

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)
PARTIENDO DEL RESIDUO DE ALMIDÓN DE PAPA POR MEDIO DE *Bacillus
subtilis* A NIVEL LABORATORIO**

**CAMILO ANDRÉS SANABRIA RODRÍGUEZ
DANIEL ESTEBAN SARMIENTO LEMUS**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)
PARTIENDO DEL RESIDUO DE ALMIDÓN DE PAPA POR MEDIO DE *Bacillus subtilis* A NIVEL LABORATORIO**

**CAMILO ANDRÉS SANABRIA RODRÍGUEZ
DANIEL ESTEBAN SARMIENTO LEMUS**

**Proyecto Integral de Grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

Nota de aceptación

Presidente de Jurado
Elizabeth Torres Gamez

Jurado 1
Luis Humberto Reyes Barrios

Jurado 2
Luz Briceida Pardo Rojas

Bogotá D.C. Marzo de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano General Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa Ingeniería química

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

Sobre el desarrollo de este trabajo, quiero agradecer principalmente a Dios el cual pudo brindarme salud, sabiduría y bienestar para poder cumplir con este gran objetivo, a mi familia por el apoyo incondicional durante este largo camino, por las enseñanzas y los esfuerzos realizados, además de los momentos llenos de dificultad en donde me ayudaron a superarme para poder salir adelante, a cada uno de los docentes de la universidad que me acompañaron durante este largo camino de formación para convertirme en un buen profesional y a las demás personas, compañeros y colegas que de una u otra forma hicieron parte del desarrollo de este trabajo.

Gracias.

Daniel Esteban Sarmiento Lemus

A Dios por darme vida, salud y sabiduría para la realización de todos los objetivos propuestos en esta etapa de mi vida, a mi familia por su apoyo constante en la consecución de cada uno de las metas propuestas, por sus consejos y motivaciones, por los esfuerzos conjuntos para que lograrse este gran objetivo y el ejemplo brindado para siempre luchar por lo que se quiere, a la Universidad de América, docentes y personal que de alguna u otra manera hicieron parte de la consecución de este trabajo de grado.

Gracias.

Camilo Andrés Sanabria Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a:

- La empresa Comercializadora Nacional de papas R&G S.A.S y su personal por todo su apoyo en el desarrollo del documento.
- A David Leonardo Sotelo Tobón por su colaboración y aporte a lo largo de la realización del proyecto.
- A Ahudrey Leal Quintero por sus enseñanzas y acompañamiento para la consecución y culminación del proyecto.
- A todo el personal de Nodo Tecnoparque del Sena por su colaboración, el préstamo de las aulas y disposición de ayuda con el proyecto de grado.
- A la Ingeniera Elizabeth Torres por todas sus apreciaciones, consejos y correcciones durante el desarrollo y consecución del proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVOS	24
1. GENERALIDADES	25
1.1 ALMIDÓN	25
1.1.1 Composición y estructura	25
1.1.2 Aplicaciones	26
1.2 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	27
1.2.1 Definición y estructura	27
1.2.2 Propiedades	28
1.2.3 Biosíntesis	28
1.2.4 Bacterias productoras de PHAs	31
1.2.5 Obtención de PHAs	31
1.2.6 Métodos de extracción de PHAs	33
1.2.7 Métodos de detección y cuantificación	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1 MATERIALES	37
2.1.1 Almidón	37
2.1.2 Cepa microbiana (<i>Bacillus subtilis</i>)	37
2.2 EQUIPOS	38
2.3 REACTIVOS	44
2.4 MÉTODOS	46
2.4.1 Acondicionamiento del almidón de papa	47
2.4.2 Activación, cultivo e inóculo de la cepa microbiana	47
2.4.3 Selección de las condiciones del proceso fermentativo	48
2.4.4 Fermentación	49
2.4.5 Extracción	50
2.4.6 Determinación de metil ésteres en el PHA obtenido	51
2.5 CARACTERIZACIÓN	51
2.5.1 pH	51
2.5.2 Azúcares reductores y no reductores	51
2.5.3 Método kjeldahl para la determinación del Porcentaje de nitrógeno	52
2.5.4 Temperatura de gelatinización	52
2.5.5 Porcentaje de humedad	52
2.5.6 Porcentaje de cenizas	53

2.5.7	Método de diluciones y conteo en placa	53
2.5.8	Método para la determinación de metil ésteres por Cromatografía de gases	54
2.6	DEFINICIÓN DE PARÁMETROS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	54
3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	58
3.1	ACONDICIONAMIENTO DEL ALMIDÓN DE PAPA	58
3.2	ACTIVACIÓN, CULTIVO E INÓCULO MICROBIANO	58
3.3	SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO	59
3.4	FERMENTACIÓN	61
3.5	EXTRACCIÓN	65
3.6	CARACTERIZACIÓN DEL PHA OBTENIDO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	72
4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	74
4.1	SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO	74
4.2	FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO.	75
4.3	EXTRACCIÓN	80
4.4	CARACTERIZACIÓN DEL PHA OBTENIDO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	84
4.5	DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL PHA OBTENIDO	87
5.	CONCLUSIONES	89
6.	RECOMENDACIONES	90
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Absorbancia a 575nm y concentración de azúcares reductores (g/L), muestras de la selección de condiciones del proceso fermentativo.	60
Tabla 2. Absorbancia a 575nm y concentración de azúcares reductores (g/L), muestras de cada concentración de almidón sin hidrolizar con nutrientes en la fermentación.	64
Tabla 3. Absorbancia a 575nm y concentración de azúcares reductores (g/L), muestras de cada concentración de almidón sin hidrolizar sin nutrientes en la fermentación.	64
Tabla 4. Rendimientos de la fermentación, en función de los azúcares consumidos.	65
Tabla 5. Resultados de la extracción con los dos experimentos propuestos en muestras sin hidrolizar sin nutrientes.	66
Tabla 6. Cantidad de biomasa utilizada en el proceso extractivo.	66
Tabla 7. Cantidad de pellet extraído en cada muestra de fermento.	70
Tabla 8. Cantidad de pellet extraído en cada muestra de fermento.	71

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Propiedades típicas del PHB.	28
Cuadro 2. Bacterias que acumulan PHA.	31
Cuadro 3. Valores de pH para determinar diferentes cepas empleadas en la producción de PHA.	33
Cuadro 4. Métodos de extracción.	34
Cuadro 5. Descripción de equipos utilizados.	38
Cuadro 6. Reactivos utilizados y usos.	44
Cuadro 7. Selección de condiciones de proceso fermentativo.	56
Cuadro 8. Variables a trabajar en la fermentación.	57
Cuadro 9. Conteo en placa del crecimiento microbiano durante el proceso fermentativo en los tiempos de 24h y 72h.	62
Cuadro 10. Muestras de PHA extraído a las 72 horas del proceso fermentativo.	68
Cuadro 11. Condiciones de proceso determinación de metil ésteres por cromatografía de gases ¹⁸ .	73
Cuadro 12. Determinación de metil ésteres por Cromatografía de gases en muestras tomadas de los fermentos de almidón sin hidrolizar con la adición de nutrientes.	85
Cuadro 13. Determinación de metil ésteres por Cromatografía de gases en muestras tomadas de los fermentos de almidón sin hidrolizar y sin la adición de nutrientes.	86

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura del almidón, amilosa y amilopectina.	26
Figura 2. Estructura de los PHA.	27
Figura 3. Acumulación de gránulos PHA en <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	29
Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos.	30
Figura 5. Método de diluciones para el conteo en placa.	53

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. <i>Bacillus subtilis</i> .	37
Imagen 2. <i>Bacillus subtilis</i> , cepa activada (A) y su morfología posterior de la realización de tinción de Gram (B).	59
Imagen 3. Fermentación microbiana en agitador orbital.	61
Imagen 4. Muestra posterior a la adición de hidróxido de sodio.	68
Imagen 5. PHA seco de muestra 15g/L SHSN 72h.	70
Imagen 6. Resuspensión del PHA extraído.	72

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Gráfica 1. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en las cuatro muestras.	74
Gráfica 2. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en los fermentos de almidón 5g/L SHN y SHSN.	76
Gráfica 3. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en los fermentos de almidón 10g/L SHN y SHSN.	77
Gráfica 4. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en los fermentos de almidón 15g/L SHN y SHSN.	78
Gráfica 5. Porcentaje consumo de azúcares reductores en los fermentos 5, 10, 15 g/L de los dos tipos de tratamiento del sustrato.	79
Gráfica 6. Peso del PHA extraído (g) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHN.	80
Gráfica 7. Peso del PHA extraído (g) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHSN.	81
Gráfica 8. Porcentaje del pellet extraído (%) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHN.	82
Gráfica 9. Porcentaje del pellet extraído (%) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHSN.	83

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Rendimiento de la fermentación.	65
Ecuación 2. Porcentaje de pellet extraído.	71
Ecuación 3. Porcentaje Consumo de azúcares reductores.	78

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Caracterización del almidón de papa.	94
Anexo B. Datos de conteo en placa de las UFC en la fase de fermentación.	101
Anexo C. Curva de calibración de DNS.	102
Anexo D. Caracterización del PHA obtenido por cromatografía de gases.	103

LISTA DE ABREVIATURAS

PHA: Polihidroxicanoato

g: Gramos.

HN: hidrolizado con nutrientes

HSN: hidrolizado y sin nutrientes

nm: Nanómetros.

PHB: Polihidroxibutirato.

SHN: Sin hidrolizar y con nutrientes.

SHSN: Sin hidrolizar y sin nutrientes.

UFC: unidad formadora de colonias

GLOSARIO

ALMIDÓN: es una macromolécula presente en todas las plantas, la cual le ayuda a la reserva de carbohidratos y está compuesta por dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina.

BIOPOLÍMERO: son sustancias poliméricas sintetizadas naturalmente las cuales logran sustituir a los plásticos tradicionales gracias a que su tiempo de vida es mucho más corto y se degradan naturalmente.

ESPECTOMETRÍA DE MASAS: esta es una técnica de análisis la cual permite determinar la distribución que tienen las moléculas de una sustancia basada en la función de su masa.

EXTRACCIÓN: es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes, los cuales están en contacto a través de una interface y presentan un grado de solubilidad diferente.

FERMENTACIÓN: es un proceso que logra degradar las moléculas más complejas en moléculas más simples, siendo un proceso catabólico de oxidación que tiene lugar de forma incompleta.

HIDROLISIS: reacción química en la que descomponen compuestos orgánicos complejos en otros más sencillos, mediante la interacción de estos con el agua.

INOCULO: sustancia que se introduce en el organismo, la cual puede producir o aumentar su inmunidad frente a un proceso o un agente externo.

MICROORGANISMO: es un ser vivo o sistema biológico unicelular que solo puede ser detallado por un microscopio.

NUTRIENTES: es toda sustancia que no puede ser creada por el organismo y está contenida en distintos alimentos con el propósito de aportar energía, aminoácidos o elementos reguladores del metabolismo.

POLIHIDROXIALCANOATO (PHA): son poliésteres producidos de forma natural por la acción de bacterias basados en la fermentación del azúcar.

POLÍMERO: son macromoléculas formadas por largas cadenas de monómeros que presentan elevadas masas moleculares.

SÍNTESIS: es el proceso en el que se producen compuestos químicos a partir de elementos más simples.

SOLVENTE: es la sustancia que posee un mayor campo dentro de la misma solución donde ha sido utilizada.

RESUMEN

El presente trabajo evalúa la obtención de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir del residuo de almidón de papa; residuo producido en los procesos de producción de papa en fósforo, llevados a cabo en la empresa Comercializadora Nacional de Papas R&G. Inicialmente se realiza el acondicionamiento del almidón para el proceso de fermentación y el acondicionamiento del microorganismo *Bacillus subtilis* usado como acumulador del biopolímero.

Posteriormente se realizó una selección de las condiciones de proceso fermentativo, donde se evaluó si el microorganismo tenía la capacidad de hidrolizar el almidón o por si lo contrario necesita como sustrato almidón hidrolizado y si se hace necesario de la adición de nutrientes o no para la hidrólisis y consumo del almidón, de acuerdo a esto se encontró que el microorganismo por si solo hidroliza el almidón, además que no necesita para este proceso de la adición de nutrientes, por consiguiente se inició el proceso fermentativo con muestras de almidón sin hidrolizar y concentraciones de sustrato de 5g/L, 10g/L y 15g/L, concentraciones seleccionadas según una referencia bibliográfica, para el proceso de obtención de polihidroxicanoatos se hace necesario la adición de nutrientes, los cuales restringen la presencia de nitrógeno en el medio, induciendo al microorganismo a la producción de PHA, biopolímero acumulado de manera intracelular; de acuerdo a esto se inició el proceso de fermentación de almidón sin hidrolizar con nutrientes y sin nutrientes.

Para evaluar el proceso fermentativo se realizaron determinaciones de azúcares reductores a muestreos realizados cada 24 horas de cada uno de los fermentos planteados anteriormente, en los cuales se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a consumo de azúcares reductores en los fermentos de concentración de 5g/L sustrato sin hidrolizar con y sin nutrientes con porcentajes de consumo de 56,5% y 59,8%.

Finalizado el proceso de fermentación se realiza la fase de extracción de PHA con NaCl, NaOH y etanol, en dicha extracción, se obtuvo una concentración máxima de PHA extraído en el tratamiento de almidón sin hidrolizar con nutrientes de 0,005635 g/L en el fermento de 10g/L a las 72 horas de proceso fermentativo y en el tratamiento de almidón sin hidrolizar con ausencia de nutrientes de 0,006205 g/L en el fermento de 15g/L.

Al finalizar la experimentación se determinó que el mayor rendimiento de proceso ocurrió en el fermento donde la concentración de sustrato fue de 5g/L con adición de nutrientes con un valor de 0,8% donde se indica que por cada 5g/L de almidón de papa como fuente de carbono en el proceso fermentativo se obtienen 0,04 g de polihidroxicanoato a nivel laboratorio, posteriormente se realizó la caracterización del PHA obtenido por la determinación de metil ésteres por cromatografía de gases

en la cual se encontraron diferentes tipos de estos indican que el producto obtenido durante el proceso de fermentación corresponde a un tipo de PHA.

Este trabajo se lleva a cabo en el Nodo Tecnoparque del Sena Bogotá y en el Centro de Gestión Industrial Sena, sede Paloquemao Bogotá.

Palabras clave: Almidón, polihidroxicanoatos, acondicionamiento, fermentación, extracción y metil ésteres.

INTRODUCCIÓN

La papa es un producto que es consumido en grandes cantidades en Colombia y en el mundo, donde uno de sus componentes, el almidón, posee grandes aplicaciones dentro de distintos tipos de industria, más allá de que en un principio sea considerado como un residuo que no puede ser aprovechado.

