referencia.

Con el proceso de extracción establecido se obtuvo una pureza máxima del 25%, adicionalmente se implementaron métodos de cuantificación y caracterización mediante las técnicas de espectrofotometría UV-VIS y espectroscopias IR y ¹H-RMN. El análisis de producción de PHB en *B. megaterium* determinó que a partir de las 12 horas de acumulación, la concentración de PHB permanece constante consiguiendo valores de productividad y rendimiento con respecto a la biomasa de 0.0077 g/L*h y 8.3 % .

Se sugiere continuar con el mejoramiento de las técnicas de extracción usando métodos sonuquímicos y determinar el peso molecular promedio del biopolímero producido.

* Trabajo de grado.

** Universidad industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez. Co-director: Carolina GúzmánLúna, Paolo Andrea moreno.

ABSTRACT

TÍTULO: EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCED BY *Bacillus megaterium* ATCC14581 USING WASTE GLYCEROL FROM BIODIESEL INDUSTRY AS SOLE CARBON SOURCE*

AUTHOR: Camilo José Yáñez Díaz**

KEY WORDS: Polyhydroxybutyrate, Quantification, Extraction, Characterization, Glycerol, *Bacillus megaterium*.

Polyhydroxybutyrate is a polyester synthesized intracellularly by a large number of microorganisms as *Bacillus megaterium*. This biopolymer can be used as a replacement for plastic materials like polypropylene or for implant and sutures manufacturing sutures in the biomedical industry, thanks to its physical and biocompatibility properties. Several extraction methods have been implemented to obtain the intracellular metabolite using chloroform or sodium hypochlorite resulting in environmental drawbacks and reduction of the physical properties of the biopolymer.

This study focuses on implementing methods of extraction using dodecyl sodium sulphate, quantification and characterization of PHB produced by *Bacillus megaterium* ATCC 14581 using crude glycerol as carbon source. For this a production methodology was established and tests with a certified standard were conducted. All methods were then applied for the PHB production analysis by the used reference microorganism.

Favorable conditions for the extraction process were obtained, resulting in a purity maximum of 25%, Furthermore quantification and characterization methods were implemented using UV-VIS spectrophotometry and IR and ¹H-NMR spectroscopy techniques. Additionally since the 12 hours of accumulation, a constant concentration of PHB was obtained, achieving productivity and yield values of 0.0077 g / L * h 8.3%.

It is suggested to continue improving extraction techniques using sonochemical methods and determine the average molecular weight of the produced biopolymer.

* Degree project.

**Industrial university of Santander. Science faculty.Chemistry school. Director: MariannyYajairaCombarizaMontañez. Co-directors: Carolina GúzmánLúna, Paolo Andrea moreno.

INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHA) son metabolitos acumulados intracelularmente por algunos microorganismos, que actualmente han llamado la atención de la industria debido a sus diversas aplicaciones como remplazo de materiales plásticos. El polihidroxibutirato (PHB) es en la actualidad el más importante de los PHA debido al amplio estudio desarrollado sobre su estructura y propiedades fisicoquímicas. El costo de la fuente de carbono es uno de los principales limitantes de la producción de este biopolímero, ya que representa del 70 al 80% del costo total de los materiales de partida[1].

Una alternativa atractiva es la utilización del glicerol residuo de la industria de biodiesel (GRIB) como fuente de carbono en la producción de PHB, debido a su bajo costo y alta disponibilidad.

Tradicionalmente los PHA son producidos por microorganismos Gram negativos debido a los altos rendimientos que estos presentan, sin embargo, los materiales obtenidos a partir de estos, tienen problemas de biocompatibilidad y altos costos de purificación, por lo tanto, son poco viables para su utilización en la industria biomédica[2-4].

Bacillus megaterium ha sido identificado como productor de polihidroxibutirato. La identificación de genes relacionados con la síntesis de PHA, como el PHA sintasa, ha sido reportada en la literatura [5-7], así como su producción a partir de fermentaciones[8].

Con el fin de extraer este polímero de las células donde son producidos, se han desarrollado diferentes estrategias utilizando solventes, enzimas y compuestos para digerir la biomasa y liberar este compuesto. De las últimas la utilización de

surfactantes ha resultado prometedora, debido a su bajo costo e impacto ambiental[9].

La cuantificación y caracterización de este polímero ha sido realizada por diversas técnicas instrumentales como espectrofotometría UV-VIS, la resonancia magnética nuclear de protones y la espectroscopia en la región infrarroja[10-13].

El proyecto comenzó en el año 2009, en el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales (CEIAM), con el apoyo de la Vicerrectoría de investigación y extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander (UIS); como una búsqueda de microorganismos nativos con la capacidad de aprovechar el GRIB como fuente de carbono[14]

En octubre del año 2010 se continuó con el apoyo de Neomundo, definiendo como objeto de estudio las transformaciones microbiológicas del GRIB para producir PHB. Posteriormente en el 2011, gracias a los resultados obtenidos se participó con el proyecto: “Producción de bioplásticos a partir de residuos de la industria de biodiesel”, en la tercera edición del concurso Ideas 2011, promovido por el banco interamericano de desarrollo (BID) y los gobiernos de México y Corea del Sur.

El actual proyecto de grado tiene como objetivo el establecimiento de las técnicas de extracción, cuantificación y caracterización del PHB producido a partir de *Bacillus megaterium* ATCC 1458 utilizando GRIB como única fuente de carbono.

1. MARCO TEÓRICO

Los plásticos se encuentran entre los materiales más utilizados en el diario vivir, debido a ventajas características como su durabilidad, fácil moldeamiento y bajo costo de producción. Sin embargo, su fabricación está ligada a la explotación de petróleo como fuente de materias primas no renovables; y su disposición final tiene consecuencias ambientales desfavorables como la emisión de gases de invernadero debido a su incineración y la contaminación en suelos y cuerpos de agua debido a su baja biodegradabilidad[15].

Los plásticos derivados del petróleo han sido utilizados desde la década de los 40s. En los últimos veinte años, su dependencia y producción a nivel mundial se ha incrementado a una tasa del 5% anual. Según el programa ambiental de las naciones unidas -UNEP, sólo en el año 2010 se produjeron 265 millones de toneladas de plásticos, 15 millones más que el año anterior[16]

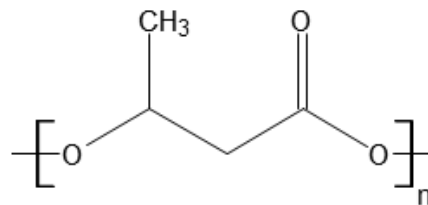
1.1. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

En respuesta a los problemas generados por los materiales plásticos se han investigado materiales alternativos como los PHA, poliésteres alifáticos, polisacáridos y mezclas de estos. Entre los mencionados, los PHA son poliésteres, sintetizados[17] y acumulados intracelularmente por bacterias, constituidos por monómeros de 3-hidroxiácidos unidos mediante los grupos funcionales alcohol y ácido carboxílico.

Los PHA se clasifican según el número de átomos de carbono en los monómeros, siendo de cadena corta "*scl (short chainlength)*" aquellos con 3 a 5 carbonos (figura 1), cadena media "*mcl (mediumchainlength)*" 6 o más carbonos y copolímeros formados por la combinación de los anteriores "*scl-co-mcl*"[5].

Por lo general los scl-PHA poseen propiedades termoplásticas y son más cristalinos que los mcl, mientras que estos últimos presentan un comportamiento de elastómero y adhesivo.

Figura 1. Representación gráfica del Polihidroxitirato parte de los scl-PHA(ACD LABS CHEMSKETCH Software)



Fuente: Autor

El polihidroxitirato (PHB) es el más representativo de los PHA, debido a su amplio estudio y producción a partir de diversas fuentes de carbono como, azúcares (glucosa, galactosa y fructosa, entre otros), ácidos grasos y glicerol[18, 19]. Fue descubierto por Lemoigne en 1926[20].

El PHB fue el primer PHA en ser utilizado en materiales compuestos gracias a su disponibilidad y a sus propiedades físicas, químicas y de degradación establecidas. Tiene una estructura amorfa en las inclusiones nativas y cristalina cuando es aislada de los microorganismos. Es un polímero rígido, insoluble en agua y tiene una resistencia a la tracción comparable con la del polipropileno. A pesar de ser un polímero producido naturalmente tiene propiedades mecánicas comparables a polímeros sintéticos biodegradables como los polilácticos[21].

El PHB tiene una morfología laminar y forma esferulitas cuando es cristalizado a partir de la masa fundida en materiales a gran escala. Las propiedades físicas de este polímero están resumidas en la tabla 1, donde se observan rangos de valores debido a que esas propiedades dependen del peso molecular promedio (M_w) de los polímeros, que varía desde 200 KDa hasta 3000 KDa[22]. El M_w del PHB depende de la fuente de carbono, el microorganismo utilizado para su producción, el método de extracción y la preparación de la muestra en el momento de análisis[2].

El costo de la fuente de carbono es uno de los principales limitantes de la producción de este biopolímero[1, 12], representando del 70 al 80% del costo total de los materiales de partida[23]; esto se debe a la utilización de azúcares como glucosa o sacarosa. Se ha investigado en la producción de PHB a partir de materiales económicos y renovables como aceite de frituras residual, suero de leche y glicerol residuo de la industria de biodiesel (GRIB), entre otros[24]. El GRIB es una fuente de carbono atractiva debido a ventajas económicas y de desarrollo industrial, ya que es posible utilizarlo sin un previo refinamiento[25]

Tabla 1. Propiedades físicas del PHB

Propiedad	Medida
Temperatura de fusión (°C)	160-177
Temperatura de transición vítrea (°C)	-4 a +15
Resistencia a la tracción (MPa)	15-40
Módulo de tracción (GPa)	1.1-3.5
Cristalinidad (%)	55-80
Elongación de ruptura (%)	1-6
Densidad (g*cm⁻³)	1.243
Índice de polidispersidad	1.9-2.1
Periodo de degradación	> 52 semanas
Modo de degradación	Hidrolítica, despolimerasa bacteriana
Angulo de contacto (°)	66

Fuente: [2]

Los PHA, especialmente el PHB tienen un gran potencial de uso en la industria médica; este muestra una alta biocompatibilidad y baja toxicidad hacia fibroblastos de células de ratón, condrocitos, osteoblastos y regiones gastrointestinales en ratones. De igual manera, la presencia de PHB de bajo peso molecular en la sangre humana y su descomposición en monómeros de ácido 3-hidroxibutírico, es evidencia de la alta biocompatibilidad y baja toxicidad de este material en humanos[2-4]. El PHB es utilizado actualmente en la fabricación de una gran variedad de productos médicos como implantes usados en hernioplastia, odontología y cirugía cardiovascular, medios de administración de medicamentos, suturas biodegradables, etc[26].

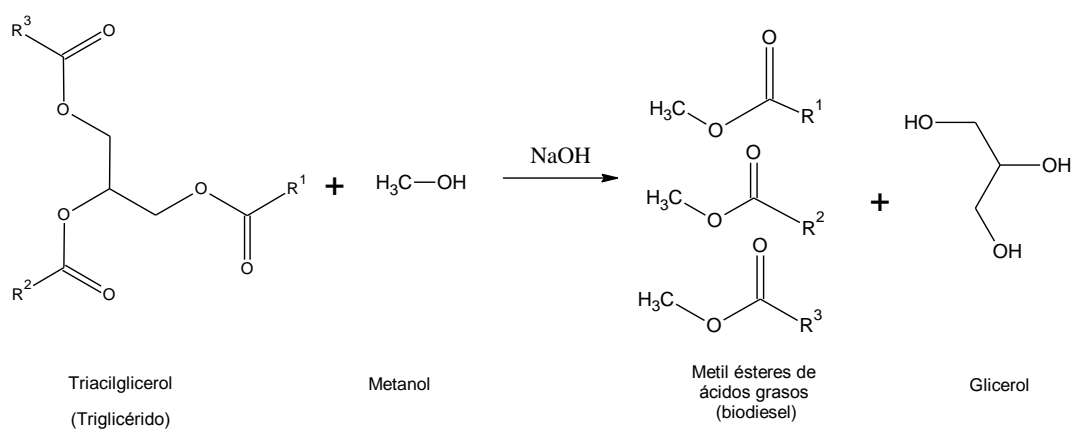
1.2. GRIB

El glicerol, representa el 10% de la producción en peso de biodiesel, y es un subproducto de la reacción de transesterificación de los triglicéridos contenidos en el material de partida en la producción de biodiesel (Figura 2.); el cual, con un grado de pureza, es ampliamente utilizado en las industrias cosmética, alimenticia y farmacéutica. Sin embargo, debido al contenido impurezas y al superávit de producción consecuencia del aumento de fabricación de biodiesel, el GRIB tiene bajo valor comercial.

En su refinamiento, mediante procesos como filtración, decantación, destilación e intercambio de iones, se eliminan metanol, jabones, ácidos grasos libres (FFA), humedad, color, olor y elementos metálicos presentes en trazas. Sin embargo, este tipo de tratamientos son costosos; por lo cual, es importante encontrar alternativas para la utilización del GRIB, sin ningún o con los menores tratamientos posibles[25, 27].

Para la utilización del GRIB como fuente de carbono en la producción microbológica de PHB es necesario conocer el contenido de las impurezas presentes en el, debido a que algunas de estas como el metanol, jabones y elementos metálicos, producen inhibición en el crecimiento de los microorganismos[28].

Figura 2. Reacción de transesterificación(ACD LABS CHEMSKETCH Software)



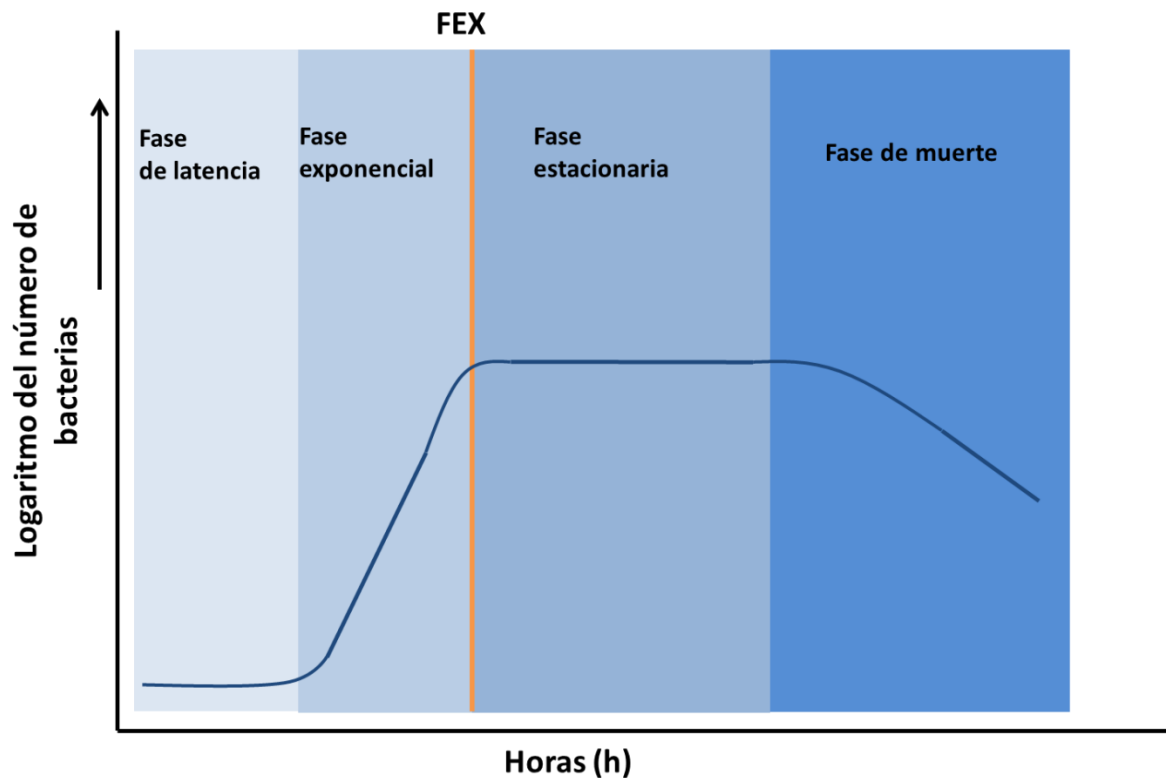
Fuente: [29]

1.3. PRODUCCIÓN MICROBIOLÓGICA DE PHA

Las bacterias utilizadas para la producción de PHA pueden ser divididas en dos grupos basados en las condiciones de cultivo para la biosíntesis de PHA. El primer grupo son bacterias que producen PHA en condiciones de limitación de nutrientes esenciales como N, P, O, Mg, K ó S y exceso de fuente de carbono. El segundo grupo se refiere a bacterias que no necesitan limitación de nutrientes y acumulan PHA durante su crecimiento.

El método más utilizado para la acumulación de PHB en bacterias del primer grupo consiste en dos etapas, en el cual se usa un medio sin limitación de nutrientes para el crecimiento bacteriano hasta llegar al fin de la etapa exponencial del crecimiento (FEX), como se muestra en la figura 3, a partir de la cual se limita un nutriente esencial para permitir la acumulación eficiente de PHA[30].

Figura 3. Gráfica semilogarítmica de la curva de crecimiento bacteriano



Fuente: [31, 32]

Actualmente, la producción de PHB es liderada por bacterias Gram negativas como *Cupriavidus necator*[3], sin embargo, estos microorganismos contienen en su membrana exterior endotoxinas pirógenas de tipo lipopolisacáridos (LPS) que comúnmente se co-purifican junto con los PHB. Los LPS pueden causar reacciones inmunológicas haciendo que el PHB producido por bacterias Gram negativas sea indeseable para su utilización en el campo biomédico. Por otra parte, las bacterias Gram positivas como el género *Bacillus* no contienen LPS en

su membrana, tienen un rápido crecimiento en sustratos económicos, toleran altas temperaturas, tienen altas presiones osmóticas y han sido utilizados para la producción industrial de PHB por la empresa Biocycles en Brazil.[3, 7, 8]

Bacillus megateriumes un bacilo Gram positivo, aerobio, esporulado y en ocasiones se agrupa en cadenas cortas. Este microorganismo se encuentra comúnmente en suelos y tiene una gran variedad de usos en la industria, entre los que sobresalen la producción de enzimas como la α y β -amilasa y la síntesis de compuestos como las ciclodextrinas, además de su uso como probiótico acuático; adicionalmente este microorganismo ha sido identificado como productor de PHB[13, 33, 34].

1.4. EXTRACCIÓN DE PHB

El PHB es acumulado intracelularmente, haciendo que sea necesario extraerlo de las células donde es sintetizado. Existen diversos métodos de extracción de este polímero entre los cuales se destaca la extracción con solvente, debido a la alta pureza obtenida y no degradación de los polímeros[9]. Este se basa en largos y dispendiosos procedimientos con solventes clorados como el cloroformo, sin embargo, este procedimiento no es conveniente debido a su potencial daño a la salud y adicionalmente su empleo contradice la ventaja ambiental del biopolímero.

Se han explorado otros métodos de extracción como la digestión de las células en soluciones enzimáticas o de hipoclorito de sodio con resultados desfavorables como el aumento de costos de producción[35] o la disminución del peso molecular promedio del polímero[9], respectivamente. Procesos de extracción utilizando surfactantes o métodos sonoquímicos resultan prometedores para la solución de este problema[9, 24, 35,36]

El dodecil sulfato de sodio (SDS), se introduce en la bicapa lipídica de la membrana celular aumentando el volumen hasta llegar a la ruptura celular, donde el PHB es liberado y se forman micelas de surfactante y fosfolípidos. El SDS

también tiene la función de solubilizar todo los residuos celulares haciendo que el PHB pueda ser asilado mediante centrifugación.[35, 37].Se ha demostrado que mediante un tratamiento térmico posterior a la digestión utilizando SDS es posible reducir el nivel de proteínas celulares en el producto extraído hasta un 5%, eliminando el porcentaje restante mediante procesos de lavado con agua destilada[38].

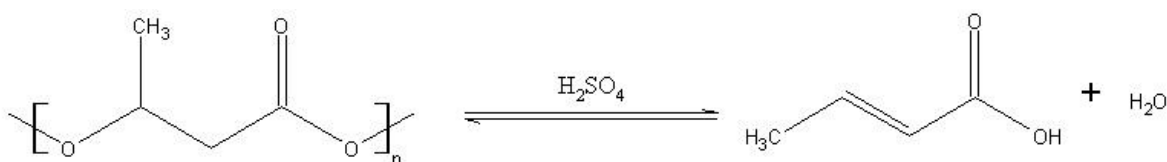
Consecuentemente el establecimiento de métodos alternativos de extracción de estos metabolitos es pertinente desde el punto de vista técnico e investigativo.

1.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Existen diversos métodos de cuantificación del PHB entre los cuales se destacan la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC-MS)[10, 23, 39, 40], la espectrofotometría en la región ultravioleta-visible (UV-Vis)[11, 41] y la resonancia magnética nuclear (RMN)[36]. Los dos primeros métodos requieren de la transformación del polímero en moléculas pequeñas.

En el caso de la cuantificación mediante GC-MS se realiza la metanolisis o propanolisis del polímero para obtener los ésteres metílicos o propílicos del monómero y en UV-Vis, el PHB es sometido a hidrolisis ácida utilizando ácido sulfúrico concentrado obteniendo ácido crotonico; en ambos casos se cuantifican las moléculas pequeñas resultantes mediante curvas de calibración.

Figura 4. Representación de la conversión de PHB a ácido crotonico para la cuantificación por UV-Vis



Fuente: Autor

Por otra parte la cuantificación por RMN H^1 se considera un método directo, el cual se lleva a cabo mediante la relación entre las señales del PHB y un estándar interno de concentración conocida. El estándar utilizado para dicha cuantificación debe cumplir con ciertas características como: completa solubilidad en el solvente de análisis, estabilidad en las condiciones de análisis, baja reactividad, baja volatilidad y por lo menos una señal aislada en el espectro de H^1 .

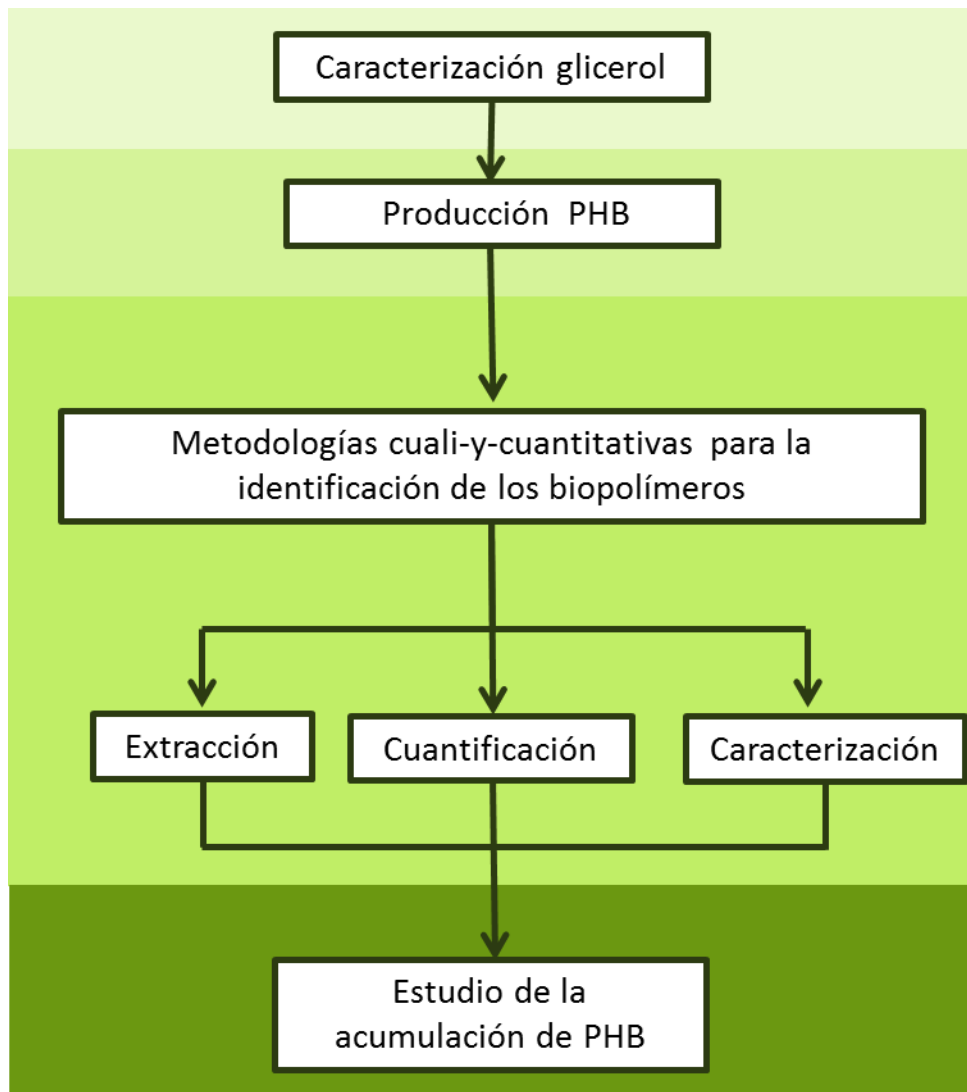
La cuantificación realizada por este método es directa y elimina el error proveniente de realizar reacciones preliminares a la cuantificación, como en los casos de los métodos de UV-VIS y GC-MS mencionados anteriormente.