Gracias a los avances tecnológicos en la actualidad y múltiples estudios e investigaciones buscando la transformación de este residuo en otro producto útil, el uso de este residuo se ve reflejado de distintas maneras; por ejemplo en la industria alimenticia, es usado para la fabricación de edulcorantes, en la industria farmacéutica se utiliza como materia prima para la producción de dextrosa, en la industria química se usa para la fabricación de pegamentos y por último en la industria de plásticos, el almidón se emplea como alimento de un microorganismo el cual empieza a producir capsulas de poliésteres por medio de la restricción de nutrientes que se le brindan para su crecimiento. Con dichas capsulas se puede producir una película de un polímero biodegradable el cual puede tener múltiples aplicaciones y características basado en el microorganismo que decida usarse.

En el presente trabajo se desarrolla una alternativa de utilización del almidón de papa evaluando la producción de PHA a partir del microorganismo *Bacillus subtilis*, por lo que se realiza un acondicionamiento del sustrato, seguido de la fermentación y una extracción mediante solventes orgánicos en un proceso que sea más amigable con el medio ambiente y se determina la producción de PHA mediante una cromatografía de gases acoplado a masas buscando la presencia de los grupos funcionales correspondientes.

El almidón fue proporcionado por la empresa Comercializadora Nacional de Papas R&G, la cual tiene una producción de su producto papa “cabello de ángel” de 65 toneladas mensuales, proveniente de un inicio de proceso con una capacidad alrededor de 200 toneladas de papa cruda. Basado en la escala de producción en promedio, por cada 100 kilos de papa cruda que entran al proceso, se obtienen 27 kilos de producto terminado y como residuo se obtienen 3 toneladas de almidón mensual, por lo tanto, la empresa busca una alternativa de aprovechar el residuo, el cual es vendido a una empresa externa que se encarga de usarla como insumo para la producción de concentrado animal.

Dentro del proyecto, este almidón se somete a fermentación microbiana donde se trabajan fermentos con nutrientes y con ausencia de ellos con el fin de observar el efecto que tienen las condiciones de fermentación en la producción de PHA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar de la obtención de polihidroxicanoatos (PHAs) partiendo del residuo de almidón de papa por medio de *Bacillus subtilis* a nivel laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Acondicionar el residuo de almidón de papa y el cultivo inicial de *Bacillus subtilis* para el proceso de fermentación microbiana.
2. Seleccionar las condiciones de proceso de fermentación por medio de un diseño experimental.
3. Determinar el porcentaje de producción de polihidroxicanoatos (PHAs) de acuerdo a la fermentación microbiana de almidón de papa.

1. GENERALIDADES

En el presente capítulo se presentan conceptos y características básicas del almidón como materia prima en la elaboración de PHA, además de aspectos generales del producto como lo es el polihidroxialcanoato.

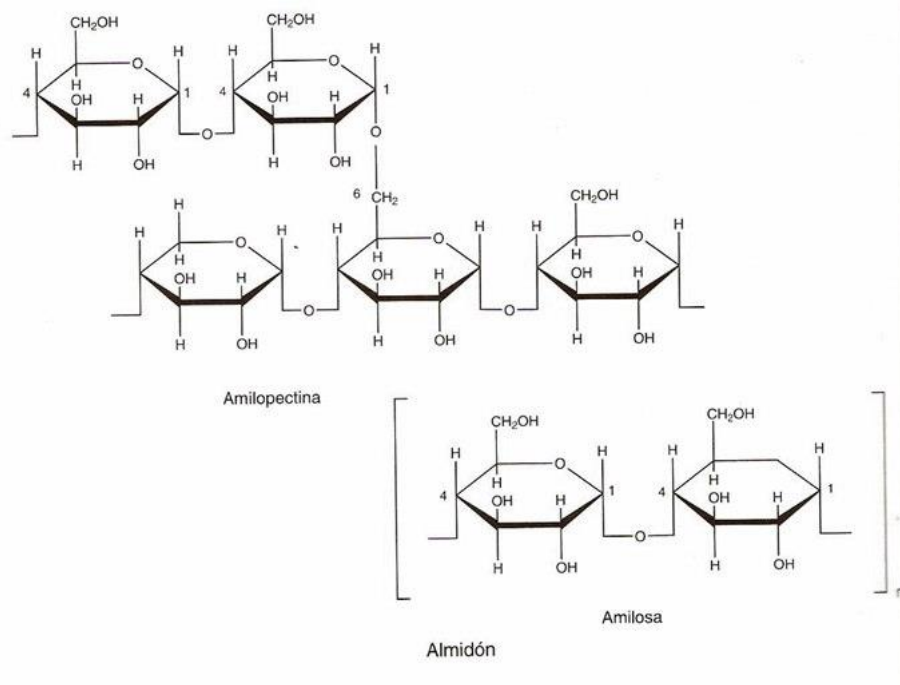
1.1 ALMIDÓN

El almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en los tejidos vegetales, el cual le sirve a casi todas las plantas para almacenar otros carbohidratos para su uso metabólico, para el embrión vegetal de las semillas y para la hibernación natural o los llamados períodos de sequía.

1.1.1 Composición y estructura. Químicamente el almidón es una mezcla de dos polisacáridos estructuralmente distintos:

- **Amilosa:** es una molécula lineal compuesta de 250 - 300 unidades de la 1,4 α -D-glucopiranososa en forma lineal, ver **Figura 1**. En este componente, las unidades D-glucosa se encuentran unidas en forma lineal, no ramificada, mediante enlaces α -1,4, los cuales tienen un extremo no reductor y un extremo reductor.
- **Amilopectina:** la cual consta de 1.000 o más unidades de 1,4 α -D-glucopiranososa con casi el 4% de 1,6 α -D-glucopiranososa en los puntos de ramificación, ver **Figura 1**. El tamaño de las moléculas de amilopectina es un poco mayor que el de la amilosa; se pueden encontrar pesos moleculares comprendidos entre 50.000 y 1.000.000, es decir, que la cantidad de moléculas de glucosa es de 300 a 6.000 por cada molécula de amilopectina. Desde un punto de vista de un aprovechamiento de estos polímeros por el organismo, para poder digerir la amilopectina es necesario que exista una enzima adicional capaz de romper los enlaces α -1,6. Esta enzima existe en los jugos digestivos de los organismos superiores y también es producida por los organismos unicelulares que pueden utilizarla como fuente de alimento.

Figura 1. Estructura del almidón, amilosa y amilopectina.



Fuente: El almidón y su química. Recuperado de: <http://quimica.laguia2000.com/compuestos-quimicos/el-almidon-y-su-quimica>

El almidón puede fermentarse biológicamente de varias maneras dando productos comerciales que pueden ser muy útiles, además de las más conocidas, el almidón junto a diferentes organismos puede producir ácido butírico, alcohol butílico y acetona.

El almidón se encuentra en grandes cantidades en los tubérculos y semillas de cereales leguminosas, de donde puede obtenerse fácilmente en forma de gránulos, característicos por su forma y tamaño. Se obtiene de manera simple después de un proceso de molienda o trituración adecuado, el cual, aprovechando la diferencia en densidad presentada por los gránulos de almidón respecto a la fibra, lípidos y proteínas del tejido vegetal, por un arrastre de agua.

1.1.2 Aplicaciones. El almidón y sus derivados son altamente utilizados en los hogares para recetas culinarias, en la industria alimentaria como espesante de salsas, aglutinante en las harinas para panes y pastas. En países europeos y escandinavos es utilizado para la producción de azúcares que se fermenten y destilen para la producción de bebidas alcohólicas, por procesos de hidrólisis; también es utilizado por otro tipo de industrias como textil, de la madera, del papel, farmacéutica; debido que este es un sustituto 100% biodegradable del poliestireno, puede ser utilizado en la fabricación productos desechables.

1.2 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

1.2.1 Definición y estructura. GONZÁLEZ GARCÍA afirma “Los polihidroxicanoatos son biopolíesteres sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de energía y carbono que, una vez extraídos de la célula presentan propiedades físicas similares a los plásticos derivados del petróleo”(p.1)¹; su estructura general y ejemplos de nomenclatura de estos compuestos se muestra en la **Figura 2**. Actualmente son muy estudiados debido a que pueden reemplazar a los plásticos normales que tienen un origen petroquímico. El PHA es completamente biodegradable y se produce a partir de fuentes de carbono renovables. Se acumula como polímero líquido, móvil y amorfo en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma microbiano rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contienen enzimas polimerasas y despolimerasas.

Figura 2. Estructura de los PHA.

$\left[\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ - \text{O} - \text{C} - (\text{CH}_2)_n - \text{C} - \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{R} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array} \right]$			
<i>n</i>	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxiacetato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxiacetato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxiacetato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxiacetato)	P5HV

Fuente: Polihidroxicanoato y ejemplos de su nomenclatura y su respectivo símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral. Recuperado de:

<http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_artt ext&pid=S0188-49992013000100007>

¹GONZÁLEZ GARCÍA Yolanda y Colaboradores. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano p1. Universidad de Guadalajara. *Departamento de Madera, Celulosa y Papel*. 2012.

1.2.2 Propiedades. El PHA es un termoplástico, el cual puede ser procesado en equipos de procesamiento convencional, ya dependiendo de su composición, pueden llegar a ser dúctiles y poseer mayor o menor elasticidad. Además, es estable a la luz UV, basados en otros bioplásticos que son formados por polímeros tales como ácido poliláctico, con temperaturas aproximadas a los 180°C y muestran una baja permeabilidad del agua. Su cristalinidad puede estar en el rango del 70%. Uno de los tipos de PHA es el polihidroxibutirato (PHB), este biopolímero posee propiedades similares a las propiedades que presenta del polipropileno (PP).

Un biopolímero sintetizado a través de PHA puro es relativamente frágil y rígido. Ya otros copolímeros de PHA, los cuales pueden incluir ácidos grasos como por ejemplo el ácido beta-hidroxivalerato, pueden llegar a ser polímeros muy elásticos.

Cuadro 1. Propiedades típicas del PHB.

Propiedades Eléctricas	
Constante dieléctrica @1MHz	3.0
Resistividad de volumen (ohm.cm)	10 ¹⁶
Propiedades Físicas	
Densidad (g/cm ³)	1.25
Resistencia a los ultra-violetas	Aceptable
Propiedades Mecánicas	
Módulo de tracción (GPa)	3.5
Resistencia a la tracción (MPa)	40
Resistencia al impacto Izod (J/m)	35 – 60
Propiedades Térmicas	
Temperatura máxima de utilización (°C)	95
Resistencia Química	
Ácidos – diluidos	Aceptable
Álcalis	Mala
Alcoholes	Aceptable
Grasas y aceites	Buena

Fuente: Recuperado de: <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.co/2012/10/polihidroxialcanoatos-pha.html>

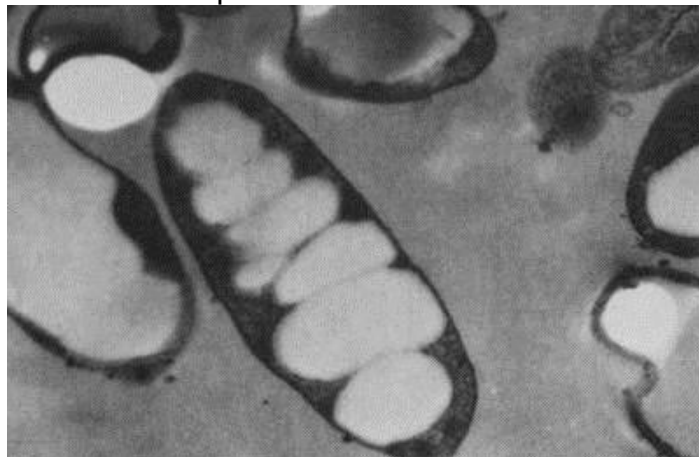
1.2.3 Biosíntesis. El PHA es sintetizado tanto por vía química como por vía biológica. Para poder producir PHA se emplea el cultivo de un microorganismo el cual es colocado en un medio adecuado para su crecimiento y este se alimenta por nutrientes que le son suministrados, logrando así que se multipliquen de forma acelerada. Una vez que dicha población logra alcanzar un nivel alto, la composición de nutrientes se cambia para forzar el microorganismo a sintetizar PHA. El rendimiento del PHA obtenido a partir de las inclusiones intracelulares es basado

en el porcentaje del peso seco del tipo de microorganismo que se utilizó (por ejemplo, Gram - negativo o Gram - positivo), los componentes de los medios de fermentación, condiciones y tipos de fermentación (lote alimentado, continuo) y la recuperación.

Esta biosíntesis es causada generalmente por la deficiencia que se presenta en las condiciones (como ejemplo, la falta de presencia de macro elementos como el fosforo, nitrógeno y la falta de oxígeno) o el exceso de fuentes como el carbono.

Los poliésteres se depositan en forma de gránulos altamente refractivos en las células, ver **Figura 3**. Dependiendo del microorganismo que se utilice y las condiciones del cultivo a las cuales sea sometido, se pueden generar ácidos hidroxialcanicos. Ya como parte final, los gránulos de PHA se recuperan por la disrupción de dichas células.

Figura 3. Acumulación de gránulos PHA en *Rhodobacter sphaeroides*.

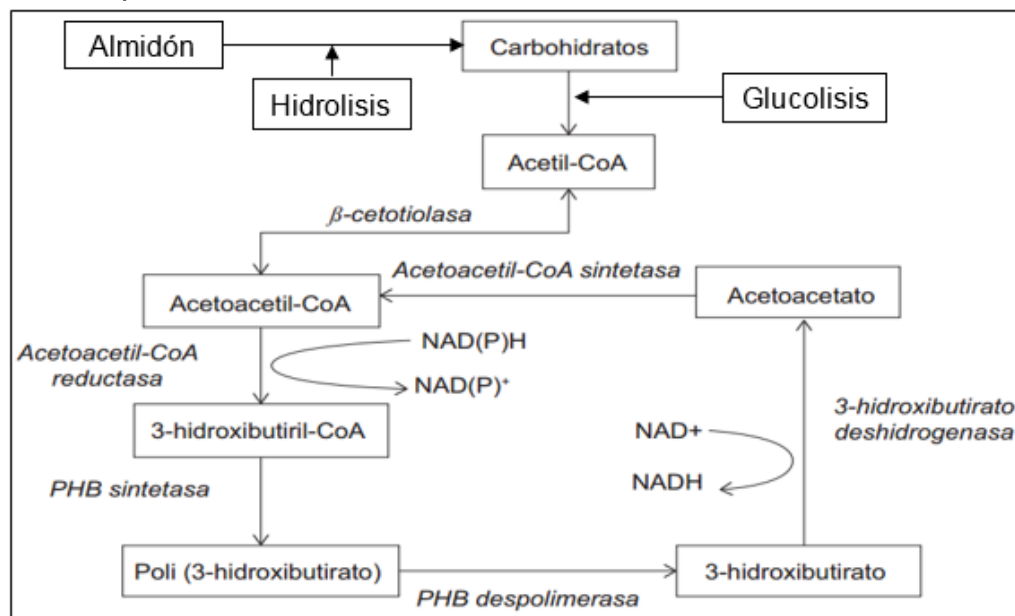


Fuente: Polihidroxicanoato (PHA). Recuperado de:

<<http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.co/2012/10/polihidroxicanoatos-pha.html>>

Para explicar a detalle la ruta metabólica del Polihidroxicanoato, es necesario basarse en el P3HB, el cual es el PHA más estudiado y es producido por la bacteria *Ralstonia eutropha*, ya con esta información se puede hablar de los procesos metabólicos para la producción de PHA basados, en los tipos cadenas que se conoce:

Figura 4. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos.