El PHB se ha identificado mediante técnicas espectroscópicas como la espectroscopia de RMN H^1, C^{13} [10, 36, 42, 43] y la espectroscopia en la región infrarroja (IR)[10, 42]. Mediante estas técnicas se obtienen espectros característicos del polímero que se comparan con los reportados en la literatura. En el caso de RMN H^1, C^{13} se obtienen señales correspondientes a los diferentes tipos de hidrogenos y carbonos contenidos en la molécula, las cuales según su área bajo cada pico y corrimiento en el espectro indican el número de núcleos correspondientes a la señal y su entorno químico. En IR se obtiene un espectro con bandas atribuidas grupos funcionales que absorben radiación en la región infrarroja, teniendo el PHB bandas características de vibración de enlace C=O y C-O reportadas en la regiones de 1724-1740 y 1287 cm^{-1} respectivamente[11, 12].

2. METODOLOGÍA

En la figura 5, aparece la metodología empleada para el desarrollo del proyecto de investigación.

Figura 5. Metodología desarrollada



2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

El GRIB utilizado para el desarrollo de este proyecto fue proporcionado por una empresa colombiana productora de biodiesel. Los reactivos y equipos utilizados están listados en el anexo 1.

2.2. CARACTERIZACIÓN DEL GLICEROL

El glicerol utilizado en la producción microbiológica del PHB fue previamente neutralizado, para asegurar un pH inicial de 7 en las fermentaciones. Se utilizó una solución 1 N de hidróxido de amonio la cual fue goteada sobre el glicerol midiendo el pH constantemente, mediante un pHmetro previamente calibrado a dos puntos con soluciones estándar con valores de 7.00 ± 0.01 y 4.00 ± 0.01 en la escala.

En la tabla 1. Se resumen los métodos por los cuales se realizó la caracterización

Tabla 1. Métodos de caracterización del glicerol.

Parámetro Físicoquímico	Método/Equipo	Referencias	
pH	pHmetro	[44-47]	
Densidad	Picnómetro		
% Glicerol	HPLC-RI		
% Humedad	NTC287:2002		
% Cenizas	Calcinación		
% Nitrógeno Total	AOAC 928.08 18th Edition Kjeldahl		
MONG*	% Metanol		HPLC-RI
	% Jabones		Titulación colorimétrica
	% OMO**	Balance de masa	

* Materia Orgánica No Glicerol

** Otra Materia Organica.

2.2.1. Medición del pH La medición del pH se llevó a cabo mediante un pHmetro, previamente calibrado como se indicó anteriormente.

2.2.2. Densidad La densidad fue medida mediante un picnómetro de 5 mL limpio y seco. Se pesó el picnómetro antes y después de agregar el glicerol. Se realizaron las medidas por triplicado. La densidad fue calculada mediante la ecuación 1.

Ecuación 1. Expresión matemática para el cálculo de la densidad

$$d = \frac{m - m_p}{5 \text{ ml}}$$

Donde d, es la densidad; m, la masa del picnómetro con glicerol y m_p , la masa del picnómetro vacío.

2.2.3. Cenizas Se pesaron 5 gramos de muestra y posteriormente se depositaron en crisoles previamente secos durante 2h a 120°C. La muestra fue calcinada junto con un blanco a una temperatura de 750°C siguiendo una rampa de 1°C/min hasta llegar a 410 °C y subiendo luego a 5°C/min hasta llegar a 750 °C.

2.2.4. Humedad El contenido de humedad fue determinado por analistas del CICTA siguiendo la metodología descrita en la Norma Técnica Colombiana 287.

2.2.5. Nitrógeno total El contenido de nitrógeno total fue determinado por analistas del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos(CICTA) por el método de Kjeldahl siguiendo la norma internacional AOAC 928.08 18th edition.

2.2.6. Contenido de jabones Esta titulación colorimétrica es una versión modificada del método AOCS Cs 17-79, jabón en aceite[29].

Se disolvió una cantidad conocida de glicerol crudo en 50 mL de agua destilada y se agregaron 4 gotas de azul de bromofenol (0.04% en H₂O). Posteriormente la solución fue titulada con una solución previamente estandarizada de ácido clorhídrico 1N hasta viraje amarillo.

Se utilizó la ecuación 2 para la cuantificación de jabones en las muestras de glicerol crudo:

Ecuación 2. Expresión matemática para el cálculo del contenido de jabones

$$\frac{mg. jabón}{kg. muestra} = \frac{v * [HCl] * 292.31 * 1x10^6}{1000 * w}$$

Fuente:[44]

Donde *v*, es volumen de HCl adicionado en la segunda titulación (ml); *w* es el peso de la muestra de glicerol crudo en gramos (g); [HCl], es concentración de la solución de ácido clorhídrico estandarizada (Normalidad) y el valor 292.31 es el peso molecular promedio de las sales de sodio que se encuentran en el glicerol crudo proveniente del biodiesel desde aceite de palma africana. (Esta constante se calculó a partir de las concentraciones porcentuales de los ácidos grasos mayoritarios contenidos en el aceite de palma africana[44, 48])(g/mol).

2.2.7. Contenido de glicerol y metanol Las muestras de glicerol crudo fueron diluidas, pasadas mediante filtros OlimPeak de polifloruro de vinilideno (PDVF) de 0.45 μm y almacenadas en viales de cromatografía líquida.

Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies serie 1100 acoplado a un detector de índice de refracción Agilent Technologies 1200, utilizando una columna SUPELCOGEL™ C-610H. La condiciones de análisis fueron las siguientes: volumen de inyección 20 μL ; fase móvil: ácido sulfúrico 5mM; flujo 0.6 ml/min; temperatura de la columna y del detector de 30°C y 35°C. La cuantificación de los analitos mencionados fue realizada mediante el método de patrón externo con curvas de calibración de 5 puntos. Cada medición se realizó por triplicado.

2.3. PRODUCCIÓN DE PHB

La producción de PHB fue realizada en dos etapas por *B. megaterium* ATCC 14581, utilizando GRIB como única fuente de carbono. La primera etapa busca obtener la mayor concentración de células del microorganismo, para lo cual es necesario llegar hasta el fin de la etapa exponencial (FEX); la segunda etapa tiene como fin la acumulación de PHB. Para conocer la duración de la primera etapa, fue necesario determinar el tiempo en el cual el microorganismo llegaba al FEX y la duración de la segunda etapa fue de 4 horas.

2.3.1. Determinación del FEX Con el propósito de determinar el FEX se llevó a cabo la curva de crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581, utilizando GRIB como única fuente de carbono en un medio nutritivo. Esta curva fue desarrollada en el laboratorio de microbiología de la universidad industrial de Santander por miembros del centro de estudio e investigaciones ambientales (CEIAM).

Adicionalmente se cuantificó el consumo de glicerol durante la curva de crecimiento del microorganismo. Se filtró 1 ml del caldo de cultivo mediante filtros OlimPeak de PDVF de 0.45 μm y se almacenó en viales de HPLC; las condiciones cromatográficas fueron las especificadas en el método mencionado en la sección 2.2.7.

2.3.2. Producción de PHB en dos etapas para la primera etapa colonias de *B. megaterium* ATCC14581 fueron agregadas a un medio nutritivo con GRIB como única fuente de carbono. El cultivo fue realizado en 50 ml de este medio en erlenmeyers de 250 ml durante 7 horas a una temperatura de 37 °C y una agitación de 200 rpm.

La biomasa fue posteriormente obtenida por centrifugación a 3420g durante 5 min y resuspendida en un medio de sales con GRIB como única fuente de carbono. La segunda etapa se llevó a cabo durante 4 horas a 30°C y 150 rpm.

2.4. ESTABLECIMIENTO DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN.

2.4.1. Metodología de extracción El PHB producido se extrajo de la biomasa realizando una digestión con dodecil sulfato de sodio (SDS) y recuperando el polímero por medio de lavados y centrifugación.

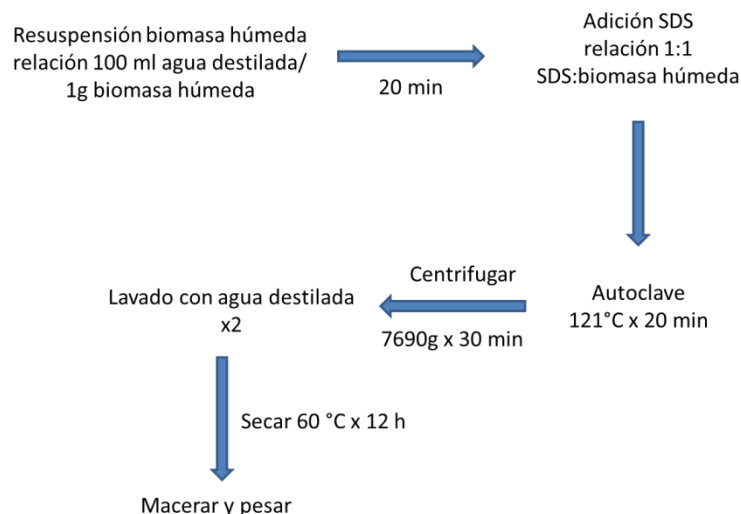
Para realizar los ensayos del establecimiento de las metodologías de cuantificación se realizaron extracciones del polímero con una metodología de referencia[36].

Adicionalmente se realizó un diseño experimental para hallar condiciones favorables en el proceso de digestión de la biomasa, tomando como variables críticas la temperatura, el tiempo y la cantidad de SDS agregado en relación a la biomasa húmeda obtenida en el paso de producción.

2.4.1.1. Metodología de referencia

Se centrifugaron 20 ml del medio de sales resultante de la etapa de producción a 3420g durante 5 minutos. En el Esquema1se representa la metodología de referencia.

Esquema 1. Metodología de extracción reportada por Strazzulo y otros[36].



2.4.1.2. Diseño experimental. Se realizó un diseño de experimentos factorial con dos niveles y tres variables para hallar condiciones favorables del proceso de digestión de la biomasa. Las variables y los niveles fueron elegidos de acuerdo a la revisión bibliográfica presentada en la tabla 2. La variable de respuesta a evaluar fue el porcentaje de pureza del PHB obtenido después de la extracción.

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los métodos de extracción utilizando SDS

Autor/año	Concentración SDS	Relación SDS/peso húmedo	Tiempo	Temperatura °C
Thakor 2005	Puro	0.5:1	20 min	90
Yang 2011	50g/L	2.5:1	3 h	60
Lo 2011	100 g/L	10.0:1	10 min	50
Naheed 2012	Puro	0.5:1	1 h	37
Strazullo 2008	Puro	1.0:1.0	1h	50
Kim 2003	Puro	0.1-0.7:1.0	1	30

Los niveles y variables elegidas se encuentran en la tabla 3, en la cual se puede observar que se eligió un nivel alto y uno bajo para cada variable resultando en 8 experimentos diferentes realizados por triplicado dando un total de 24 experimentos. En el caso de la temperatura se eligió como nivel alto 65 °C debido a que era la temperatura máxima de trabajo del agitador termostático utilizado en el paso de la digestión con SDS.

Tabla 3. Diseño experimental para encontrar variables favorables en el proceso de extracción con SDS

		Tiempo	Temperatura	
			30°C	65°C
Relación Biomasa húmeda:SDS	0,5	20 min	D1	D2
	2,5		D3	D4
	0,5	180 min	D5	D6
	2,5		D7	D8

2.4.2. Cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis La cuantificación mediante esta técnica incluye la previa conversión del PHB en ácido crotónico, para lo cual fue necesario disolver el analito en ácido sulfúrico concentrado y calentar la solución resultante a 100 °C durante 20 min[49]. Todas las muestras fueron posteriormente depositadas en tubos de ensayo y las lecturas de absorbancia se realizaron tomando como blanco ácido sulfúrico concentrado en un espectrofotómetro Shimadzu en el laboratorio de instrumentación química.

El primer paso del establecimiento del método fue hallar la longitud de onda de absorción máxima del ácido crotónico, para lo cual se realizó un barrido espectral desde 400 hasta 200 nm a soluciones del patrón de PHB convertido en ácido crotónico mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Después se estableció el rango de linealidad para la ley de Beer, realizando medidas de absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima a un rango de concentraciones del patrón de PHB en ácido sulfúrico.

Para la determinación del contenido de PHB en una muestra real fue necesario realizar una serie de diluciones para ajustar la concentración de la muestra al rango de cuantificación hallado.