Fuente: Polihidroxicapnoato (PHA). Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007

En el proceso metabólico para la producción de PHA de cadena corta empieza a partir de Acetil-CoA, mediante una secuencia de 3 reacciones catalizadas por las enzimas, acetoacetyl-CoA reductasa, la polisintetasa y la 3-cetotiolasa. Esta última controla la biosíntesis de P3HB en la bacteria *Ralstonia Eutropha* teniendo como metabolito clave el CoA. La principal clave de la síntesis en este microorganismo es el destino del acetyl-CoA, la cual tiene dos rutas, puede ser oxidada vía el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o puede servir como sustrato para la síntesis de P3HB. La ruta que vaya a elegir el acetyl-CoA depende de las condiciones ambientales a las cuales sea sometido, destacando la limitación por oxígeno cuando la relación NADH*/NAD aumenta. En el momento en que la concentración de oxígeno es adecuada, la concentración de CoA es alta y el acetyl-CoA logra entrar en un ciclo del ácido cítrico, mientras que la enzima 3-cetotiolasa es inhibida y por consiguiente, la síntesis de P3HB termina.

Por lo general, las bacterias que logran sintetizar P3HB, no producen PHA con una cadena media, aunque existen casos donde utilizando algunos microorganismos recombinantes, se pueden lograr mezclar las rutas metabólicas y así, producir polímeros o copolímeros con monómeros de cadena corta, media o incluso ambas.

1.2.4 Bacterias productoras de PHAs. En la **Cuadro 2** se puede mostrar algunas de las bacterias productoras de PHA más importantes:

Cuadro 2. Bacterias que acumulan PHA.

Bacteria	% de peso seco
<i>Ralstonia eutropha</i>	96
<i>Rhodobacter</i>	80
<i>Azospirillum</i>	75
<i>Azotobacter</i>	73
<i>Methylocystis</i>	70
<i>Leptothrix</i>	67
<i>Pseudomonas</i>	67
<i>Baggiatoa</i>	57
<i>Rhizobium</i>	57

Fuente: Recuperado de: <<http://biopolymer.net/>>

1.2.5 Obtención de PHAs. El PHA se puede producir por medio de procesos biotecnológicos como: producción *in vitro*, empleando enzimas aisladas, proceso fermentativo, usando microorganismos nativos y/o modificados genéticamente, o a través de plantas transgénicas.

- **Producción de PHAs *in vitro*.** La biosíntesis de PHA *in vitro* se realiza a partir de lactonas o ácidos hidroxialcanoicos empleando lipasas, esterases y proteasas aisladas. Este procedimiento al no depender de la capacidad metabólica del microorganismo ofrece una alternativa en la obtención de PHA con mayor pureza y propiedades fisicoquímicas específicas, como se expresa en el artículo “Bacterial and other biological systems of polyester production”².
- **Producción de PHAs por fermentación microbiana.** En esta producción se utilizan microorganismos nativos o modificados genéticamente, buscando mejorar el rendimiento de producción. Estos microorganismos sintetizan PHA a partir de diferentes sustratos y los almacenan en su citoplasma como carbono de reserva. Esto se genera debido a que la célula es expuesta a unas condiciones de estrés nutricional en donde hay un exceso en la fuente de carbono y una restricción de otro nutriente como lo pueden ser el fósforo, el oxígeno o el nitrógeno.

Los microorganismos usados en esta producción pueden dividirse en dos grupos, el primer grupo se basa en la limitación de un nutriente esencial como

² STEINBÜCHEL A., FÜCHTENBUSCH B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. TIBTECH OCTOBER (vol16).

nitrógeno o fósforo. El segundo grupo, no requiere ninguna limitación de nutriente durante la síntesis lo cual permite que puedan acumular polímero durante el crecimiento, demostrado en el review “¿Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria” Del autor Lee Sang Yup³.

La fermentación se puede efectuar con un solo microorganismo (cultivo puro) o con una cantidad de microorganismos (cultivos mixtos). Los cultivos mixtos poseen una ventaja en cuanto al cultivo puro y es que en este tipo de fermentaciones no necesitan las condiciones de esterilidad, basado en la tesis de maestría “Producción y caracterización de Polihidroxialcanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos” del autor Javier Ricardo Gómez Cardozo⁴.

- **Fermentación para la producción de PHA.** Como se demuestra en la tesis de maestría “Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales” del autor Javier Mauricio Naranjo Vasco, se puede llevar a cabo por medio de lotes, lotes alimentados y en conjunto. Las características de estos tipos de fermentación utilizando el primer grupo de microorganismos son los siguientes⁵:
- **Producción en lotes.** El microorganismo es sometido a un ambiente de estrés nutricional limitándole algún nutriente esencial como el fósforo y dando un exceso en la fuente de carbono desde el comienzo de la fermentación deteniéndose en el inicio de la fase estacionaria.
- **Producción en lotes alimentados.** Este método es muy utilizado para alcanzar una alta densidad celular y manejar por tiempos la limitación de nutrientes, logrando así controlar la etapa de crecimiento, durante la fase de limitación de nutrientes la concentración de material celular residual se mantiene casi constante, de tal forma que el aumento de la biomasa total se debe principalmente a la acumulación de PHA en el citoplasma del microorganismo.
- **Producción en continuo.** Este proceso se desarrolla normalmente en dos biorreactores en serie, lo cual permite aumentar la productividad en 1,7 veces comparándola con una sola etapa, manejando los valores adecuados para cada uno de los parámetros involucrados en el proceso como lo son el pH, la temperatura y el tiempo de fermentación.

³ SANG YUP Lee. (1996). ¿Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. TIBTECH. November (VOL 14).

⁴ GOMEZ CARDOZO Javier Ricardo. Producción y caracterización de Polihidroxialcanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. p42. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 2013.

⁵ NARANJO VASCO Javier Mauricio. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. p65. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. 2010.

- **La temperatura.** Esta variable es reportada como determinante para el crecimiento de los microorganismos, el tipo de biopolímero que se va a generar y las características que adquiera.
- **El pH.** Factor que influye bastante en el desarrollo de los procesos biológicos, basados en el efecto que poseen de manera individual como uniéndolos con otros factores como lo son la temperatura o el tipo de sustrato. En el **Cuadro 3**, se presentan intervalos de pH evaluados para la producción de PHA, utilizando diferentes cepas.

Cuadro 3. Valores de pH para determinar diferentes cepas empleadas en la producción de PHA.

Cepa	Valores de pH	Ref.
<i>Vibrio spp.</i> MK4	2, 3, 4, 5, 6, 7 ^a , 8, 9	Arun et al , 2009
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	6, 7 ^a , 8	Kulpreecha et al , 2009
<i>Bacillus megaterium</i> SRPK-3	7, 8, 9 ^a , 10, 11	Pandian et al , 2010
<i>Comamonas ssp.</i> EB 162	6.5, 7 ^a , 7.5, 8	Zakaria et all , 2010

Fuente: GOMEZ CARDOZO Javier Ricardo. Producción y caracterización de polihidroxialcanatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 2013. P 43.

^a Valor reportado para la máxima producción de biomasa seca.

- **Producción de PHAs por plantas transgénicas.** Se buscan desarrollar tecnologías para producir PHA por medio de tejidos vegetales, tales como semillas y hojas, los cuales mediante la fotosíntesis utilizan el dióxido de carbono y agua como materia prima para la producción de PHA⁶.
- **Sustratos utilizados para la producción de biopolímeros.** Actualmente se utilizan distintos sustratos para la producción de PHA, algunos de estos sustratos son la sacarosa, glucosa, fructosa y ácido propionico. Una de las alternativas que está tomando fuerza en la actualidad es el aprovechamiento de residuos agroindustriales, como un nuevo punto de vista en el cual se crean nuevas alternativas para el uso de subproductos de industrias.

1.2.6 Métodos de extracción de PHAs. Luego de la fermentación, como parte final se procede a realizar la respectiva extracción del PHA, la cual se logra por medio de solventes que permiten destruir la membrana celular extrayendo el PHA

⁶ LI Shen, JULIANE Haufe, MARTIN K. Patel. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics PRO-BIP 2009. Final Report June 2009. Utrecht The Netherlands.

del citoplasma, lugar donde se almacena, siendo separado de la biomasa residual. Los residuos que quedan presentes en la pared celular son separados por medio de filtración y/o centrifugación. Como último paso, se lleva a cabo la purificación la cual se emplea mediante la mezcla de solventes.

En la **Cuadro 4** se muestra un resumen de los métodos de extracción empleados para la recuperación de biopolímeros de origen bacteriano.

Cuadro 4. Métodos de extracción.

Método de extracción	Ventajas	Desventajas	Resultados (%wt)
Extracción con solventes	Eliminación de endotoxinas / alta pureza. No hay degradación del polímero.	Quiebre de la morfología de los gránulos de PHA. Alto precio / baja recuperación.	Pureza: 99,5% Recuperación: > 90%
Digestión por surfactantes	Tratamientos de altas densidades celulares	Baja pureza / tratamiento de aguas residuales necesario / degradación de polímero	Surfactante: digestión de altas densidades celulares por SDS. Pureza > 95%. Velocidad de liberación > 95%
Digestión por NaClO	Alta pureza	Degradación del polímero	Pureza: 99%. Recuperación: 94%
Digestión por NaClO y cloroformo	Baja degradación del polímero de alta pureza.	Requiere altas cantidades de solvente.	Pureza: 97% Recuperación: 91%
Digestión por NaClO y surfactantes	Degradación limitada / bajos costos de operación	-	Sal disodica surfactante – EDTA Pureza: 98% Recuperación: 86,6%
Digestión por quelatos y surfactantes	Alta pureza / contaminación ambiental baja.	Grandes volúmenes de aguas residuales	Pureza: 98,7% Recuperación: 93,3%
Disolución selectiva de masa celular no – PHB mediante protones (NPCM)	Alta recuperación y alta pureza / bajos costos de operación	-	Pureza: 98,7% Recuperación: 95,4%

Cuadro 4. (Continuación)

Método de extracción	Ventajas	Desventajas	Resultados (%wt)
Digestión enzimática	Buena recuperación	Altos costos de las enzimas	Pureza: 92,6% Recuperación: 90%
Disrupción con molinos de bolas	No requiere el uso de químicos	Requiere de muchos pases por el equipo	-
Homogenización de alta presión	No requiere el uso de químicos	Disrupción pobre / velocidad de disrupción baja	Rendimiento: 98% Pureza: 95%
CO2 supercrítico	Bajos costos, baja toxicidad	Poca recuperación	Recuperación: 89%
Utilizando la fragilidad celular	Uso débil en extracción	-	Pureza: 99% Recuperación: 96%
Clasificación por aireación	Alta pureza	Baja recuperación	Rendimiento: 90% Pureza: 97%
Liberación espontanea	No es necesario extraer las sustancias químicas	Las células secreta espontáneamente los gránulos de PHB	Rendimiento: 80%

Fuente: GOMEZ CARDOZO Javier Ricardo. Producción y caracterización de polihidroxialcanatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 2013. P 45.

1.2.7 Métodos de detección y cuantificación. En esta parte se emplean tintes lipofilicos, estos poseen una naturaleza lipídica, la cual, permite determinar la presencia de PHA. Para este procedimiento los tintes que más se utilizan son Azul de Nilo y el negro Sudan B.

En la tinción con Azul de Nilo – A, las células son fijadas por calor y al ser observadas bajo luz fluorescente, pueden emitir una coloración anaranjada muy fuerte demostrando que la prueba dio un resultado positivo. Con el negro de Sudan B, la fijación de las células se hace al aire libre dando así una prueba positiva en dado caso si se presenta una coloración azul violeta bajo iluminación directa, si la coloración da un color amarillo - café significa que la prueba dio un resultado negativo.

Para la parte de la cuantificación del PHA, uno de los mejores métodos que se puede usar es el de la cromatografía de gases, en el cual se emplea como patrón interno ácido benzoico, en el cual se establecen tiempos de retención para cada uno de los tipos de estructuras y cantidad de carbonos presentes en ellas. Para realizar esta cuantificación es necesario extraer los PHA de las células previamente

despolimerizarlos mediante métodos como metanolisis lo que permite formar metil ésteres o propanolisis para formar propil ésteres.

Otro método que se puede emplear es el análisis Espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear con C^{13} (C^{13} – NMR). Esta técnica permite determinar los grupos terminales y las posibles ramificaciones de las moléculas presentes en las muestras. Por último, otro método utilizado es el de la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FTIR y RMN – $1H$, como se expresa en el trabajo de grado “Efecto del gen *fadH1* en la producción de PHA en monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*” del autor Diego Armando Castillo Franco⁷.

⁷ CASTILLO FRANCO, Diego Armando. Efecto del gen *fadH1* en la producción de PHA contenido en monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 2008

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se mostrarán los reactivos, materiales y métodos que se realizaron en el trabajo de grado, esto se explica teniendo en cuenta los objetivos propuestos basado en el objetivo general, demostrando el cumplimiento de estos.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Almidón. El almidón de papa utilizado en el proceso fue proporcionado por la empresa Comercializadora Nacional de Papas R&G ubicada en la Calle 32 B sur No. 16 F – 21 del municipio de Soacha, Cundinamarca. La empresa produce mensualmente 65 toneladas de papas “cabello de ángel” o fosforito, basado en 200 toneladas de papa cruda que entran en el proceso de producción, de esto se obtienen aproximadamente 3 toneladas de almidón húmedo mensual, la empresa vende este almidón a un tercero que se encarga de transformar el almidón húmedo en almidón seco, para luego poder utilizarlo como insumo en la elaboración de concentrados para animales domésticos.

2.1.2 Cepa microbiana (*Bacillus subtilis*). La cepa microbiana utilizada en el proceso de fermentación fue suministrada por el Centro de Gestión Industrial SENA, sede Paloquemao – Bogotá, esta cepa microbiana fue entregada en un estado de aislamiento. Ver **Imagen 1**.



Imagen 1. *Bacillus subtilis*.



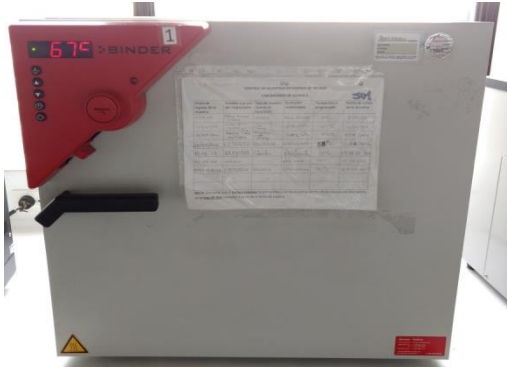

2.2 EQUIPOS

En el **Cuadro 5**, a continuación se muestran los equipos utilizados durante todo el proceso experimental.




Cuadro 5. Descripción de equipos utilizados.

Equipo	Descripción	Imagen
Mufla	Es un equipo que permite la calcinación de una muestra hasta una temperatura de 600°C. Marca THERMOLYNE	
pH-metro	Es un medidor de pH, el cual posee un reconocimiento de sensor con historial de calibración. Este equipo es utilizado para monitorear el pH durante el proceso de fermentación, para posteriormente controlar la acidez del medio.	

Cuadro 5. (Continuación)

Equipo	Descripción	Imagen
Horno	Es un equipo que permite calentar diferentes tipos de muestras a una temperatura preestablecida eliminando así humedad presente en la muestra. Marca BINDER.	
Cabina de bioseguridad	Es una cabina donde se realizan la manipulación de microorganismos y reactivos buscando evitar la contaminación de los mismos, además de buscar la seguridad del personal del laboratorio, se utiliza para manipular reactivos como ácidos o bases, además de la toma de muestras en el proceso de fermentación. Marca ESCO.	



Cuadro 5. (Continuación)

Equipo	Descripción	Imagen
<p>Plancha de calentamiento con agitación</p>	<p>Este dispositivo permite agitar, calentar y controlar la temperatura durante la preparación de las soluciones de almidón de papa al 0,5% para su posterior caracterización. Marca HEIDOLPH</p>	
<p>Balanza analítica</p>	<p>Capacidad máxima 250g, legibilidad 0,0001g, tamaño de plato 90mm. Marca Nimbus.</p>	
<p>Espectrofotómetro</p>	<p>Es un espectrofotómetro UV/vis de un haz, tiene un rango de longitud de onda 190 a 1100nm, Marca Shimadzu.</p>	



Cuadro 5. (Continuación)

Equipo	Descripción	Imagen
<p>Agitador orbital</p>	<p>Es una cabina incubadora que logra mantener constante las condiciones de temperatura y agitación en el transcurso de la fermentación, el cual se le colocaron 6 fermentos de 1000ml de capacidad para trabajar en las siguientes condiciones de proceso: 36°C y 15,75 rad/s.</p>	
<p>Incubadora</p>	<p>Esta cabina permite mantener la temperatura constante en incubaciones de caldos fermentativos, cajas de Petri y tubos de ensayo con cultivos microbianos. Marca BINDER</p>	


Cuadro 5. (Continuación)

Equipo	Descripción	Imagen
Centrifuga	<p>Este dispositivo se encarga de poner en rotación una muestra, para separar por fuerza centrífuga, sus componentes o las fases presentes en función de su densidad, utiliza para separar las fases presentes al finalizar el proceso de fermentación del almidón para realizar la extracción de PHA. Marca ILETTICH.</p>	
Fermentador	<p>Es un frasco marca SCHOTT DURAN, el cual tiene capacidad de 500 ml de tapa azul resistente al calor, este frasco soporta el choque térmico permitiendo ser utilizado para la fermentación del almidón de papa.</p>	

Cuadro 5. (Continuación)

Equipo	Descripción	Imagen
Autoclave	<p>Esteriliza a 121 °C y 15 lb de presión, durante 20 minutos. Este equipo esteriliza en medio fermentativo, antes de la incubación del mismo y los instrumentos a utilizar en el laboratorio de microbiología.</p>	
Microscopio	<p>Permite la visualización del interior de las bacterias para observar la presencia de PHA. Marca ZEISS</p>	

Cuadro 5. (Continuación)

Equipo	Descripción	Imagen
Cromatografo de gases acoplado a masas	Permite la determinación de metil ésteres presentes en el PHA obtenido. Marca Agilent technologies	

2.3 REACTIVOS

En el **Cuadro 6** se muestran los reactivos usados durante la experimentación y los usos que se les dio a lo largo de este.

Cuadro 6. Reactivos utilizados y usos.

Reactivos	Usos
Agua destilada	Es usada como diluyente en las soluciones preparadas
Hidróxido de sodio 0,1N	Es una base química de color blanco, utilizada en la titulación de la determinación de acidez del almidón de papa.
Reactivo de fehling A	Es una solución de sulfato de cobre, utilizada en la determinación de azúcares reductores.
Reactivo de fehling B	Es una solución alcalina de tartrato de sodio potasio e hidróxido de sodio, utilizada para la determinación de azúcares reductores.

Cuadro 6. (Continuación)

Reactivos	Usos
Ácido clorhídrico al 37% v/v	Es una disolución acuosa del gas cloruro de hidrogeno utilizada para la determinación de azucares reductores y no reductores.
Ácido sulfúrico al 98% v/v	Es un ácido fuerte que se utiliza para realizar la hidrolisis acida en la determinación de nitrógeno por el método kjedhal.
Fosfato de potasio	Es una sal utilizada como estándar de trabajo para la realización de la curva de calibración en la determinación de fosfolípidos en el almidón de papa.
Citrato férrico amoniacal	Es una sal amónica de un ácido cítrico utilizado como regulador de acidez en el proceso de fermentación.
Sulfato de amonio	Es una sal de amonio utilizado como activador de la fermentación, aporta iones de amonio.
Fosfato diácido de potasio	Sal soluble que aporta fosforo y potasio ayudando a la bacteria en el proceso de acumulación de energía
Fosfato acido de sodio	Es una sal anhidra la cual se utiliza para ajustar el pH y limitar el nitrógeno en el medio.
Sulfato de magnesio heptahidratado	Es una sal hidratada la cual ayuda a la bacteria en la síntesis de proteína.
Cloruro de calcio dihidratado	Es una sal inorgánica hidratada la cual se usa como nutriente en el proceso de fermentación.
Agar nutritivo	Es un medio de cultivo usado como rutina para todo tipo de bacteria, distinguiendo el crecimiento microbiano en su superficie.
Agar peptona	Es un polvo de polipéptidos que es utilizado como medio de cultivo, el cual se diluye en el agua. Es utilizado para la elaboración de diluciones de microorganismos durante la fermentación.
Negro sudan B	Es un tinte diazo del tipo licrosomo, lo cual quiere decir que fija el colorante a la bacteria.

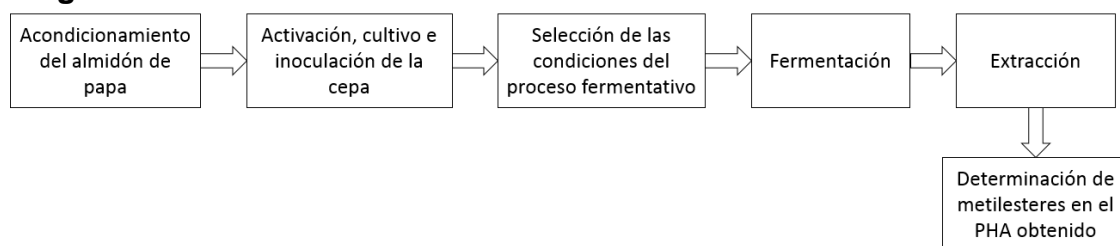
Cuadro 6. (Continuación)

Reactivos	Usos
Xileno	Es utilizado para aclarar el microorganismo en la tinción.
Fucsina	Es un colorante utilizado para poder facilitar la identificación de polihidroxicanoato.
Cloruro de sodio	Es utilizado en el pretratamiento del pellet resultante de la centrifugación después de la fermentación.
Hidróxido de sodio 0,1M	Es utilizado en la extracción del PHA obtenido durante la centrifugación del pellet.
Etanol	Es usado en el lavado del pellet en el proceso de extracción del PHA.
Metanol	Es usado para observar la precipitación de la fase orgánica en la extracción.

2.4 MÉTODOS

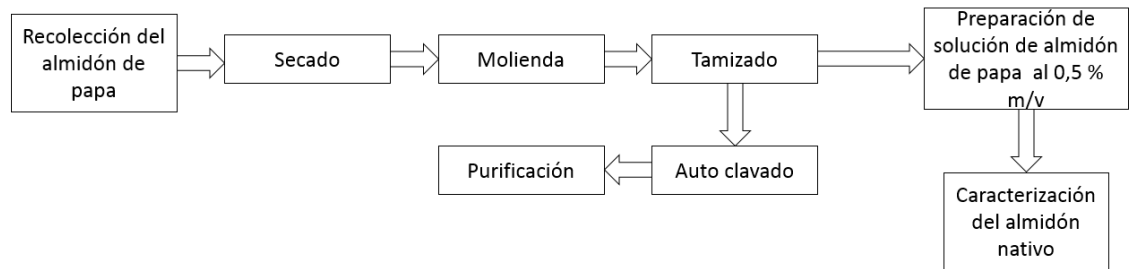
En el **Diagrama 1** se presenta las diferentes fases a trabajar para la evaluación de la obtención de PHA. Donde inicialmente se realiza un proceso de acondicionamiento del almidón de papa para las determinaciones dentro de la caracterización del mismo, que aporta datos para el inicio del proceso de fermentación; a continuación, se prosigue con el proceso de fermentación por medio de *Bacillus subtilis*, cepa microbiana de la cual se evalúa la transformación del residuo de almidón en PHA; para finalmente pasar a la última fase de la evaluación la cual es la caracterización del PHA obtenido.

Diagrama 1. Síntesis de Polihidroxicanoatos



2.4.1 Acondicionamiento del almidón de papa. En el acondicionamiento del almidón de papa se presenta en el **Diagrama 2**, este se realiza mediante procesos de secado, molienda, tamizado; seguido a estos procesos se autoclava el almidón para eliminar los microorganismos presentes en el mismo y que la fermentación se dé exclusivamente por la cepa microbiana *Bacillus subtilis*. Posteriormente se realiza la caracterización del almidón.

Diagrama 2. Acondicionamiento del almidón de papa



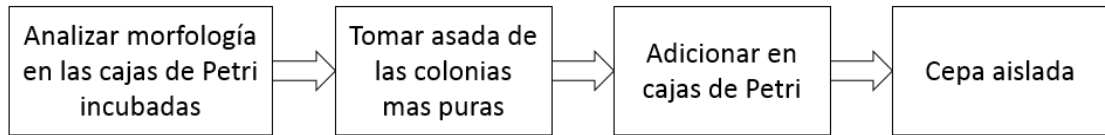
2.4.2 Activación, cultivo e inóculo de la cepa microbiana. La activación de la cepa microbiana a trabajar se plantea en el Diagrama 3; se prepara una solución de agar nutritivo, el cual se esteriliza en autoclave. El microorganismo se cultiva en el agar estéril por medio de siembra con asa, posteriormente se incubaba en una temperatura de 36 °C, pH 7 y en presencia de oxígeno buscando un desarrollo óptimo de la *Bacillus subtilis*.

Diagrama 3. Activación de cepa microbiana de *Bacillus subtilis*



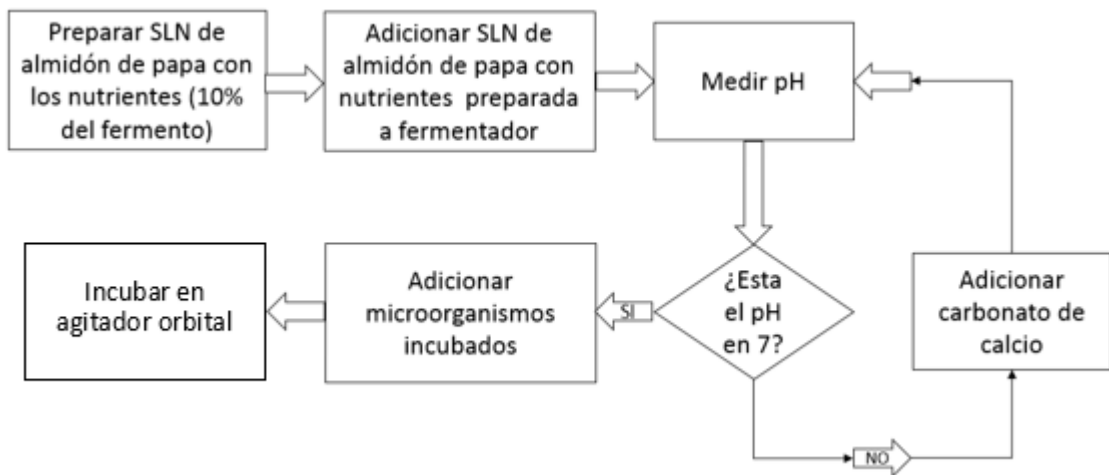
Posterior a la fase de activación microbiana, se realiza el aislamiento de la cepa descrito en el **Diagrama 4**, para este proceso se analiza la morfología de las cajas de Petri incubadas y se toman las colonias más puras para resembrarlas en agar nutritivo estéril y así tener como resultado la cepa aislada.

Diagrama 4. Aislamiento de cepa microbiana de *Bacillus subtilis*.