Todas las cuantificaciones fueron realizadas mediante el método de curva de calibración utilizando un estándar de PHB (Sigma- Aldrich) con 6 puntos cada uno leído por triplicado. Las curvas fueron realizadas cada vez que se tomaban lecturas en el equipo ya mencionado. La determinación de los límites de detección y cuantificación fue realizada mediante el cálculo de la raíz del promedio del error cuadrado, RMSE (“Root Mean Square Error”).

Con el fin de hallar el error experimental de la técnica se tomó 1 mg de patrón de PHB y se realizó una solución con un volumen final de 5mL utilizando ácido sulfúrico concentrado, la solución fue luego diluida hasta 5 ppm y preparada como se indicó anteriormente. La determinación del error experimental se realizó mediante la ecuación 3.

Ecuación 3. Expresión matemática para el cálculo del error experimental

$$\%Error_{exp} = \frac{C_{teorica} - C_{experimental}}{C_{teorica}} \times 100$$

2.4.3. Caracterización mediante espectroscopia de resonancia magnética Nuclear La caracterización del PHB por medio de H^1 -RMN fue realizada en el equipo Bruker avance de 400 MHz, mediante la adquisición de espectro utilizando secuencia de pulsos zg 30 ° con 32 scans en el caso del estándar de PHB y 256 scans para la muestra producida en el presente trabajo.

Se adquirieron los espectros del estándar de PHB y las muestras reales de PHB producido por *B. megaterium* ATCC 14581, tomando 1 mg de muestra disolviéndolos en 700 μ L de $CDCl_3$. Para lograr completa dispersión del analito se sometió la mezcla a un baño de ultrasonido a una temperatura de 70 °C durante 2 horas.

Después de obtenida la FID de cada una de las muestras, se procesó mediante el software ACD/NMR Processor Academic Edition Version 12.01, donde se aplicó la transformada de Fourier para obtener el espectro dependiente de la frecuencia. Se corrigió la línea base y se asignó la escala mediante el corrimiento del tetrametilsilano (TMS) en 0 ppm. Los corrimientos de las señales fueron tabulados y comparados.

2.4.4. Caracterización mediante espectroscopia en la región de infrarrojo El polímero fue caracterizado mediante la comparación de los espectros del patrón de PHB y el polímero recuperado de la biomasa tomados en un equipo FTIR Bruker Tensor 27 equipado con un aditamento de reflectancia difusa.

Para la adquisición de los espectros, se tomó entre 1 - 2 mg de muestra y fue depositada en la ventana del aditamento de reflectancia difusa. Los espectros fueron tomados entre 400 y 4000 cm^{-1} .

2.5. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE PRODUCCIÓN

Los métodos de extracción y cuantificación establecidos fueron aplicados para la determinación de la curva de producción de PHB por parte *B. megaterium* ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono.

La producción de PHB se realizó en dos etapas. Para la primera se agregaron colonias del microorganismo a 50 mL de medio nutritivo modificado con GRIB como única fuente de carbono en erlenmeyers de 250 ml. El medio fue llevado a un agitador termostático a 37 °C con agitación constante de 200 rpm por 7 horas. En esta etapa el microorganismo llega al FEX y alcanza el mayor punto de crecimiento. Para la segunda etapa la biomasa fue obtenida por centrifugación a 3420g por 5 min y posteriormente resuspendida en 50 ml de un medio de sales modificado con GRIB como única fuente de carbono en erlenmeyers de 250 mL.

Cada 4 horas hasta llegar a un tiempo total de 41 horas se tomaron medidas de pH, consumo de glicerol, producción de PHB, peso seco y viabilidad de las células por el método de recuento en placa. Adicionalmente se realizó la coloración sudan negro como un control de calidad cualitativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL GLICEROL

Los resultados de la caracterización del GRIB se encuentran resumidos en la tabla 4. Los valores fueron reportados como el promedio de 3 repeticiones y el intervalo de confianza calculado para un 95 % de confianza de los datos. En el caso de los valores de humedad y contenido de nitrógeno estos fueron reportados como lo indicaban los análisis realizados por el CICTA (Anexo 2)

Tabla 4. Resultados de la caracterización del GRIB

Parámetro		Muestra
Fisicoquímico		Crudo 1
pH		6.414 ± 0.124
Densidad (g/ml)		1.04 ± 0.01
Glicerol (% p/p)		51.43 ± 0.23
Humedad (% p/p)		49.26 ± 0.02
Cenizas (% p/p)		2.85 ± 0.25
Contenido de nitrógeno (% p/p)		n.d*
MONG (% p/p)	Metanol (% p/p)	3.57 ± 0.05
	Jabones (% p/p)	1.34 ± 0.17

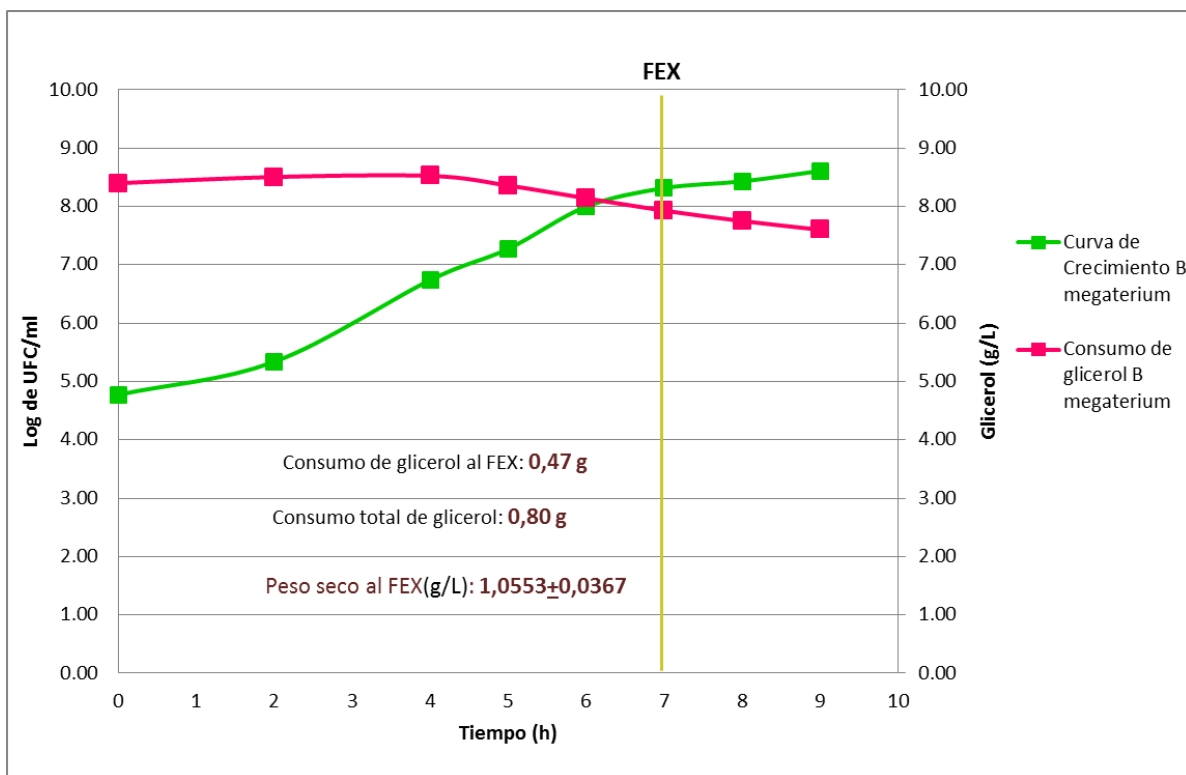
*n.d: no detectado

Se puede observar que el GRIB utilizado para la producción de PHB se compone principalmente de agua y glicerol. El alto contenido de agua se debe a que este es previamente mezclado en la planta de producción con aguas de lavado que a la vez tienen un pequeño porcentaje de ácido acético, el cual a la vez explica el pH levemente ácido que se reporta. El contenido de jabones y metanol, los cuales provienen de los sustratos que se utilizan en la producción de biodiesel, son los componentes que inhiben el crecimiento del microorganismo y se encuentran en una cantidad mínima, haciendo que el GRIB sea una fuente de carbono viable para la producción de PHB.

3.2. PRODUCCIÓN DE PHB

En la figura 6 se observa la curva de crecimiento y el consumo de glicerol de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono.

Figura 6. Curva de crecimiento y consumo de glicerol de *B. megaterium* ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono.



En la figura 6 se observa en color verde la curva de crecimiento del microorganismo, la cual se encuentra en función del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro. La etapa de latencia de *B. megaterium* es prácticamente inexistente debido a la previa adaptación de la bacteria al GRIB, realizada por miembros del CEIAM. La etapa exponencial concluye en la hora 7, a partir de donde se observa un número aproximadamente constante de unidades formadoras de colonia por mililitro, siendo este el punto denominado como FEX. El consumo de glicerol es representado por la curva de color fucsia y está reportado en unidades de gramos por litro. Se puede observar que el consumo de glicerol

aumenta significativamente después de las 4 horas siendo a las 7 horas de 0.47 g y a las 9 horas de 0.8g.

Para la segunda etapa de producción se obtuvieron valores promedio de concentración de PHB y rendimiento con respecto a la biomasa de 0.1 g/L y 8.1% respectivamente.

3.3. ESTABLECIMIENTO DE METODOLOGIAS DE EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

3.3.1. Metodología de extracción

En la tabla 5. Se encuentran los resultados de la metodología de referencia y el diseño de experimentos realizado para encontrar las condiciones favorables para la extracción del PHB producido.

Tabla 5. Resultados de la metodología de referencia y diseño de experimentos

Experimento	SDS/bio hum	t dig (min)	T dig (°C)	% Pureza PHB
S1	1	60	50	13
S1R	1	60	50	15.2
D1				17.4
D1 R	0.5	20	30	16.4
D1 RR				17
D2				14.9
D2 R	0.5	20	65	16.2
D2 RR				20.1
D3				16.2
D3 R	2.5	20	30	14.3
D3 RR				15.9
D4				19.8
D4 R	2.5	20	65	22.5
D4 RR				23.8
D5				23.3
D5 R	0.5	180	30	25.7
D5 RR				24.7
D6				12
D6 R	0.5	180	65	18.4
D6 RR				16.2
D7				24.8
D7 R	2.5	180	30	20.9
D7 RR				25
D8				13.5
D8 R	2.5	180	65	14.1
D8 RR				13.8

Se observa que los porcentajes de pureza de todos los experimentos realizados en el diseño experimental son mayores a los de la metodología de referencia utilizada. Esto se debe a que las condiciones reportadas por Strazzullo y otros[36], fueron diseñadas para la extracción del PHB producido por un microorganismo de genero diferente al utilizado en el presente trabajo como lo es *Halomonascampaniensis*.

El diseño experimental realizado fue analizado utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1. En primera instancia se realizó el test de Shaphiro-Wilks para comprobar una distribución normal en los datos. Este test dio como resultado un valor P de 0.0617 que a un nivel de confianza del 95% es mayor al valor alfa de 0.05[50], indicando que la distribución es considerada normal, a partir de lo cual se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los datos, el cual se encuentra resumido en la tabla 6.

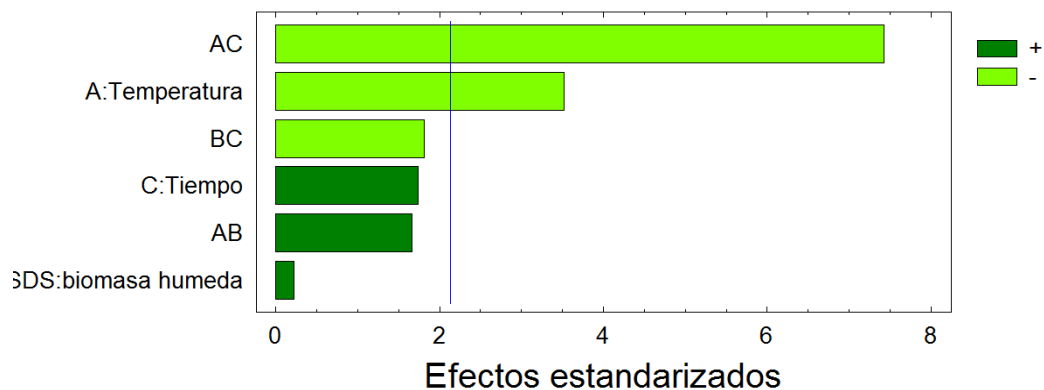
Tabla 6. ANOVA de los datos del diseño de experimentos

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Temperatura	54.9037	1	54.9037	12.41	0.0031
B:Relación SDS:biomasa húmeda	0.220417	1	0.220417	0.1	0.8264
C:Tiempo	13.3504	1	13.3504	3.02	0.1029
AB	12.1837	1	12.1837	2.75	0.1178
AC	243.844	1	243.844	55.1	0.0000
BC	14.5704	1	14.5704	3.29	0.0897
bloques	13.3633	2	6.68167	1.51	0.2527
Error Total	66.3838	15	4.42558		
Total (corr.)	418.82	23			

El diseño experimental planteado permite evaluar la influencia de cada una de las variables sobre el factor de respuesta y las interacciones entre estas. El valor P presentado en la tabla 6 para cada una de las variables indica si este es menor que el valor alfa 0.05 a un nivel de confianza del 95% la influencia significativa de esta variable sobre el pureza. De acuerdo con los valores presentados en la tabla 6, el único efecto principal influyente es la temperatura y la única interacción significativa es la de la temperatura con el tiempo.