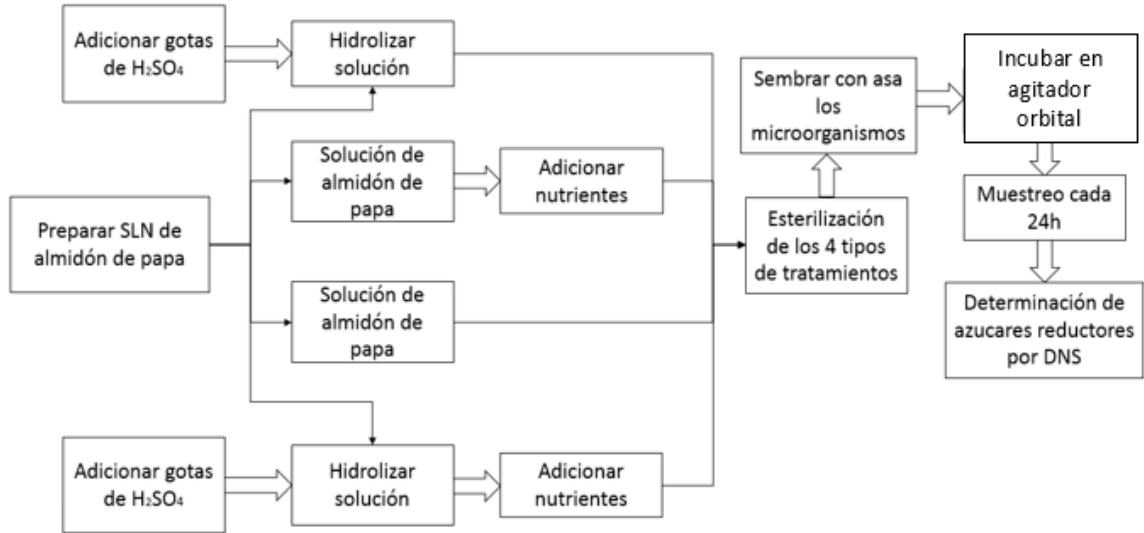
Antes de iniciar la fase de fermentación microbiana, se realiza la preparación del inóculo, medio en el cual el microorganismo se acondiciona al sustrato establecido para la fermentación, en el **Diagrama 5** se plasma este proceso, en el cual se prepara una solución de almidón de papa del 10% del volumen total preparado para la fermentación donde se adiciona el microorganismo y se deja incubando en agitador orbital por 48h a 15,75 rad/s y pH 7.

Diagrama 5. Preparación del Inóculo



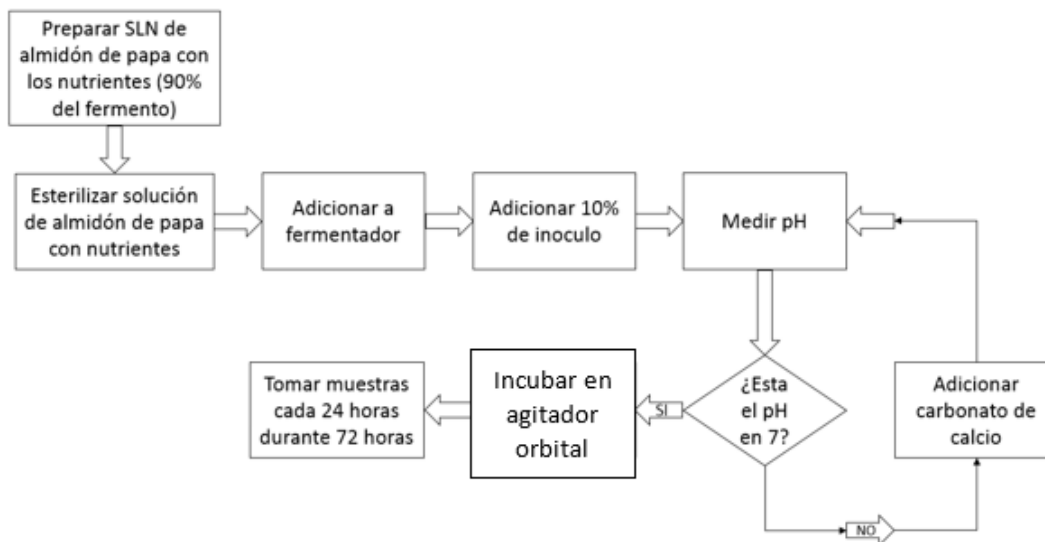
2.4.3 Selección de las condiciones del proceso fermentativo. En el **Diagrama 6**, se realiza la evaluación de las condiciones de proceso fermentativo, mediante la preparación de 4 tipos de tratamientos (almidón hidrolizado con nutrientes, almidón sin hidrolizar con nutrientes, almidón hidrolizado sin nutrientes y almidón sin hidrolizar sin nutrientes), a dichos tratamientos se les esteriliza para eliminar los microorganismos que estén presentes en los mismos, posteriormente se siembran los microorganismos y se incuban a las condiciones de proceso (72h a 15,75 rad/s y pH 7), durante ese proceso se realizan muestreos cada 24 horas para analizar el comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el transcurso del tiempo, para finalmente seleccionar las condiciones de proceso a seguir en la fermentación microbiana.

Diagrama 6. Selección de las condiciones del proceso fermentativo



2.4.4 Fermentación. En el **Diagrama 7**, se presenta el proceso llevado a cabo en la fermentación microbiana, en esta fase se realiza la fermentación de la solución de almidón de papa previamente esterilizada, donde se adiciona el 90% de volumen total del fermento y el inóculo con los microorganismos incubados; el inóculo representa el 10% del volumen total del fermento. Durante este proceso fermentativo se mantiene el pH en un valor de 7, esto de acuerdo a las condiciones en las cuales la cepa microbiana debe crecer. Para determinar el rendimiento de la fermentación se determina la concentración de azúcares reductores en muestras tomadas cada 24 horas durante tres días, tiempo en el cual se da por finalizado la fermentación.

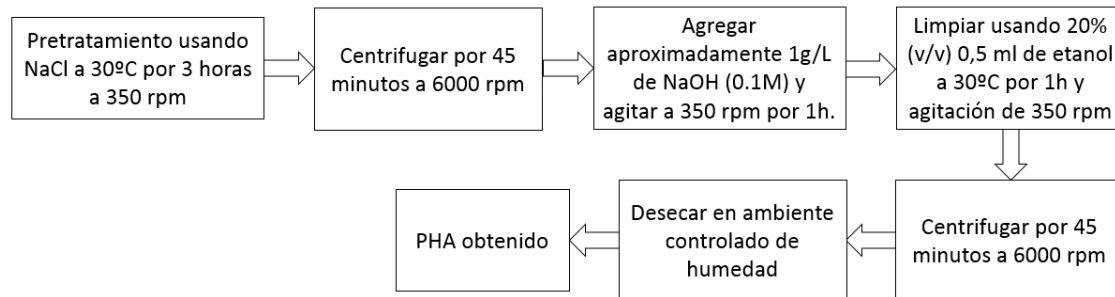
Diagrama 7. Fermentación microbiana



2.4.5 Extracción. En la fase de extracción del PHA obtenido planteada en el **Diagrama 8** las muestras extraídas durante el proceso de fermentación se filtran para separar la muestra de los residuos de almidón que no se fermentaron, posteriormente se da inicio al tratamiento de la muestra cómo se plantea en el artículo “Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2”⁸. Donde plantean la extracción de PHA a partir de un tratamiento con NaCl, NaOH y etanol; de lo cual realizaron 5 experimentos (A, B, C, D y E) con variaciones en las metodologías de tratamiento. De estos experimentos se seleccionaron dos; los experimentos B y C, dado que arrojaron mayores resultados en el proceso de extracción; basado en unas condiciones de proceso al momento de centrifugar con unas velocidades de 350 y 6000 RPM dependiendo del paso que se esté realizando; debido a lo analizado anteriormente se evalúan estos dos experimentos para determinar cuál presenta mejores resultados en cuanto a la cantidad de biomasa extraída y así proceder con la extracción del PHA obtenido.

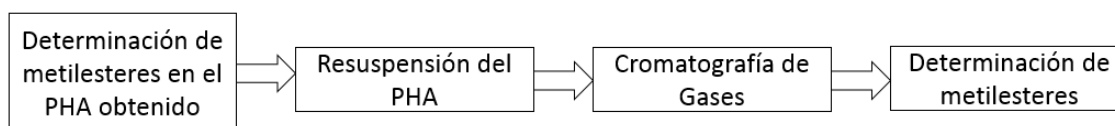
⁸ SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-ASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217> >. [Citado el 23 de noviembre de 2016]

Diagrama 8. Extracción de PHA obtenido



2.4.6 Determinación de metil ésteres en el PHA obtenido. En el Diagrama 9, se establece el procedimiento a realizar una cromatografía de gases para la determinación de metil ésteres presentes en el PHA obtenido, donde previamente se resuspende el PHA en metanol para su dilución y así estar listo para el proceso.

Diagrama 9. Cromatografía de gases: método de detección de metil ésteres del PHA obtenido.



2.5 CARACTERIZACIÓN

2.5.1 pH. La medición del pH se realiza con un pHmetro y/o un papel indicador que mide el potencial de hidrogeno en una solución.

2.5.2 Azúcares reductores y no reductores. Basado en la norma técnica colombiana NTC 1779 la cual tiene por título “Método para determinar azúcares reductores totales expresados como reductores”, se realiza el método utilizando dos diluciones de Fehling A y Fehling B, las cuales producen el ion Cu^{2+} debido al complejo de iones tartrato en medio básico (-OH) de color azul-verdoso a Cu^+ que precipita en forma de Cu_2O rojo ladrillo. Manifestando la presencia de azúcares reductores (aldosas: glucosas, ribosa, eritrosa, etc.), ya que realiza una reacción Redox en el grupo aldehído del azúcar es oxidado a grupo ácido por el Cu^{2+} que se reduce a Cu^+ . Este método utiliza dos diluciones, una que es Fehling A en donde se adiciona $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se disuelve con agua destilada en un balón aforado de 100 ml; Fehling B donde se prepara al 15% sal de Rochelle (Tartrato de sodio y potasio) en solución acuosa al 5% de NaOH. Se prepara una solución de almidón de papa al 0,5% m/v y se realiza una solución de glucosa el 0,5% como patrón en un balón aforado. Se toman 5 ml de las soluciones de reactivos de fehling A y B en

erlenmeyers de 100 ml y se añade 20 ml de agua destilada con 2 o 3 gotas de azul de metileno. En una bureta de 50ml se va adicionando la solución patrón de glucosa mientras la solución de Fehling está en calentamiento y observar igualmente se realizó para la solución de almidón de papa y se observó el cambio en la coloración de azul a rojo ladrillo, como se expresa en la tesis de grado “Evaluación de la síntesis de ácido poliláctico proveniente del suero de quesería a nivel laboratorio” de los autores Laura Cuervo y Julio Echeverry⁹.

2.5.3 Método kjeldahl para la determinación del Porcentaje de nitrógeno. Se realiza la prueba por medio de la norma AOAC 2000, el cual se basa en la determinación del contenido de nitrógeno en muestras orgánicas, en donde se realiza la digestión de una muestra, por medio de la reacción con ácido sulfúrico a altas temperaturas (420°C) y un catalizador, produciendo así, sulfato ácido de amonio NH_4HSO_4 ; luego se hace reaccionar el NH_4HSO_4 con hidróxido de sodio NaOH, donde se da la liberación de amoníaco, el cual por arrastre de vapor de agua produce hidróxido de amonio NH_4OH , este se hace reaccionar con H_3BO_3 para producir $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ y finalmente se titula con HCl al 0,1 M, este proceso se realiza con el indicador tashiro, el fin de la titulación se da cuando la solución a titular pasa de un color verde esmeralda a un color azul. Los cálculos para la determinación del contenido de nitrógeno se realizan por retroceso en las reacciones involucradas en el proceso, usando cálculos estequimétricos.

2.5.4 Temperatura de gelatinización. La prueba se realiza por el método establecido de Grace, 1977. Esta prueba se realiza pesando 10 g de almidón (base seca) para disolverlos en agua destilada en un vaso de precipitado completando a 200 ml, se agita constantemente. Se procede a llevarlo al baño de maría, calentando el agua a una temperatura de 90°C, con un termómetro, se va agitando mientras se observa que la temperatura se mantenga constante en un punto, esperando que se forme una capa de gel en el medio. Se procede a tomar valores.

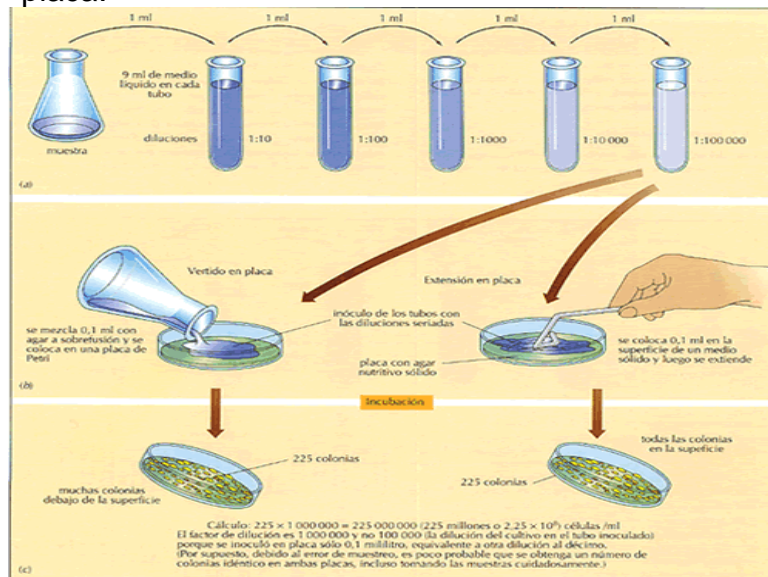
2.5.5 Porcentaje de humedad. Esta prueba se realiza por la norma NTC 572 donde se busca determinar este porcentaje retirando la humedad de la muestra mediante altas temperaturas. Esto se desarrolla pesando las capsulas donde se pondrá la muestra, inicialmente vacías, luego se pesan junto con la muestra y se introducen en un horno a una temperatura aproximada de 100°C. Se dejan ahí el tiempo que se considere necesario hasta que la muestra esté completamente seca. Se retiran las capsulas del horno y se introducen en un desecador esperando que alcancen temperatura ambiente para luego pesarlas y así realizar los respectivos cálculos para obtener el porcentaje de humedad.

⁹ CUERVO GARCÉS, Laura Viviana. ECHEVERRY VARGAS, Julio Cesar. Evaluación de la síntesis de ácido polilactico proveniente del suero de quesería a nivel laboratorio. p50. Trabajo de grado. Fundación Universidad de América. 2016.

2.5.6 Porcentaje de cenizas. La prueba se realiza mediante la norma AOAC 942.05, 2000. Este método proporciona una estimación del material mineral presente en la muestra de almidón incluyendo metales, sales y trazas de elementos. Se procede a pesar alrededor de 5 gr de almidón húmedo en un crisol de porcelana previamente lavado y secado en el horno. Se pesa el crisol inicialmente vacío y luego se pesa el crisol con la muestra, luego se procede a colocar el crisol con la muestra dentro de la mufla a una temperatura de 700°C por 3 horas y media. Transcurrido el tiempo, se coloca en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, luego se pesa el crisol con las cenizas y se realizan los respectivos cálculos y así obtener la cantidad de cenizas presentes expresándolas como porcentaje.