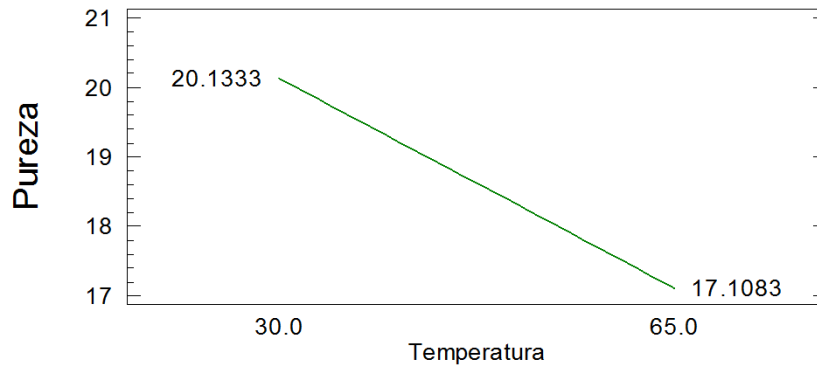
El gráfico de Pareto estandarizado representa los efectos divididos entre su error estándar, la línea vertical representa el valor crítico de las tablas de la distribución *T* de Student para los grados de libertad del error. Si la magnitud representada por las barras horizontales sobrepasa la línea vertical, se considera el efecto significativo. Se puede observar que este grafica está de acuerdo con lo presentado en el ANOVA y además permite ver que los efectos de la temperatura y la interacción entre la temperatura y el tiempo son negativos.

Figura 7. Gráfico de Pareto estandarizado para la pureza experimentos



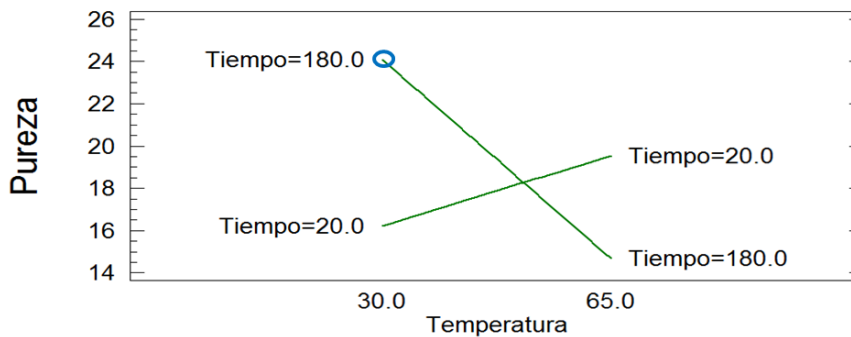
Estos efectos pueden ser visualizados de mejor manera en las figura 8 y 9. Donde, en la figura 8, en el eje Y se encuentra el porcentaje de pureza y en el eje x los valores para los niveles de la temperatura. Se observa el efecto negativo sobre la pureza cuando se incrementa la temperatura, haciendo que sea deseable trabajar con temperaturas bajas en el caso de la extracción del PHB mediante SDS.

Figura 8. Gráfico de los efectos principales para la pureza en función de las variables evaluadas



La figura 9 muestra el gráfico de interacción entre la temperatura y el tiempo, se observa en el eje y, el porcentaje de pureza y en el eje x el cambio entre los dos niveles de temperatura. Las dos líneas trazadas corresponden a los dos niveles de tiempo. Se puede apreciar que cuando el tiempo está en el nivel bajo la pureza aumenta con respecto a la temperatura. Sin embargo para el nivel alto de tiempo se observa lo contrario, una mayor temperatura resulta en un descenso en la pureza. El mejor tratamiento se encuentra resaltado por el círculo azul donde se tienen condiciones de 30 °C y 180 min. Debido a que la influencia de la relación SDS: biomasa húmeda no es significativa, se eligió el valor de 0.5 puesto que significaría un ahorro en el gasto de reactivos y una menor contaminación por el descarte de surfactante.

Figura 9. Gráfico de interacción entre el tiempo y la temperatura



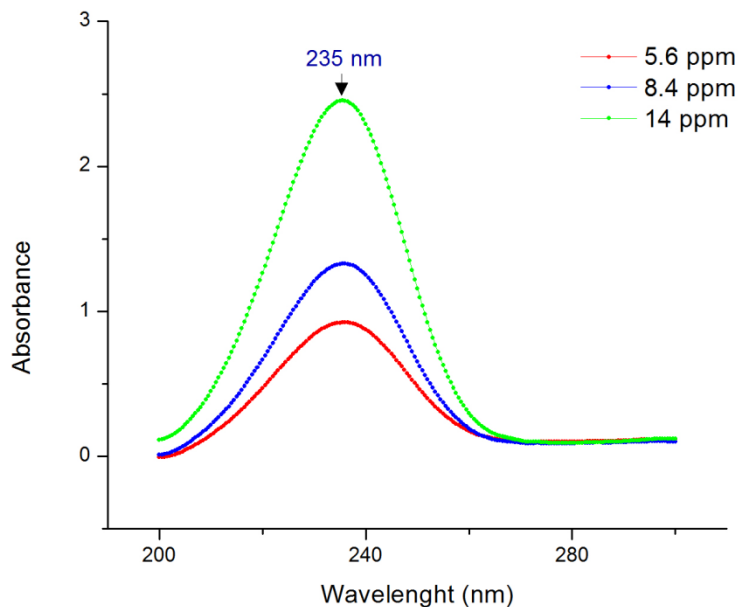
Las mejores condiciones para el rango evaluado de temperatura, tiempo y relación de SDS: biomasa húmeda son las correspondientes al experimento D5 (tabla 3), obteniendo una pureza máxima de 25.7%.

El valor máximo de pureza conseguido no es comparable con los valores reportados en la literatura, los cuales varían entre 90 y 99%[35, 36, 51]. Esto se debe a que a las 4 horas de acumulación, *Bacillus megaterium* tiene un contenido de PHB del 8.1% en peso, siendo el 91.9% de la célula material no PHB. Según lo reportado por Yang y otros[52], la pureza obtenida por métodos de disrupción celular (como lo es el método utilizando SDS), depende del contenido de PHB en la célula, para contenidos de PHB del 82% se obtenían porcentajes de pureza de aproximadamente 90%, sin embargo para células con contenido de PHB del 42% solo se obtenían porcentajes de pureza de aproximadamente 60%. Por lo tanto para obtener una mayor pureza con el método desarrollado por el presente trabajo se necesitarían células con un porcentaje de acumulación mayor, lo cual posiblemente podría ser logrado aumentando el tiempo de acumulación del microorganismo o variando condiciones de temperatura, pH y concentración de nutrientes.

3.3.2. Metodología de cuantificación mediante espectrofotometría UV-Vis

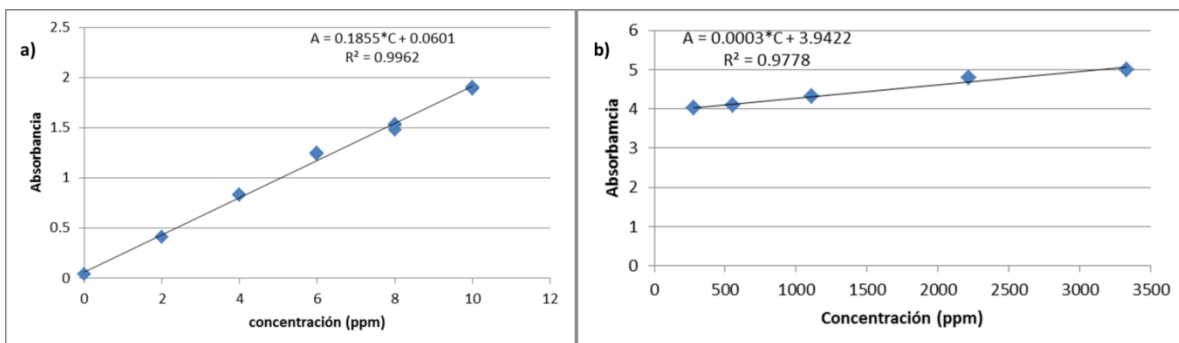
El espectro de soluciones de ácido crotónico obtenido a partir de la hidrólisis ácida del estándar PHB se muestra en la figura 10, en donde el eje x corresponde a la absorbancia y el eje y a la longitud de onda de haz de luz irradiado a la muestra. Es posible observar un máximo a una longitud de onda de 235 nm, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura y sugiere una reacción de hidrólisis exitosa. Por esta razón todas las lecturas de absorbancia en los pasos siguientes fueron realizadas a este valor de longitud de onda.

Figura 10. Espectro de absorbancia de soluciones de ácido crotónico obtenidas



La figura 11 muestra dos curvas de calibración del ácido crotónico obtenido a partir del PHB a diferentes rangos de concentración. En la curva a) un rango de 0-17 ppm y en la b) de 270 a 3300 ppm, es posible observar como la sensibilidad, expresada como la magnitud de la pendiente en las curvas de calibración, es aproximadamente 1000 órdenes de magnitud menor en la curva b). Adicionalmente se calculó el coeficiente de absortividad molar para el ácido crotónico utilizando los valores de la curva a), resultando en un valor de $15,97 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{moles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Figura 11. Curvas de calibración de ácido crotonico. a) Rango de concentraciones 0-17 ppm. b) Rango de concentraciones de 270-3300 ppm.



Lo anterior se debe a una limitación de la ley de Beer (ecuación 4), donde a concentraciones altas, la proximidad entre moléculas altera la distribución de carga de estas. Esta alteración, disminuye la capacidad de absorber radiación electromagnética de las moléculas. Por esta razón se decidió trabajar con el rango de 0-10 ppm para el método de cuantificación del PHB[53].

Ecuación 4. Ley de Beer

$$A = \text{absortividad molar} * \text{camino optico} * \text{concentració}$$

Se construyó la curva de calibración y se determinaron los límites de detección y cuantificación para la concentración de ácido crotonico obtenido por la hidrólisis del PHB. Los límites de detección y cuantificación estuvieron alrededor de 0.02 y 0.1 ppm respectivamente.

Para la cuantificación de la muestra real de PHB producido por el microorganismo se realizaron tres diluciones de 1:5, 1:12.5 y 1:25 correspondientes a valores supuestos de pureza de 10%, 25% y 50%.

Los resultados de la cuantificación del PHB se encuentran en la tabla 7, en esta se muestran los parámetros estadísticos para la evaluación de las cuantificaciones. Se puede observar que los datos resaltados presentan un menor coeficiente de variación y un intervalo de confianza más estrecho, debido a que la concentración obtenida cae en el la mitad del rango de cuantificación.

Tabla 7. Cuantificación de PHB utilizando diferentes diluciones

Experimento	Factor de Dilución	Absorbancia	Concentración (ppm)	Pureza	Promedio	% CV	Intervalo confianza (ppm)
S1	25	0.414	1.9	20	20	2.2	0.61
		0.425	2.0	20			
S1	12.5	0.581	2.8	15	14	3.2	0.63
		0.558	2.7	14			
S1	5	1.25	6.4	13	13	0.1	0.02
		1.252	6.4	13			
S1 R	25	0.443	2.1	26	26	1.6	0.59
		0.452	2.1	26			
S1 R	12.5	0.494	2.3	15	14	2.0	0.40
		0.482	2.3	14			
S1 R	5	1.184	6.1	15	15	0.9	0.20
		1.199	6.1	15			

El método de cuantificación de PHB por medio de calibración con un estándar externo propuesto por este trabajo, utiliza lecturas de absorbancia de soluciones de ácido crotónico obtenido por la hidrólisis ácida de PHB a una longitud de onda de 235 nm, un rango de cuantificación de 0-10 ppm y un diluciones de 1:5 y 1:12.5 de la muestra real hidrolizada previamente.

3.3.3. Caracterización mediante RMN

En las figuras 12 y 13, se muestran el espectro de ^1H -RMN del PHB estándar y el polímero obtenido por *Bacillus megaterium* ATCC 14581; en los cuales se presenta la intensidad normalizada en el eje y, y en el eje x el corrimiento químico.

Se observa una total concordancia entre los dos espectros de las señales en las regiones demarcadas como 1, 2, 2' y 3 correspondientes al PHB. La señal a campo alto marcada como (1) a 1.27 ppm (3H, d, $-\text{CH}_3$) fue asignada a los protones metílicos de la molécula de PHB; las señales marcadas (2) y (2') a 2.47 ppm (1H, dd, $-\text{CH}_2$) y 2.61 ppm (1H, dd, $-\text{CH}_2$) corresponden a los protones metilénicos geminales no equivalentes los cuales presentan una constante de acoplamiento de -15.5 Hz; la señal a campo medio marcada como (3) a 5.26 ppm (1H, ddq, $-\text{CH}$) corresponde al protón metínico del PHB. En los espectros se encuentra una señal en el corrimiento 1.58 ppm, la cual es debida a la presencia de agua (Anexo 3) que pudo haber ingresado durante la dispersión de la muestra utilizando un baño de ultrasonido como se indicó en la sección 2.3.3.

Las señales a corrimientos químicos de 0.08, 0.07, 0.15, 1.25 y 1.55 ppm pueden ser atribuidas a fragmentos de detritos celulares provenientes del método de extracción, como se mencionó anteriormente el PHB crudo obtenido tiene una pureza que varía entre 15 y 25 % lo cual deja un gran porcentaje de impurezas que pudieron haber interferido en el análisis.

Figura 12. Espectro de ^1H -RMN del estándar de PHB (Sigma-Aldrich)

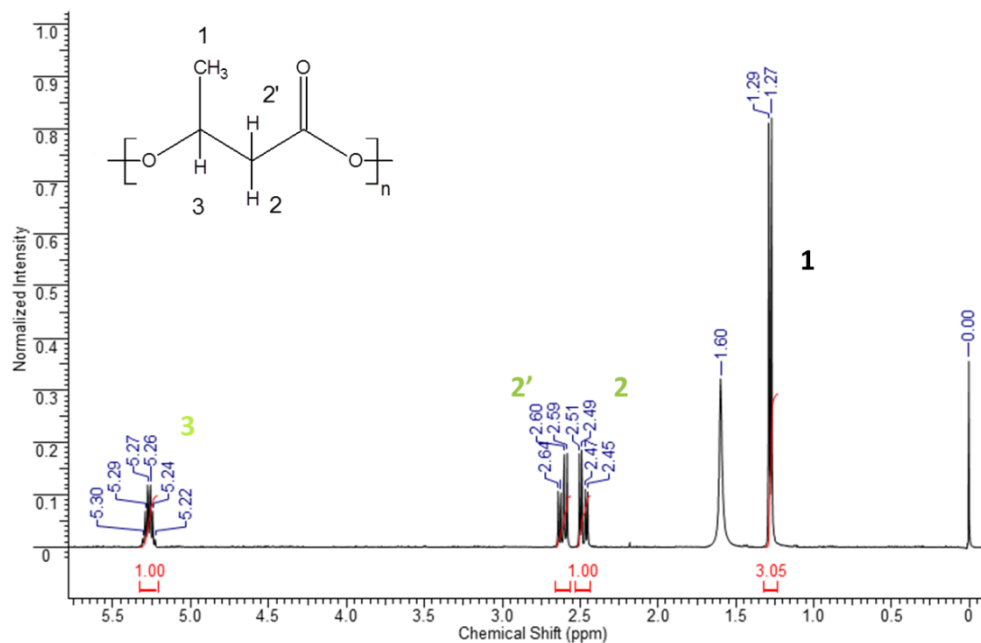
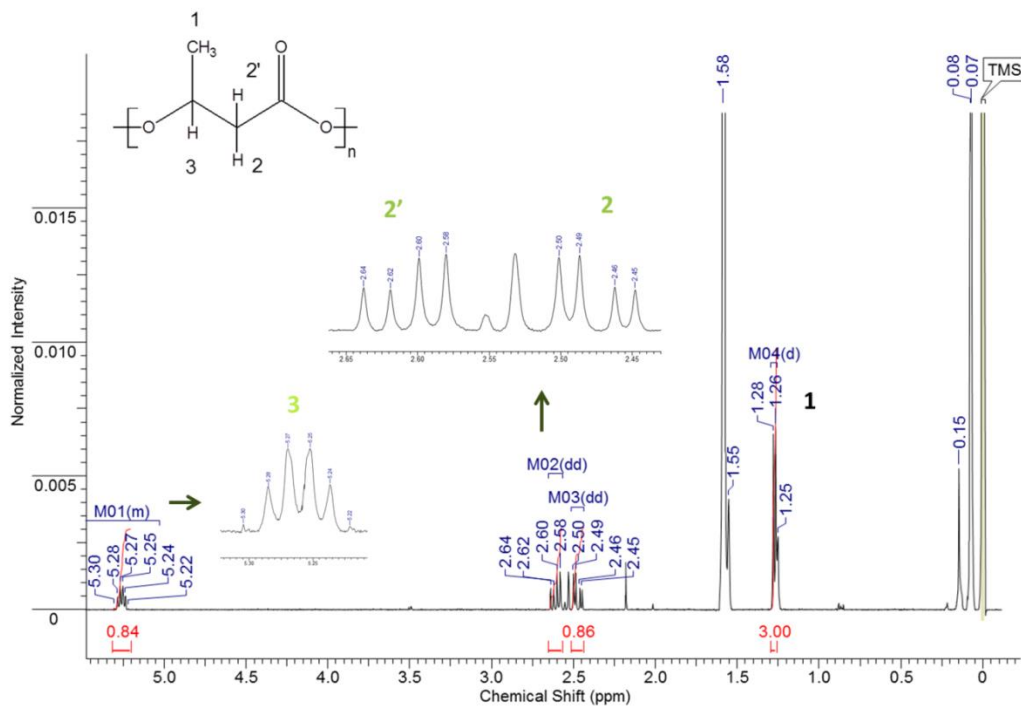


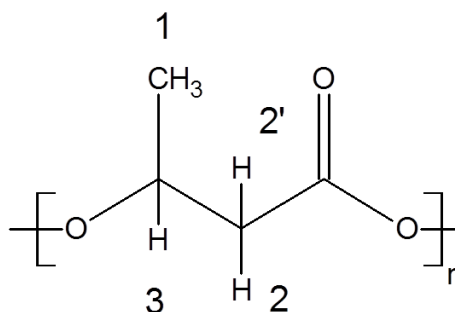
Figura 13. Espectro de ^1H -RMN del PHB producido por *B. megaterium* ATCC 14581



En la tabla 8 se muestra la comparación de los corrimientos y las constantes de acoplamiento del PHB en el estándar y la muestra real. Se puede observar que hay una concordancia significativa en los corrimientos químicos, la pequeña diferencia entre estos se atribuye al entorno químico de las moléculas de PHB en la muestra real debido al contenido de impurezas. Las constantes de acoplamiento presentadas en la tabla 8 fueron las reportadas por Doi y otros[13].

Tabla 8. Resultados de la caracterización del PHB producido mediante RMN

Protón	Corrimiento (ppm) estándar	Corrimiento (ppm) muestra	Constantes de acoplamiento (ppm)
1	1.28	1.27	6.3
2	2.48	2.47	5.7, -15.5
2'	2.61	2.61	7.3,-15.5
3	5.27	5.26	7.3,5.7,6.3



3.3.4. Caracterización mediante espectroscopia en la región de infrarrojo

En las figuras 14 y 15 se presentan los espectros de PHB estándar y el obtenido por *Bacillus megaterium* ATCC 14581, en los cuales el eje y representa el porcentaje de transmitancia y el eje x el número de onda de haz de luz irradiado a la muestra durante el análisis. Existen dos señales características para el PHB reportadas por diferentes autores[10, 11, 54], la primera se encuentra entre 1735 y 1720 cm^{-1} corresponde a la vibración de alargamiento del enlace C=O del grupo carbonilo y la segunda entre 1320 y 1210 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace C-O del grupo carboxilo[55]. Se puede observar en los dos casos las señales principales características de un poliéster como el PHB.

Figura 14. Espectro IR del estándar de PHB (Sigma-Aldrich)

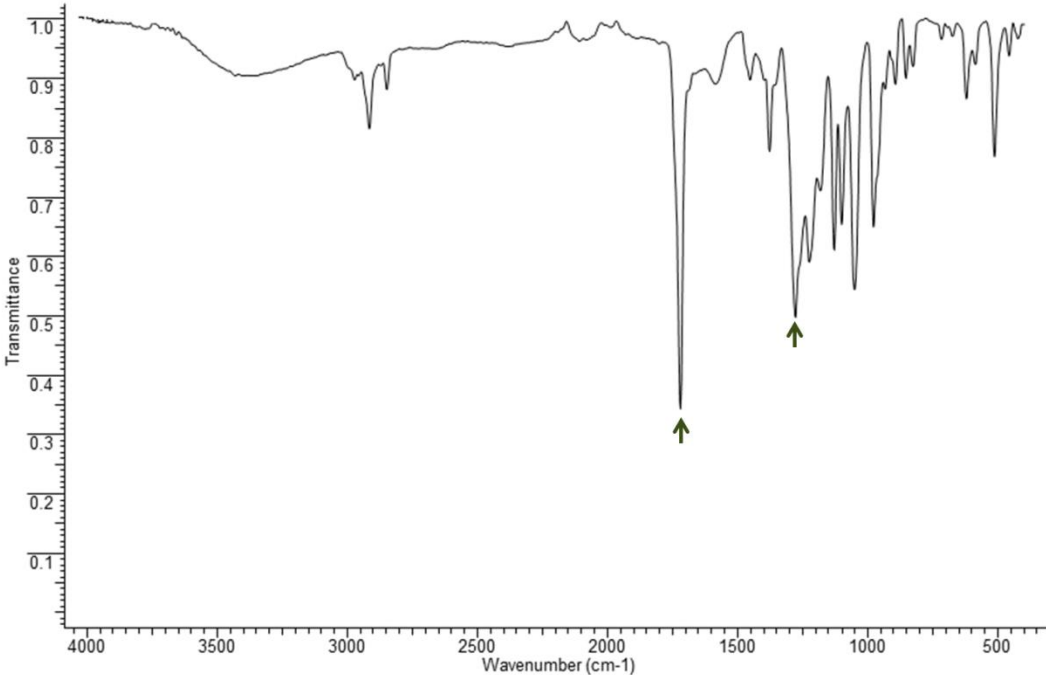
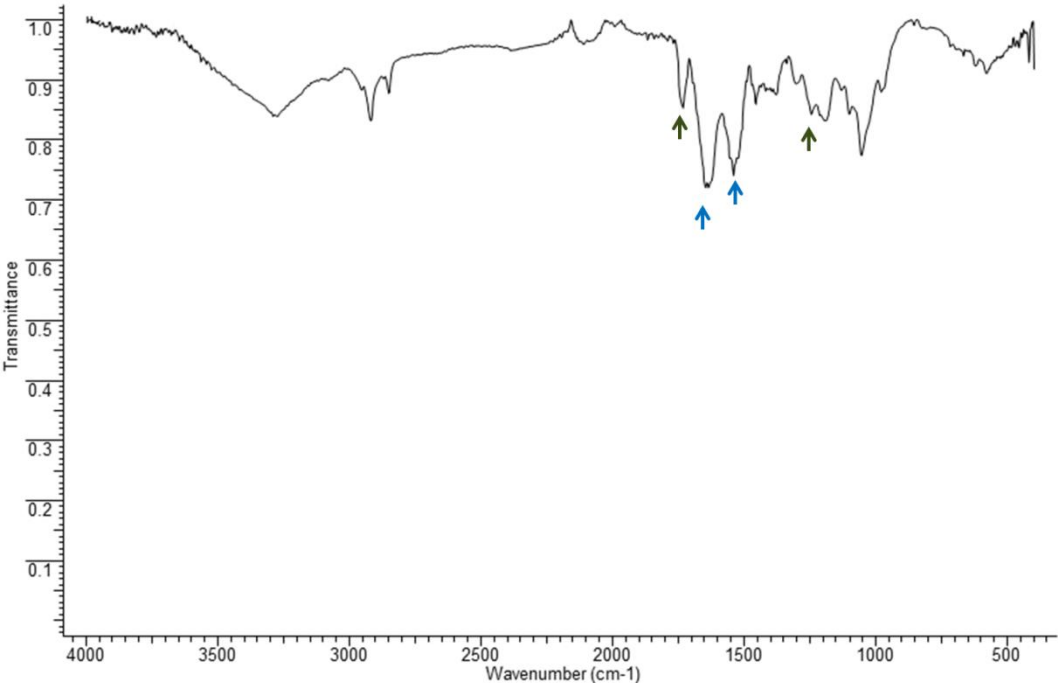