2.5.7 Método de diluciones y conteo en placa. Este método se utiliza para realizar siembra en agar nutritivo de diluciones en agua peptona llegando a un factor de diluciones de 10^5 , posteriormente se realiza el conteo en placa de las Unidades formadoras de colonia (UFC) presentes en cada caja de Petri sembrada; este método se realiza para determinar las diferentes fases y tiempos de crecimiento microbiológico durante el proceso de fermentación, graficando tiempos de muestreo en la fermentación vs. Unidades formadoras de colonia (UFC). Este procedimiento se ilustra en la **Figura 4**.

Figura 5. Método de diluciones para el conteo en placa.



Fuente: Técnicas de Recuento Bacteriano, Universidad Nacional a distancia (UNAD), extraído de: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201504/micro/3_4_3recuento.htm

2.5.8 Método para la determinación de metil ésteres por Cromatografía de gases. Este método utiliza el cromatografo de gases, en donde la muestra se volatiliza, posteriormente se inyecta en la cabeza de una columna cromatografica donde entra en contacto con dos fases, una fase móvil, la cual produce una elución por el flujo de la misma, esta fase móvil es un gas inerte, el cual no interacciona con las moléculas del analito, pues su función es la de transportar el analito a través de la columna; la otra, una fase estacionaria, la cual no se mueve y es la que tiende a retener las sustancias más afines o menos afines a esta fase; de acuerdo a las características químicas de cada sustancia tiene distinta tendencia a ser o no retenida en la columna, esto se traduce a que cada sustancia posee un distinto coeficiente de distribución entre las dos fases, este coeficiente es una medida de la tendencia relativa en que la sustancia queda en una fase o en la otra.

Durante este proceso el PHA obtenido entra en contacto con la fase estacionaria, la cual está fijada la columna, en esta fase, cada sustancia que componga este PHA tendrá una menor o mayor afinidad con la misma. Posteriormente se hace pasar la fase móvil, llamada eluyente, la cual arrastra en mayor grado las sustancias que son menos afines a la fase estacionaria. Para finalmente separar las sustancias que forman el PHA obtenido y enviarlas secuencialmente a un tipo de detector el cual determina y cuantifica cada una de las sustancias que componen el PHA. Todo este proceso se realiza bajo unas condiciones específicas de proceso para el análisis cromatográfico.

2.6 DEFINICIÓN DE PARÁMETROS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la obtención de polihidroxicanoatos, es necesario una fuente de carbono como sustrato para su producción por fermentación microbiana, en este caso el almidón de papa, por tal motivo es necesario realizar el proceso fermentativo es necesario analizar la concentración de sustrato, para determinar la concentración en la cual se produzca mayor rendimiento fermentativo. En dicho proceso se tendrán dos variables experimentales, concentración de sustrato y la adición o no de nutrientes; variables seleccionadas de acuerdo al análisis que se realiza en la selección de las condiciones del proceso fermentativo y lo recomendado en los antecedentes bibliográficos, donde se tendrán en cuenta los resultados experimentales y la influencia que tienen las variables seleccionadas en la variable de principal interés, que es la cantidad de polihidroxicanoatos que produce la cepa microbiana; determinando así la finalización de la fermentación y por medio de la pruebas para determinar la cantidad de PHA producido, el rendimiento del proceso evaluativo.

El diseño experimental planteado, se mantiene como constante la velocidad de agitación (RPM) del medio fermentativo, esto genera un flujo de aire necesario en el proceso de fermentación, debido que la bacteria productora de PHA es una bacteria aerobia que necesita oxígeno para la oxidación del sustrato y la obtención

de energía por parte del microorganismo¹⁰. La velocidad de agitación será de 15,75 rad/s, de acuerdo lo planteado en la tesis “Efecto del gen *fadh1* en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas Putida*”¹¹; este valor se estableció de acuerdo a lo investigado en el antecedente bibliográfico “Evaluación de viabilidad técnico-financiera de la producción de polihidroxicanoatos a partir de ácidos grasos obtenidos en la refinación del aceite de palma en Gradesa S.A. a nivel laboratorio” de los autores Isaza Jácome Angie Catherine y Uscategui Alfonso María del pilar¹², donde se obtuvo la mayor producción de PHA con esta velocidad de agitación.

Previo a la fermentación, se realiza la selección de las condiciones de proceso fermentativo para determinar si el microorganismo a trabajar hidroliza el almidón o no, además, si para el crecimiento microbiano y producción de PHA necesita o no de nutrientes el microorganismo en cuestión; este análisis se plantea con la preparación de 4 tipos de tratamientos (almidón hidrolizado con nutrientes, almidón sin hidrolizar con nutrientes, almidón hidrolizado sin nutrientes y almidón sin hidrolizar sin nutrientes), de concentración de sustrato de 15g/L cada uno (concentración tomada al ser la concentración más alta trabajar en la fermentación); de estos tratamientos se toman muestras cada 24 horas durante 72 horas, para finalmente determinar si el microorganismo necesita o no de hidrólisis de su sustrato y de la adición o no de nutrientes por medio de la determinación y consumo de azúcares reductores en cada muestreo.

Todo lo anteriormente planteado se encuentra en el **Cuadro 7**. Donde se plantea un diseño factorial 2² para la selección de las condiciones de proceso fermentativo.

¹⁰ TORTORA. Gerard j., FUNKE Berdell R., CASE Christine L. Introducción a la microbiología. Capítulo 5: Metabolismo Microbiano. Editorial Médica Panamericana Novena edición. Madrid España 2007. p 123.

¹¹ CASTILLO FRANCO. Diego Armando. Efecto del gen *fadh1* en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas Putida*. p 40. Trabajo de grado (Microbiólogo industrial). Pontificia Universidad Javeriana de Brasil. 2008. Facultad de ciencias. Disponible en: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis219.pdf>>

¹² ISAZA JÁCOME. Angie Catherine. USCATEGUI ALFONSO. María del pilar. Evaluación de viabilidad técnico-financiera de la producción de polihidroxicanoatos a partir de ácidos grasos obtenidos en la refinación del aceite de palma en Gradesa S.A. a nivel laboratorio. p47. Trabajo de grado (Ingeniero químico). Fundación Universidad de América. 2014.

Cuadro 7. Selección de condiciones de proceso fermentativo.

Concentración de sustrato (g/L)	Adición al sustrato	Tratamiento del sustrato
15	Nutrientes	Hidrolizado
	Sin Nutrientes	
	Nutrientes	Sin Hidrolisis
	Sin Nutrientes	

Posteriormente se realizara la fermentación microbiana, donde la primera variable independiente será la concentración de sustrato que tendrá tres valores, 5g/L, 10g/L y 15 g/L de sustrato; estas concentraciones se seleccionaron de acuerdo a lo analizado en el trabajo de grado “Evaluación de viabilidad técnico-financiera de la producción de polihidroxicanoatos a partir de ácidos grasos obtenidos en la refinación del aceite de palma en Gradesa S.A. a nivel laboratorio” de los autores Isaza Jácome Angie Catherine y Uscategui Alfonso María del pilar¹³, donde se analizaron concentraciones de 1, 5 y 10 g/L, en cuanto a los resultados encontrados determinaron que la mejor concentración de sustrato fue de 5 g/L en donde el microorganismo tuvo mayor crecimiento, por tal motivo se decidió tomar esta concentración como uno de los tres valores para la primera variable independiente, las otras dos concentraciones fueron escogidas para evaluar el crecimiento microbiano y la producción de PHA con un sustrato de mayor concentración. A dichas concentraciones se le realizaran los tratamientos que presenten mejores resultados en la selección de las condiciones de proceso fermentativo.

La segunda variable independiente será la adición o no de nutrientes al sustrato, de acuerdo a lo realizado en el trabajo de grado “Estudio de la producción de Polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* utilizando glicerol como fuente de carbono” de la autora Banacore Analia¹⁴, donde se plantea añadir diferentes nutrientes como Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (NH₄)₂SO₄ en las siguientes concentraciones 4,45 g/L, 1,5 g/L y 1 g/L respectivamente, para mejorar el crecimiento microbiano de la *Bacillus subtilis* durante el proceso de producción de PHA. La selección de las variables independientes mencionadas se hará con el fin de evaluar la mejor combinación las mismas para una mayor producción de PHAs.

¹³ ISAZA JÁCOME. Angie Catherine. USCATEGUI ALFONSO. María del pilar. evaluación de viabilidad técnico-financiera de la producción de polihidroxicanoatos a partir de ácidos grasos obtenidos en la refinación del aceite de palma en Gradesa S.A. a nivel laboratorio. p47. Trabajo de grado (Ingeniero químico). Fundación Universidad de América. 2014.

¹⁴ BANACORE Analia. Estudio de la producción de Polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* Utilizando glicerol como fuente de carbono. p. 27. Tesis de grado (Licenciatura en Biología opción Biotecnología). Universidad de la República de Uruguay. Facultad de ciencias. Disponible en repositorio institucional de la Universidad de la República de Uruguay colección digital. <<https://www.colibri.udelar.edu.uy/>>

Todo lo anteriormente planteado se encuentra en el **Cuadro 8**. Donde se plantea las variables independientes para el proceso de fermentación.

Cuadro 8. Variables a trabajar en la fermentación.

Concentración de sustrato (g/L)	Adición al sustrato
5	Nutrientes
	Sin Nutrientes
10	Nutrientes
	Sin Nutrientes
15	Nutrientes
	Sin Nutrientes

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se evidencia el trabajo realizado a nivel laboratorio hasta la caracterización del PHA obtenido, demostrando así el proceso en cada fase y los hallazgos presentados en la fase de trabajo de las mismas.

3.1 ACONDICIONAMIENTO DEL ALMIDÓN DE PAPA

Para el acondicionamiento del almidón de papa, se realizan diferentes procesos de pretratamiento para que el almidón esté en condiciones para su caracterización y su posterior fermentación; inicialmente se seca el residuo de almidón de papa en el horno a 103°C durante 4 horas para la eliminación de agua presente en el mismo. A continuación se realiza el proceso de molienda donde se utiliza un mortero para disminuir el tamaño de partícula para posteriormente pasarlo por tamices para tener un tamaño de partícula uniforme, donde se pasa a dos procesos mencionados a continuación:

El primero es el autoclavado del almidón para la eliminación de los microorganismos presentes en el mismo; este proceso se realiza en una autoclave para esterilizarlo durante 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión, finalizado este proceso el almidón está listo para el proceso de fermentación.

En cuanto al segundo proceso mencionado después del tamizado del almidón es la caracterización del mismo, proceso realizado para aportar datos para el inicio de la fermentación. Para esto se realizan diferentes determinaciones como humedad y cenizas, azúcares reductores y no reductores, porcentaje de nitrógeno, pH y acidez y temperatura de gelatinización; estas determinaciones se encuentran detalladas en el ítem de caracterización del capítulo 2 materiales y métodos de este trabajo de grado.

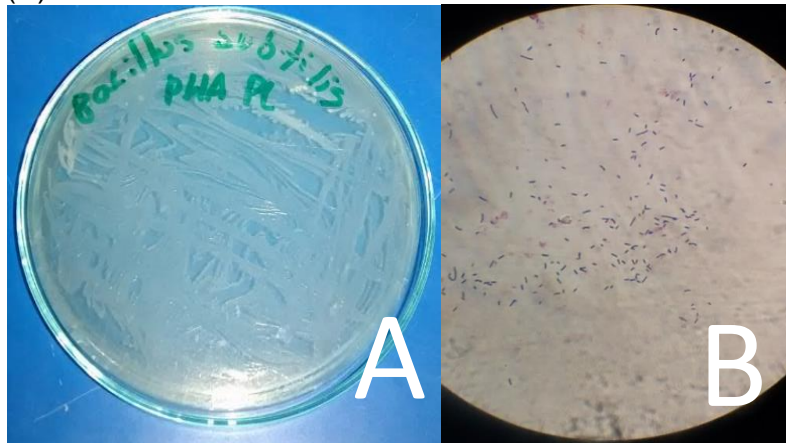
3.2 ACTIVACIÓN, CULTIVO E INÓCULO MICROBIANO

Para la activación de la cepa microbiana suministrada por el Centro de Gestión Industrial SENA, sede Paloquemao – Bogotá, se prepara una solución de agar nutritivo para realizar una siembra en 2 cajas de Petri por lo que se pesa 0,46 g de agar nutritivo y se adicionan 20 ml de agua destilada en frasco de tapa azul de 250 ml, se estabiliza en plancha de termoagitación, luego se esteriliza en una autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Se adiciona la solución de agar en las cajas de Petri esterilizadas, se espera a que se gelifique el agar en las cajas, se siembra con asa el microorganismo por agotamiento por estría el cual fue entregado en estado de aislamiento (procedimiento realizado en cabina de bioseguridad) y se incuba durante 48h a 36°C.

Pasadas las 48 horas de activar los microorganismos (véase **imagen 2**) se analiza la morfología del microorganismo como se observa en la **imagen 2** y se determina

la pureza del cultivo si es necesario una siembra adicional para tener la cepa aislada.

Imagen 2. *Bacillus subtilis*, cepa activada (A) y su morfología posterior de la realización de tinción de Gram (B).



Posteriormente se realiza el inóculo, mediante la preparación de soluciones de almidón de papa de 5 ml cada una, volumen determinado para ser el 10% de los fermentos, los cuales tendrán un volumen total de 500 ml cada uno; a los inóculos se esterilizan en autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos, posteriormente se realiza la medición del pH, si este no está en pH 7 se realiza la neutralización de los mismos con la adición de carbonato de calcio hasta neutralizar el pH; al tener los inóculos esterilizados y neutralizados se les adiciona los microorganismos incubados, para finalmente incubarlos en agitador orbital durante 48 horas a 36°C y 15,75 rad/s, el inóculo es realizado con el fin de adaptar el microorganismos y tener una concentración inicial de microorganismos en la fermentación se realiza antes de iniciar la fermentación.

3.3 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO

Antes de iniciar la fermentación se realiza una selección de condiciones de proceso fermentativo para determinar el comportamiento del microorganismo con almidón estéril hidrolizado (procedimiento realizado con hidrólisis acida con ácido sulfúrico) y estéril sin hidrolizar. Adicionalmente si es necesario, la adición de nutrientes al sustrato como se plantea en el trabajo de grado “Estudio de la producción de Polihidroxiclcanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* utilizando glicerol como fuente de carbono” de la autora Banacore Analia¹⁵, donde se evalúa la adición de nutrientes

¹⁵ BANACORE Analia. Estudio de la producción de Polihidroxiclcanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* Utilizando glicerol como fuente de carbono. p. 41. Tesis de grado (Licenciatura en Biología opción

como Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 (NH_4) $_2\text{SO}_4$ en las siguientes concentraciones 4,45 g/L, 1,5 g/L y 1 g/L respectivamente, para evaluar el crecimiento microbiano durante el proceso y la producción de PHA; en esta referencia bibliográfica utilizaron una cepa microbiana (*Bacillus sp.*), de la misma familia a la utilizada en el presente trabajo de grado (*Bacillus subtilis.*); adicionalmente a estos dos tipos de tratamientos se realizan dos más sin nutrientes con almidón estéril hidrolizado y almidón estéril sin hidrolizar.