Figura 15. Espectro IR del PHB producido por *B. megaterium* ATCC 14581

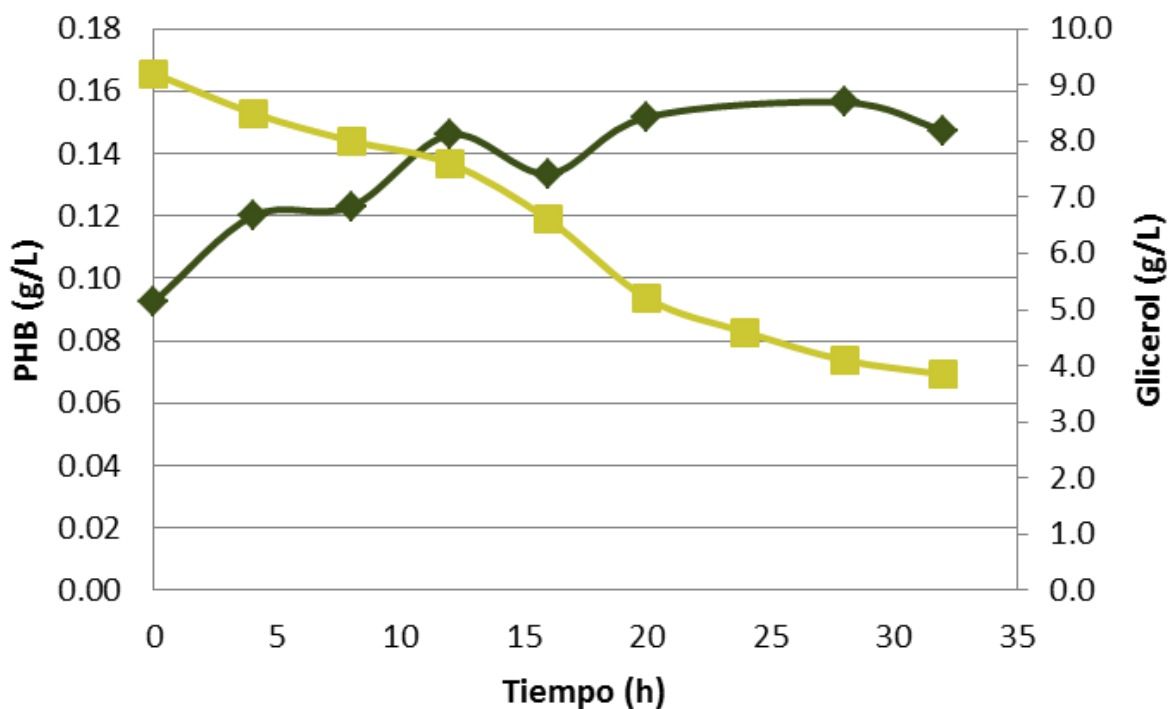


Las señales alrededor de 1540 y 1640 cm^{-1} resaltadas con flechas azules son características de la presencia de proteínas y son llamadas amida I y amida II, las cuales corresponden a la vibración del enlace C=O de la unión entre péptidos y la segunda es la suma de las vibraciones de flexión en el plano del enlace N-H y el alargamiento del enlace C-N[56]. Lo anterior permite afirmar que el contenido de impurezas en el PHB obtenido, es debido a proteínas remanentes de la digestión de la biomasa realizada durante el proceso de extracción.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE PRODUCCIÓN

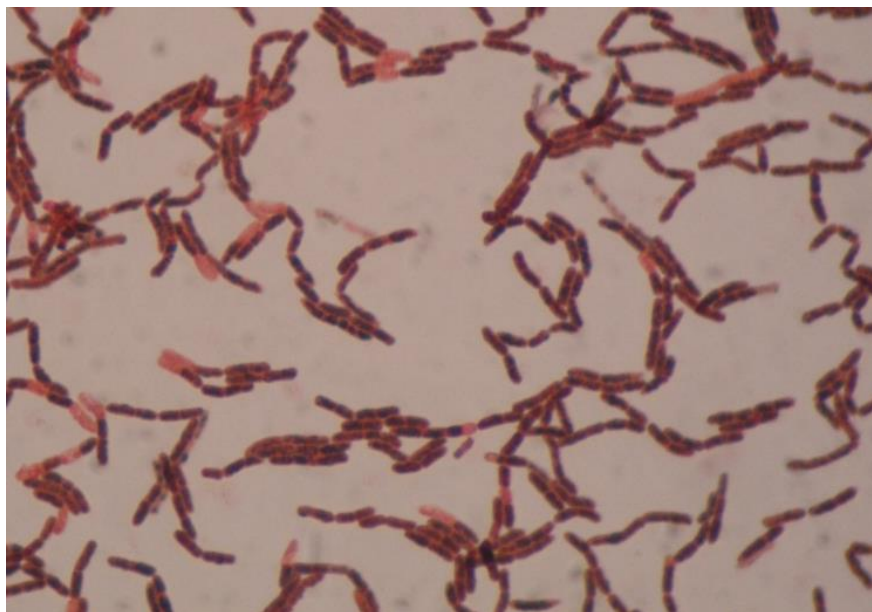
En la figura 16 se muestra la curva de producción de PHB por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 con respecto a la concentración de glicerol. En el eje x se presentan las horas de fermentación después de que la bacteria alcanza el FEX y los ejes y representan la concentración de PHB en la izquierda y glicerol en la derecha.

Figura 16. Curva de producción de PHB y concentración de glicerol de *B. megaterium* ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono



Se puede observar un aumento en la concentración de PHB hasta las 12 horas de acumulación (ver figura 17), seguida de una disminución a la hora 16, la cual posiblemente se debe a la esporulación observada a partir de esta hora[7].

Figura 17. Foto de *Bacillus megaterium* ATCC14581 a las 12 horas de fermentación después del FEX



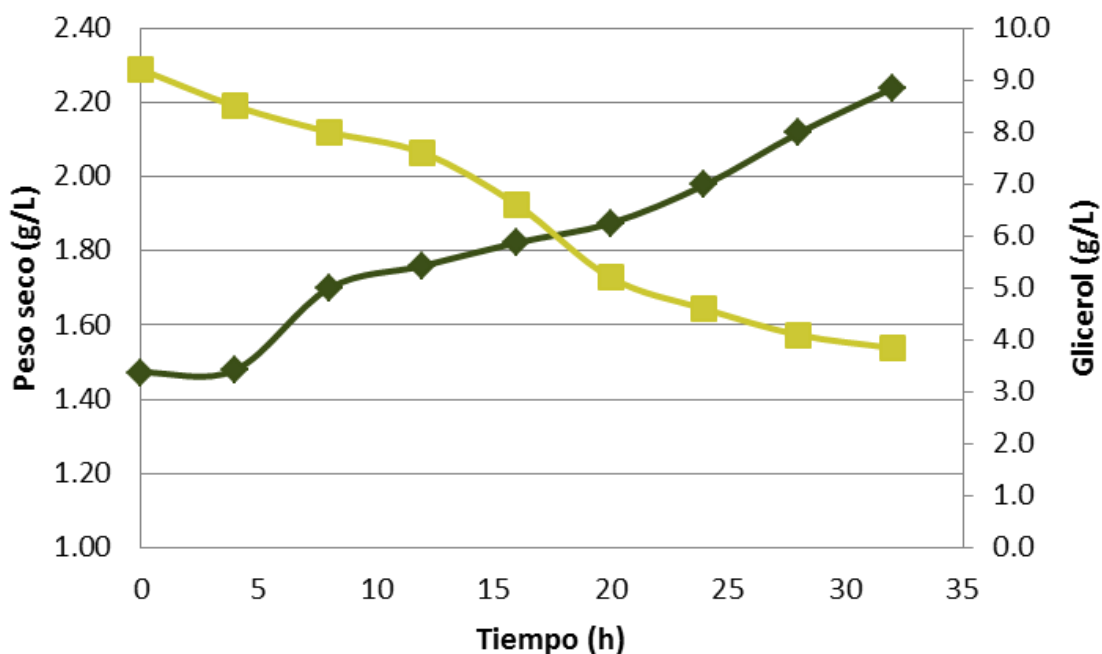
Fuente: Autor

En la figura 17 se muestra una fotografía tomada a través de un microscopio de la bacteria teñida usando el método de coloración sudan negro. En esta las inclusiones de PHB son teñidas de azul por el sudan negro y el resto del citoplasma se tiñe de rosado por la safranina (colorante de contraste).

En el caso de la concentración de glicerol, se observa una disminución durante el tiempo evaluado. El glicerol como fuente de carbono es utilizado por el microorganismo para construir masa celular, sintetizar PHB y como fuente de energía[57], por lo cual a pesar de que la concentración de PHB no aumenta significativamente después de las 16 horas, la concentración de glicerol sigue disminuyendo.

En la Figura 18 se observa la biomasa con respecto a la concentración de glicerol. El eje x representa las horas de fermentación después de que la bacteria alcanza el FEX y los ejes y representan la biomasa en la izquierda y la concentración de glicerol en la derecha. Se puede observar que a pesar de que la acumulación de PHB llega a un punto máximo a las 12 horas, la biomasa sigue aumentando durante todo el tiempo evaluado, esto afirma la utilización del GRIB no solo como sustrato para la producción de PHB sino para el crecimiento y mantenimiento celular, evidenciándolo como una buena fuente de carbono para *Bacillus megaterium* ATCC 14581.

Figura 18. Biomasa y concentración de glicerol de *B. megaterium* ATCC 14581 utilizando GRIB como única fuente de carbono



El rendimiento con respecto a la biomasa y productividad del proceso fue calculado a las 12 horas de fermentación después del FEX; el rendimiento fue de 8.3 % y la productividad de 0.0077 g/L*h. Estos valores son bajos comparados con los reportados utilizando fuentes de carbono puras como sacarosa, glucosa o glicerol, los cuales reportan valores aproximados de 20 al 50%, para el rendimiento y entre 0.02 y 0.150 para la productividad [6, 8, 33]. Los bajos valores de

rendimiento y productividad obtenidos se pueden deber a que el GRIB, no es una fuente de carbono apropiada para la producción de PHB en esta bacteria. Además es posible que las actuales condiciones fisicoquímicas de crecimiento y acumulación, y las concentraciones de nutrientes en los caldos utilizados no sean las adecuadas para la producción de este metabolito intracelular en este microorganismo.

4. CONCLUSIONES

Se implementó un método de extracción de PHB usando SDS como agente para la digestión y solubilización de la biomasa; el cual logró a condiciones de temperatura, tiempo y relación de SDS: biomasa húmeda de 30°C, 180 minutos y 0.5 respectivamente, obtener una pureza máxima de 25% para el PHB producido por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de GRIB como única fuente de carbono.

Se desarrolló un método de cuantificación de PHB usando espectrofotometría UV-VIS, mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 235 nm.

Se confirmó la producción de PHB mediante las espectroscopias en la región del infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protones, dando a conocer que las impurezas presentes en el PHB extraído se deben a la presencia de proteínas.

Se obtuvo el mayor rendimiento y productividad (8.3 % y 0.0077 g/L*h respectivamente) a las 12 horas de fermentación después del fin de la etapa exponencial.

5. RECOMENDACIONES

- Profundizar en el estudio de la extracción de PHB mediante SDS, usando métodos sonoquímicos para mejorar la digestión del material no PHB y así obtener mayores purezas.
- Realizar la determinación del peso molecular del PHB producido por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a partir de GRIB como única fuente de carbono y determinar la influencia del método de extracción con SDS en él

BIBLIOGRAFIA

1. Choi, J. and S.Y. Lee, *Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **51**: p. 13-21.
2. Misra, S.K., et al., *Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications*. Biomacromolecules, 2006. **7**(8): p. 2249-2258.
3. Chen, G.-Q., *A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**: p. 2434-2446.
4. Kenar, H., G.T. K rse, and V. Hasirci, *Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films*. Biomaterials, 2006. **27**(6): p. 885-895.
5. Solaiman, D.K.Y. and R.D. Ashby, *Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate)Synthase and Its Applications*. Biomacromolecules, 2005. **6**: p. 532-537.
6. Chen, G.-Q., K.-H. Konig, and R.M. Lafferty, *Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus Bacillus*. FEMS Microbiology Letters, 1991. **84**: p. 173-176.
7. Valappil, S.P., et al., *Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera Bacillus and Streptomyces*. Antonie van Leeuwenhoek, 2007. **91**: p. 1–17.
8. Faccin, D.J.L., et al., *Optimization of C :N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by Bacillus megaterium*. J Chem Technol Biotechnol, 2009. **84**: p. 1756–1761.
9. Jacquel, N., et al., *Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)*. Biochemical Engineering Journal, 2008. **39**: p. 15-27.
10. Vishnuvardhan, R.S., M. Thirumala, and S.K. Mahmood, *Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by Bacillus megaterium strain OU303A*

- isolated from municipal sewage sludge*. World J Microbiol Biotechnol, 2009. **25**: p. 391-397.
11. Kirithika, M., K. Rajarathinam, and S. Venkatesan, *Eco Friendly Biodegradable Polymer, Poly- β -Hydroxy Butyric Acid Production, Degradation and its Optimization Studies using Alcaligenes Sp. and Pseudomonas Sp.* Developmental Microbiology and Molecular Biology, 2011. **2**(1): p. 1-13.
 12. Shrivastav, A., et al., *Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing Jatropha biodiesel byproduct*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **47**: p. 283–287.
 13. Doi, Y., et al., *^1H and ^{13}C NMR Analysis of Poly(β -hydroxybutyrate) Isolated from Bacillus megaterium*. Macromolecules, 1986. **19**: p. 1274-1276.
 14. Tarazona, N. and N. Ramirez, *Utilización de cepas nativas para procesos de fermentación de glicerol crudo proveniente del biodiesel, orientados a la obtención de subproductos de mayor valor agregado*, 2010: Bucaramanga.
 15. Koller, M., et al., *Microbial PHA Production from Waste Raw Materials*, in *Plastics from Bacteria*, G.G.-Q. Chen, Editor 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 85-119.
 16. Programme, U.N.E. *Project converting plastics into fuel*. [cited 2012 26/06/2012]; Available from: <http://www.unep.org/ietc/ourwork/wastemanagement/projects/wasteplastics/project/tabid/79203/default.aspx>.
 17. Reddy, C.S.K., et al., *Polyhydroxyalkanoates: an overview*. Bioresource Technology, 2003. **87**: p. 137-146.
 18. Solaiman, D.K.Y., et al., *Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates)*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **71**: p. 783–789.
 19. Ibrahim, M.H.A. and A. Steinbuchel, *Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by Zobellella denitrificans MW1 via High-Cell-Density Fed-*

- Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2009: p. 6222–6231.
20. Lemoigne, M., *Produit de deshydratation et de polymerisation de l'acide betaoxybutyrique*. Bull Soc Chim Biol, 1926. **8**: p. 770.
 21. Engelberg, I. and J. Kohn, *Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study*. Biomaterials, 1991. **12**(3): p. 292-304.
 22. Doi, Y., *Plastics from microbes. Microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Edited by D. P. Mobley, Hanser, Munich 1994, hardcover, 288 pp. DM 128.00, ISBN 3-446-17367-6. Advanced Materials, 1995. **7**(12): p. 1046-1046.
 23. Cavalheiro, J.M.B.T., et al., *Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol*. Process Biochemistry, 2009. **44**: p. 509–515.
 24. Chee, J.-Y., et al., *Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics*, in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Mendez-Vilas, Editor 2010. p. 1395-1404.
 25. Pachauri, N. and B. He. *Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities*. in *2006 ASABE Annual International Meeting*. 2006. Portland.
 26. Bonartsev, A.P., et al., *Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems*. Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry, 2011. **5**(1): p. 10-21.
 27. Hájek , M. and F. Skopal, *Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production*. Bioresource Technology, 2010. **101**: p. 3242–3245.
 28. Ibrahim, M.H.A. and A. Steinbuchel, *Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from Glycerol by Zobelletta denitrificans MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction*. Applied And Environmental Microbiology, 2009: p. 6222–6231.

29. Van Gerpen, J., et al., *Biodiesel Analytical Methods*, 2004, National Renewable Energy Laboratory.
30. Lee, S.Y., *Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria*. Trends in Biotechnology, 1996. **14**(11): p. 431-438.
31. McKinney, R.E., *Bacteria Growth*, in *Environmental Pollution Control Microbiology* 2004, CRC Press.
32. Barton, L.L., *Cellular Growth and Reproduction Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*, 2005, Springer New York. p. 292-347.
33. Gouda, M.K., A.E. Swellam, and S.H. Omar, *Production of PHB by a Bacillus megaterium strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources*. Microbiological Research 2001. **156**: p. 201–207.
34. Zeigler, D.R. and J.B. Perkins, *The Genus Bacillus*, in *Practical handbook of Microbiology* 2009, Taylor & Francis Group, LLC.
35. Lo, C.-W., H.-S. Wua, and Y.-H. Wei, *High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant Escherichia coli XL1 blue*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2011. **42**: p. 240-246.
36. Strazzullo, G., et al., *Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of Halomonas campaniensis*. World J Microbiol Biotechnol, 2008. **24**: p. 1513–1519.
37. Ramsay, J.A., et al., *Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment*. Biotechnology Techniques, 1990. **4**(4): p. 221-226.
38. Mia, K., et al., *Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of Ralstonia eutropha by direct addition of sodium dodecyl sulfate*. Biotechnology Letters, 2003. **25**: p. 55-59.

39. Mothes, G., C. Schnorpfeil, and J.U. Ackermann, *Production of PHB from Crude Glycerol*. Eng. Life Sci, 2007. **7**: p. 475–479.
40. Ibrahim , M.H.A. and A. Steinbu chel, *Zobellella denitrificans strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol*. Journal of Applied Microbiology, 2009: p. 214-225.
41. Yilmaz, M., H. Soran, and Y. Beyatli, *Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some Bacillus spp.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005. **21**: p. 565–566.
42. Sadi, R.K., G.J.M. Fachine, and N.R. Demarquette, *Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)*. Polymer Degradation and Stability, 2010. **95**: p. 2318-2327
43. Suzuki, Y., et al., *Characterization of short-chain poly3-hydroxybutyrate in baker's yeast*. Phytochemistry, 2008. **69**: p. 491–497.
44. Cancino, J.F. and J.R. Gomez, *Caracterización de los productos obtenidos a partir de la fermentación de glicerol crudo con microorganismos nativos*, 2011, Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga.
45. Yong, K.C., et al., *Characterization Of Glycerol Residue From A Palm Kernel Oil Methyl Ester Plant*. Journal of Oil Palm Research 2001. **13**: p. 1-6.
46. Thompson, J.C. and B.B. He, *Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks*. Applied Engineering in Agriculture, 2006. **22**: p. 261-265.
47. Manosak , R., S. Limpattayanate, and M. Hunsom, *Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and adsorption*. Fuel Processing Technology, 2011. **92**: p. 92–99.
48. Arrubla, J.P., *Transesterificación del Aceite de Palma y Análisis de Triglicéridos por Cromatografía de Gases Capilar de Alta Temperatura.*, 2002, Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga.

49. UĞUR, A., N. ŞAHİN, and Y. BEYATLI, *Accumulation of Poly-b-Hydroxybutyrate in Streptomyces Species During Growth with Different Nitrogen Sources*. Turkish Journal of Biology, 2002. **26**: p. 171-174.
50. SHAPIRO, S.S. and M.B. WILK, *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. Biometrika, 1965. **52**(3-4): p. 591-611.
51. Thakor, N., T. Lutke-Eversloh, and A. Steinbuchel, *Application of the BPEC Pathway for Large-Scale Biotechnological Production of Poly(3-Mercaptopropionate) by Recombinant Escherichia coli, Including a Novel In Situ Isolation Method*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(2): p. 835–841.
52. Yang, Y.-H., et al., *Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs)*. Biotechnol Lett, 2011. **33**(5): p. 937-942.
53. Skoog, D., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de Analisis Instrumental* 2001: Mc-Graw Hill.
54. Shamala, T.R., et al., *Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing Bacillus spp. using the polymerase chain reaction (PCR)*. Journal of Applied Microbiology, 2003. **94**: p. 369-374.
55. Silverstein, R.M., F.X. Webster, and D.J. Kiemle, *Infrared Spectrometry, in Spectrometric Identification of Organic Compounds* 2005, Jhon Wiley & Sons, INC.: New Yor.
56. Kong, J. and S. Yu, *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007. **39**(8): p. 549-559.
57. Greasham, R.L., *Media for Microbial Fermentations*, in *Biotechnology* 1993. p. 128-137.

ANEXO 1: LISTA DE MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS


Tabla 1. Lista de reactivos

Reactivo	Pureza	Fuente
Poli[(R)-3-hidroxi-butirato]	99%	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sodio	95%	J. T. Baker
Acido Sulfurico concentrado	95-97%	Merck
Metanol	99%	Merck
Glicerol	USP	Laboratorios Leon S.A

Tabla 2. Lista de equipos

Equipo	Marca
Baño de ultrasonido (40 kHz)	Branson B3510-MTH
pHmetro	Schott Instruments Lab 850
Espectrofotómetro UV-VIS	Shimadzu modelo 2401 PC
Espectrofotómetro IR con aditamento de reflectancia total atenuada	Bruker modelo Tenso 27
Espectrofotómetro de RMN	Bruker avance

ANEXO 2: RESULTADOS CICTA

	CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 01
			Página 1 de 3

INFORME DE ENSAYO

Número: 905-12

FECHA: Noviembre 27 de 2012
NOMBRE/EMPRESA: Yajaira Combariza
DIRECCIÓN: CEIAM- UIS
TELÉFONO: 6344000 Ext. 3135

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M929-12
PRODUCTO: Glicerol Crudo

FECHA DE RECEPCIÓN: Noviembre 13 de 2012
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Noviembre 26 de 2012

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. La humedad se determinó siguiendo la metodología descrita en la Norma Técnica Colombiana 287.
2. La determinación de nitrógeno total fue analizada por el método de Kjeldahl que consiste en siguiendo la norma internacional AOAC 928.08 18th Edición.

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS M929-12

PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	g/100 g mtra	49,26	NTC287:2002
Nitrógeno	g/100 g mtra	n.d	AOAC 928.08 18th Edición - Kjeldahl

n.d No detectado

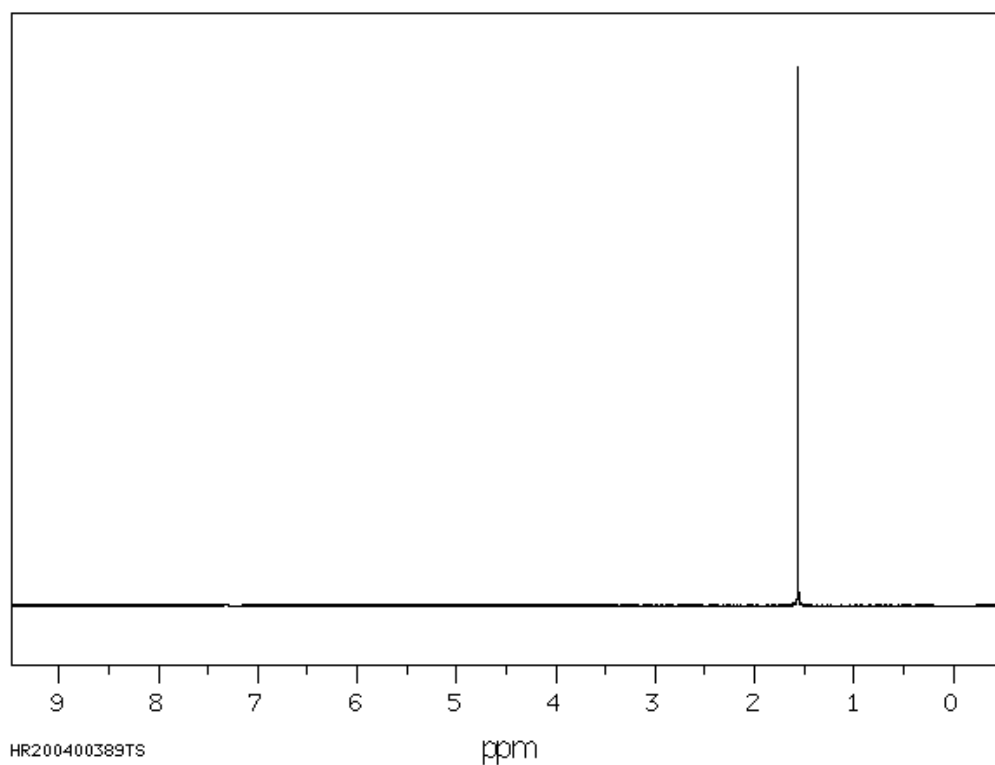
REVISÓ Y AUTORIZÓ

Janeth Aidé Perea Villamil
Química, MSc, Doctora en Química
 Director(a) Técnico y administrativo

NOTA: ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

ANEXO 3

Figura 1. Espectro de ^1H -RMN del agua en CDCl_3 a 400 MHz



Fuente: <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 22/01/2012)