Para todos los tipos de tratamientos, se tomaron muestras cada 24 horas durante 3 días, para determinar la concentración de azúcares reductores por DNS en cada muestreo y así determinar si el microorganismo hidroliza el almidón o no; además de establecer las condiciones de proceso a seguir en la fermentación. Lo anteriormente mencionado se encuentra en el **Cuadro 7** del capítulo 2, ítem definición de parámetros y diseño experimental.

Los resultados de las determinación de azúcares reductores por DNS, se plantean en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Absorbancia a 575nm y concentración de azúcares reductores (g/L), muestras de la selección de condiciones del proceso fermentativo.

Horas	Ítem	HN	SHN	HSN	SHSN
0	(a)	0,206	1,000	0,131	0,062
	(b)	0,415	2,003	0,265	0,127
24	(a)	0,267	1,322	0,120	0,153
	(b)	0,537	2,647	0,243	0,309
48	(a)	0,194	0,802	0,118	0,104
	(b)	0,391	1,607	0,239	0,211
72	(a)	0,261	0,720	0,127	0,101
	(b)	0,525	1,443	0,257	0,205

(a) Absorbancia a 575nm

(b) Concentración de azúcares reductores (g/L)

Los datos planteados en la **Tabla 1** están plasmados en las **Gráfica 1** del capítulo 4, dichos datos se obtuvieron usando la curva de calibración de DNS planteada en el **ANEXO C**.

Biotecnología). Universidad de la República de Uruguay. Facultad de ciencias. Disponible en repositorio institucional de la Universidad de la República de Uruguay colección digital. < <https://www.colibri.udelar.edu.uy/>>

3.4 FERMENTACIÓN

Finalizando la selección de las condiciones de proceso fermentativo, se inició la fermentación con las condiciones de sustrato de almidón sin hidrolizar, con nutrientes y sin nutrientes, donde las concentraciones a trabajar son 5, 10 y 15 g/L anteriormente mencionadas en la definición de parámetros y diseño experimental. Se colocaron 6 erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con 500 ml de fermento cada uno, estos son llevados a un agitador orbital como se ve en la **Imagen 3**, a 35°C, 15,75 rad/s y a un pH de 7 durante 72 horas, en las cuales se tomaron muestras de 1 ml cada 24 horas a cada erlenmeyer.

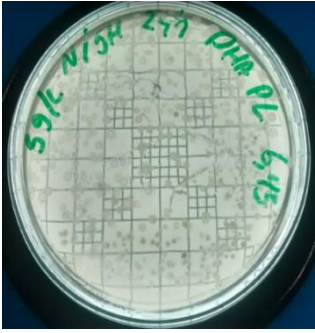
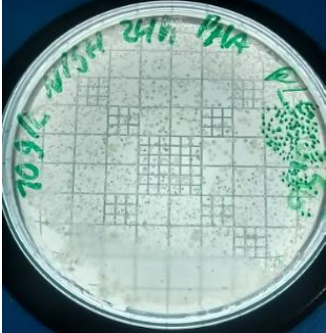
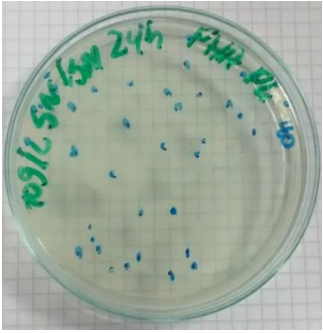
Imagen 3. Fermentación microbiana en agitador orbital.



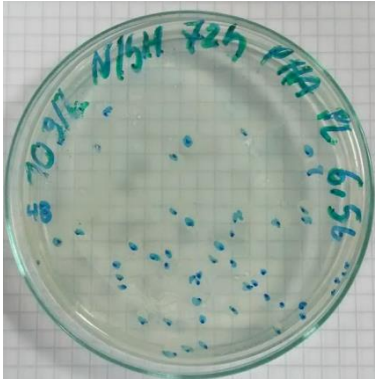

Se preparan 6 tubos de ensayo con 9 ml de solución agua peptona, para realiza diluciones de las muestras tomadas y sembrar en cajas de Petri, para realizar conteo en placa de cada una de las muestras. Para iniciar este proceso, se adiciona en un primer tubo, 1 ml de las muestras extraídas, se agita en un mezclador para homogenizar la muestra, seguidamente, se toma 1 ml del tubo homogenizado y se añade a un nuevo tubo de ensayo con solución de agua peptona, se agita de nuevo en un mezclador; este procedimiento se realiza consecutivamente en los 4 tubos de ensayo restantes. Se toman 100 μ l con una micropipeta del último tubo donde se hizo la última dilución y se añade a una caja de Petri con agar nutritivo estéril, en la cual se realiza un esparcimiento por toda la caja utilizando una rastrillo de vidrio y se lleva a una incubadora por 24 horas; pasado este tiempo, se procede a hacer el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC); proceso que se repite cada 24 horas con las muestras tomadas de cada uno de los fermentos, las diluciones finales son de 10^5 . El procedimiento anteriormente mencionado se realizó en la cabina de bioseguridad.

Los resultados del crecimiento microbiano en las cajas de Petri durante la fermentación, se evidencian en el **Cuadro 1** del **ANEXO B**, así como la evidencia fotográfica del conteo en placa en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Conteo en placa del crecimiento microbiano durante el proceso fermentativo en los tiempos de 24h y 72h.

Tiempo	Descripción	Imagen
24 horas	Conteo en cajas de Petri concentración de sustrato 5g/L sin hidrolizar con nutrientes.	
	Conteo en cajas de Petri concentración de sustrato 10g/L sin hidrolizar con nutrientes.	
24h	Conteo en cajas de Petri concentración de sustrato 10g/L sin hidrolizar sin nutrientes.	

Cuadro 9. (Continuación)

Tiempo	Descripción	Imagen
72 horas	Conteo en cajas de Petri concentración de sustrato 10g/L sin hidrolizar con nutrientes.	 A Petri dish with a grid background. The lid is marked with green ink: "10g/L N/5M 72h P/1A PL 6.56". The agar surface shows several small, blue, circular bacterial colonies scattered across the plate.
72 horas	Conteo en cajas de Petri concentración de sustrato 15g/L sin hidrolizar con nutrientes.	 A Petri dish with a grid background. The lid is marked with green ink: "15g/L N/5M 72h P/1A PL 6.5 128". The agar surface shows a higher density of small, blue, circular bacterial colonies compared to the 10g/L dish.

Además durante la fermentación se realizaron la prueba de DNS para azúcares reductores, para determinar la hidrólisis y el consumo de almidón con nutrientes y sin nutrientes por el microorganismo, tomando de cada fermentador en un tubo de ensayo, 3 ml de muestra y realizando las mediciones cada 24 horas en las **Tablas 2 y 3**, se puede ver el seguimiento de la concentración de azúcares reductores en cada muestra y ver el consumo de sustrato del microorganismo para determinar el rendimiento de la fermentación a las 72 horas.

Tabla 2. Absorbancia a 575nm y concentración de azúcares reductores (g/L), muestras de cada concentración de almidón sin hidrolizar con nutrientes en la fermentación.

Horas	Ítem	Muestra 5g/L	Muestra 10g/L	Muestra 15g/L
0	(a)	0,023	0,078	0,156
	(b)	0,049	0,159	0,315
24	(a)	0,034	0,092	0,202
	(b)	0,071	0,187	0,407
48	(a)	0,030	0,068	0,156
	(b)	0,063	0,139	0,315
72	(a)	0,014	0,087	0,148
	(b)	0,031	0,177	0,299

(a) Absorbancia a 575nm.

(b) Concentración de azúcares reductores (g/L).

Tabla 3. Absorbancia a 575nm y concentración de azúcares reductores (g/L), muestras de cada concentración de almidón sin hidrolizar sin nutrientes en la fermentación.

Horas	Ítem	Muestra 5g/L	Muestra 10g/L	Muestra 15g/L
0	(a)	0,008	0,086	0,092
	(b)	0,019	0,175	0,187
24	(a)	0,011	0,099	0,113
	(b)	0,025	0,201	0,229
48	(a)	0,022	0,125	0,145
	(b)	0,047	0,253	0,293
72	(a)	0,008	0,124	0,098
	(b)	0,019	0,251	0,199

(a) Absorbancia a 575nm.

(b) Concentración de azúcares reductores (g/L).

Los datos planteados en las **Tablas 2 y 3** están plasmados en las **Gráficas 2, 3 y 4** del capítulo 4, dichos datos se obtuvieron usando la curva de calibración de DNS planteada en el **ANEXO C**.

Los rendimientos de la fermentación fueron determinados a partir de la siguiente **ecuación 1**:

Ecuación 1. Rendimiento de la fermentación.

$$Y_{x/s} = \frac{AR_M - AR_m}{\text{concentración de almidón}}$$

ARM: Concentración mayor de Azucares reductores

ARm: Concentración menor de Azucares reductores

Yx/s: rendimiento de la fermentación.

Los resultados se presentan en la **Tabla 4**; dichos rendimientos están en función de los azucares reductores consumido (Yx/s) para cada uno de los fermentos. En el cual el mayor rendimiento de biomasa (0,008 g azucares reductores consumidos/g de almidón) se obtuvo para la concentración 5 g/L de almidón de papa en el medio de cultivo.

Tabla 4. Rendimientos de la fermentación, en función de los azucares consumidos.

Concentración de sustrato (g/L)	Tratamiento al sustrato	Yx/s (g/g)
5	SHN	0,0080
10		0,0010
15		0,0072
5	SHSN	0,0056
10		0,0002
15		0,0063

3.5 EXTRACCIÓN

Terminada la fermentación se procede a realizar la extracción del PHA obtenido donde se tiene en cuenta el proceso de extracción con NaCl, NaOH y etanol¹⁶.

En dicho artículo se analizan 5 experimentos con los mismos reactivos (A, B, C, D y E) pero con procedimientos diferentes y de los cuales 2 de los 5 presentaron mejores resultados en cuanto a pureza (B=97% y C=95,1%). Por tal motivo se

¹⁶ SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-ASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from Cupriavidus necator recombinant harboring the PHA synthase of Chromobacterium sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217> >. [Citado el 23 de noviembre de 2016]

realiza un análisis de estos dos experimentos con los fermentos de 10 y 15 g/L sin hidrolizar sin nutrientes y tiempo de fermentación 72 horas, realizando réplicas de extracción de cada uno de estos fermentos para los dos experimentos, donde se comparan de acuerdo al peso de biomasa extraída y los mejores resultados entre experimentos y concentración de sustrato se encuentran subrayados y estos resultados se plasma en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resultados de la extracción con los dos experimentos propuestos en muestras sin hidrolizar sin nutrientes.

Concentración sustrato	Replica	Experimento	Peso de Biomasa (g)
10 g/L	1	B	<u>0,0148</u>
		C	0,0051
	2	B	0,0402
		C	<u>0,071</u>
15 g/L	1	B	0,0341
		C	<u>0,0739</u>
	2	B	0,0532
		C	<u>0,0699</u>

Según lo presentado anteriormente se realizó el proceso de extracción de los fermentos, tomando 20ml de muestras de 24, 48 y 72 horas de las diferentes concentraciones planteadas en la fermentación y se procede a pesar cada una de las muestras en los tubos cónicos para determinar la cantidad de biomasa a la cual se le realizara el proceso extractivo, dichos resultados se encuentran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Cantidad de biomasa utilizada en el proceso extractivo.

Muestras de fermentos		Peso biomasa (g)	
5 g/L	Sin hidrolizar, con nutrientes	24h	20,9457
		48h	20,6161
		72h	19,2445
10 g/L		24h	20,7205
		48h	20,234
		72h	20,6912
15 g/L		24h	18,9072
		48h	20,2955
		72h	19,5687

Tabla 6. (Continuación)

Muestras de fermentos		Peso biomasa (g)	
5 g/L	Sin hidrolizar, sin nutrientes	24h	18,5254
		48h	20,3055
		72h	22,4906
10 g/L		24h	19,2235
		48h	20,1677
		72h	20,8911
15 g/L		24h	20,8312
		48h	20,9852
		72h	20,1025

El proceso extractivo se realiza inicialmente una centrifugación en tubos cónicos de las muestras durante 30min a 6000 RPM, se elimina el sobrenadante y se prosigue con el tratamiento de los pellets con el experimento C, planteado en el artículo anteriormente nombrado. En dicho proceso se realiza un pretratamiento del pellet con una solución de cloruro de sodio de 8g/L, concentración escogida según los resultados planteados en el artículo “Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2”¹⁷. Donde se realizaron pruebas de extracción de P(3HB-co-3HHx) con concentraciones de cloruro de sodio de 2, 4, 6, 8 y 10 g/L, y donde se evidenció en la cromatografía de gases que el PHA obtenido con mayor pureza, este fue el que se extrajo con concentración de cloruro de sodio de 8 g/L, por tal motivo se procedió con el pretratamiento de los pellets con 5ml a cada uno de la solución de cloruro de sodio 8g/L.

Posteriormente a dicho pretratamiento se centrifugan las muestras por 45 min a 6000RPM, luego se adiciona aproximadamente 1g/L de hidróxido de sodio de concentración 0,1 M a los tubos cónicos y se agita a 300 RPM por 1 h. Véase **imagen 4**.


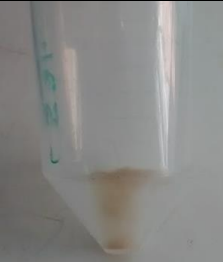
¹⁷ SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-ASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217> >. [Citado el 23 de noviembre de 2016]

Imagen 4. Muestra posterior a la adición de hidróxido de sodio.



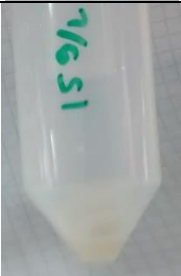
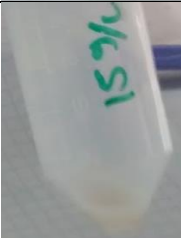


A continuación se limpia la mezcla usando etanol al 20% v/v, adicionando 5ml de dicha solución y mantener en agitación a 30°C y 300 RPM por 1 hora, finalmente se centrifugan las muestras por 45 min a 6000 RPM, eliminando el sobrenadante, donde se observa que el pellet extraído presenta una coloración amarilla y finalmente se procede con la caracterización del PHA obtenido. Véase **Cuadro 10**.

Cuadro 10. Muestras de PHA extraído a las 72 horas del proceso fermentativo.

Tiempo	Descripción	Imagen
72 horas	PHA extraído de muestra 5g/L SHN	
	PHA extraído de muestra 5g/L SHSN	

Cuadro 10. (Continuación)

Tiempo	Descripción	Imagen
72 horas	PHA extraído de muestra 10g/L SHN	
	PHA extraído de muestra 10g/L SHSN	
	PHA extraído de muestra 15g/L SHN	
	PHA extraído de muestra 15g/L SHSN	

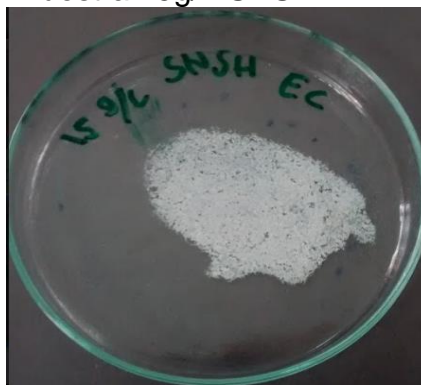
Finalizado el proceso de extracción del PHA se realiza la cuantificación del pellet extraído para comparar posteriormente la cantidad de pellet extraído en cada una de las muestras tomadas de los diferentes fermentos, resultados que se encuentran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cantidad de pellet extraído en cada muestra de fermento.

Muestras de fermentos		Peso pellet extraído (g)	
5 g/L	Sin hidrolizar, con nutrientes	24h	0,0207
		48h	0,0559
		72h	0,0164
10 g/L		24h	0,0295
		48h	0,0814
		72h	0,1127
15 g/L		24h	0,058
		48h	0,0932
		72h	0,035
5 g/L	Sin hidrolizar, sin nutrientes	24h	0,0063
		48h	0,0232
		72h	0,0585
10 g/L		24h	0,1305
		48h	0,1501
		72h	0,0573
15 g/L		24h	0,4309
		48h	0,0269
		72h	0,1241

El PHA obtenido se le adiciona 1,5ml de metanol y se traslada a una caja de Petri y se deja evaporar el metanol en desecador, obteniendo así el PHA. Véase **imagen 5**.

Imagen 5. PHA seco de muestra 15g/L SHSN 72h.



Para determinar el porcentaje de pellet extraído con respecto a la biomasa utilizada para este proceso de extracción por medio de la **ecuación 2**:

Ecuación 2. Porcentaje de pellet extraído.

$$\% \text{ pellet extraído} = \frac{AR_M - AR_m}{\text{concentración de almidón}} \times 100$$

ARM: Concentración mayor de Azúcares reductores

ARm: Concentración menor de Azúcares reductores

Esta ecuación fue aplicada a los resultados obtenidos de cada uno de los fermentos de 5, 10 y 15 g/L en sus respectivos muestreos y se determinó el porcentaje de pellet extraído como se ve en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Cantidad de pellet extraído en cada muestra de fermento.

Muestras de fermentos			Porcentaje pellet extraído (%)
5 g/L	Sin hidrolizar, con nutrientes	24h	0,10
		48h	0,27
		72h	0,09
10 g/L		24h	0,14
		48h	0,40
		72h	0,54
15 g/L		24h	0,31
		48h	0,46
		72h	0,18
5 g/L	Sin hidrolizar, sin nutrientes	24h	0,03
		48h	0,11
		72h	0,26
10 g/L		24h	0,68
		48h	0,74
		72h	0,27
15 g/L		24h	0,48
		48h	0,13
		72h	0,62

3.6 CARACTERIZACIÓN DEL PHA OBTENIDO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para esta fase, se hace necesario resuspender y filtrar los pellets obtenidos, para esto se adiciona 1,5ml de metanol a cada uno, luego se agitan en el mezclador para homogenizar las muestras, se filtra las muestras homogenizadas para tener una muestra apta para el proceso de determinación de metil ésteres por cromatografía de gases acoplado a masas como se ve en la **imagen 6**.

Imagen 6. Resuspensión del PHA extraído.



Posteriormente se filtra la resuspensión con un filtro de 45 μ m y con ayuda de una jeringa se vierte la resuspensión filtrada a un vial de 2ml, dicha muestra se coloca en el rack del cromatografo de gases acoplado a masas en el orden que se muestra en **ANEXO D**.

Para realizar la determinación de metil ésteres por cromatografía de gases se establecieron las condiciones de proceso según el trabajo de grado “Producción de un polímero tipo PHA empleando residuos de la industria de biodiesel” de la autora Becerra Jiménez Mónica Liliana¹⁸ y de las cuales se realizaron variaciones a la rampa de calentamiento debido a la naturaleza desconocida de la muestra resultante del proceso fermentativo, dichas condiciones se observan en el **Cuadro 11**.

¹⁸ BECERRA JIMÉNEZ Mónica Liliana. Producción de un polímero tipo PHA empleando residuos de la industria de biodiesel. ANEXO B. Anexo Protocolos experimentales. B-8 CROMATOGRAFÍA DE GASES Tesis de grado (Magister en Ciencias Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Facultad de ciencias. Disponible en < <http://www.bdigital.unal.edu.co/10715/1/01186471.2013.pdf> >.

Cuadro 11. Condiciones de proceso determinación de metil ésteres por cromatografía de gases¹⁸.

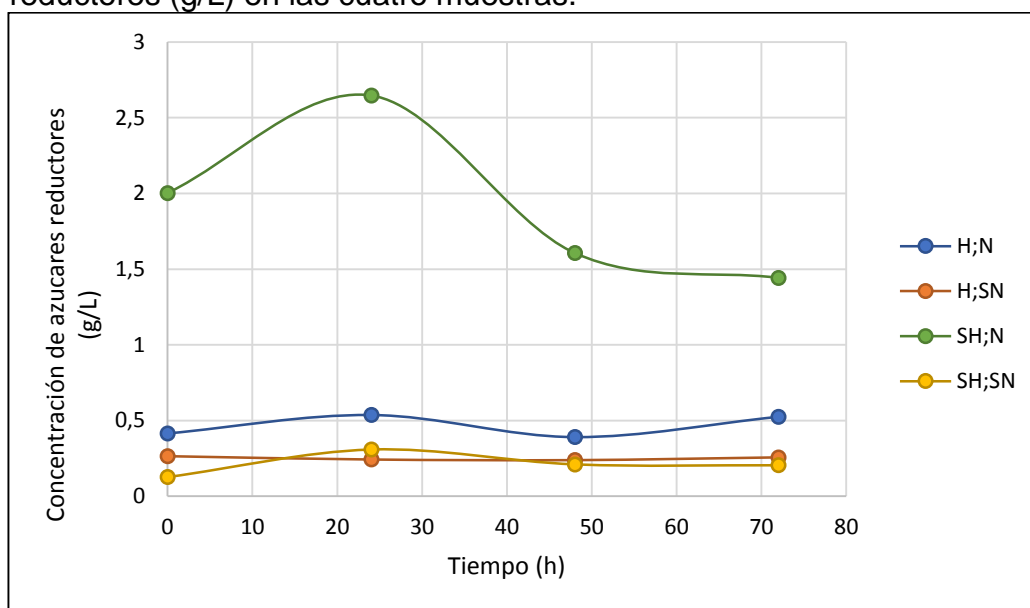
Condiciones de proceso	Características
Gas de arrastre:	Helio (3 mL/min), flujo establecido a temperatura ambiente.
Inyector:	200°C isotérmico.
Detector (MS):	espectrofotómetro de masas, 250°C
Columna:	db-5 Columna 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm.
Temperatura inicial:	100°C por 5 minuto.
Rampa de calentamiento	Aumento 20 °C/min hasta 300°C y mantiene por 5 min.
Volumen de inyección:	Split 10:1; 1 µL a 220°C.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PROCESO FERMENTATIVO

Se realizó la selección de las condiciones del proceso fermentativo para determinar si el microorganismo, hidroliza o no el almidón; para esto se prepararon 4 muestras de almidón con los siguientes tratamientos, hidrolizado con nutrientes, almidón sin hidrolizar con nutrientes, almidón hidrolizado sin nutrientes y almidón sin hidrolizar sin nutrientes, con concentraciones de sustrato de 15g/L cada una; a dichas muestras se le realizaron muestreos cada 24 horas durante 72 horas para realizar determinación de azúcares reductores por DNS, dichos resultados se plantean en las **Tablas 1 y 2** del capítulo 3.

Gráfica 1. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en las cuatro muestras.



En la **Gráfica 1**, se observa el comportamiento de la concentración de los azúcares reductores durante el tiempo de muestreo, en el cual se presenta una mayor hidrólisis del almidón por parte del microorganismo en la muestra de almidón sin hidrolizar con la adición de nutrientes, donde aumenta la concentración de azúcares reductores hasta las 24 horas, posteriormente, disminuye hasta las 48 horas y manteniéndose constante hasta finalizar el proceso; denotando así el consumo de los azúcares reductores después de las 24 horas de proceso. Este comportamiento es similar en la muestra de almidón sin hidrolizar y sin la adición de nutrientes, pero con concentraciones de azúcares reductores menores durante los muestreos; en

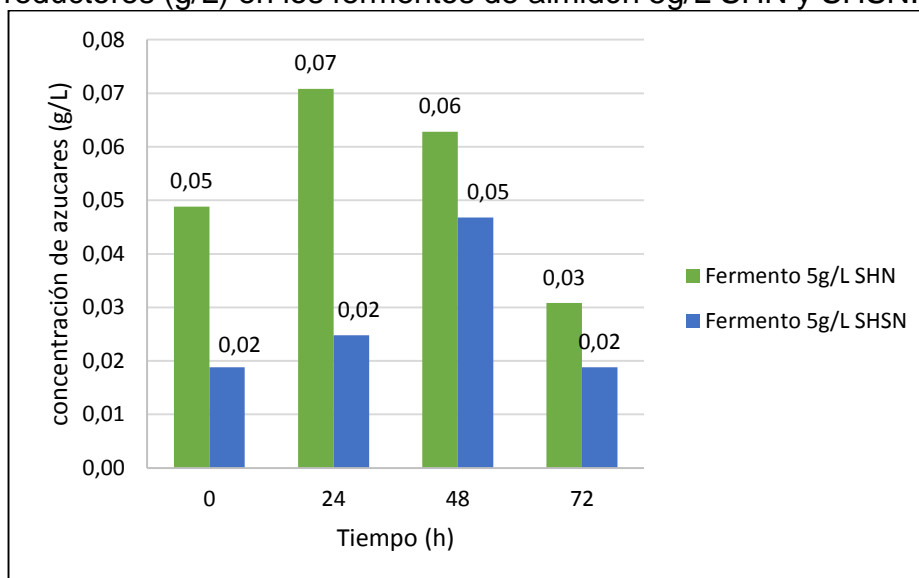
cuanto a las muestras en las cuales se hidrolizo previamente el almidón con y sin adición de nutrientes, el consumo de los azúcares reductores por parte del microorganismo no tuvo gran variación durante los muestreos, esto determina que la neutralización de la acidez presentada durante la hidrolisis del almidón por medio de la adición de carbonato de calcio, pudo inhibir el consumo de estos azúcares, generando que estas condiciones de proceso no fueran las indicadas para realizar la fermentación.

De acuerdo a lo analizado en la **Gráfica 1**, se decidió iniciar el proceso fermentativo con dos tipos de tratamiento, el primero es el montaje de fermentadores de las concentraciones de almidón planteadas en el diseño de experimentos de almidón sin hidrolizar con nutrientes y el segundo montaje de fermentadores con almidón sin hidrolizar y sin la adición de nutrientes, esta selección se dio debido al comportamiento del microorganismo en dichas estas muestras, donde se generando los resultados que se esperan en el proceso de consumo de los azúcares reductores presentes en el sustrato tratado, el cual es la hidrolisis del almidón por la cepa microbiana y posteriormente la disminución de la concentración de estos azúcares, por medio de la metabolización del sustrato por parte del microorganismo para la obtención de PHA.

4.2 FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO

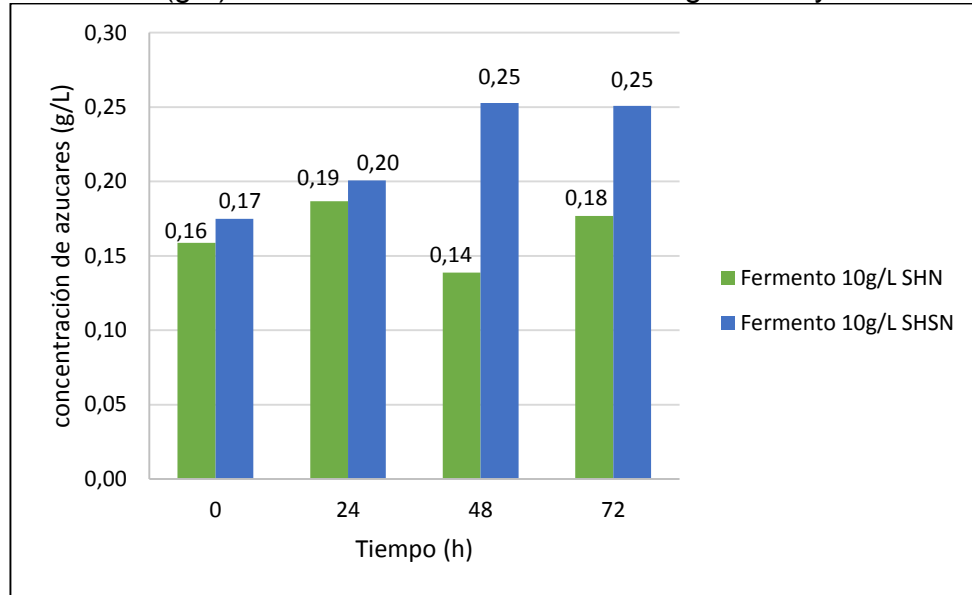
Se da inicio a la fermentación con los dos tipos de tratamientos en las tres concentraciones de almidón planteadas. Durante el proceso se tomaron muestras cada 24 horas de la misma manera en que se realizó en el proceso evaluativo en la pre-fermentación para determinar la concentración de azúcares reductores por espectrofotometría utilizando el método de DNS y realizar el seguimiento de los mismos; los resultados de dichas determinaciones se encuentran en las **Tablas 2 y 3** del capítulo 3, donde se comparan los datos obtenidos de acuerdo a lo analizado en las **Gráficas 2, 3 y 4**, determinado así cuál de los tratamientos tuvo mayor rendimiento en el tiempo final establecido de fermentación en correlación a la concentración de sustrato inicial y el consumo del mismo.

Gráfica 2. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en los fermentos de almidón 5g/L SHN y SHSN.



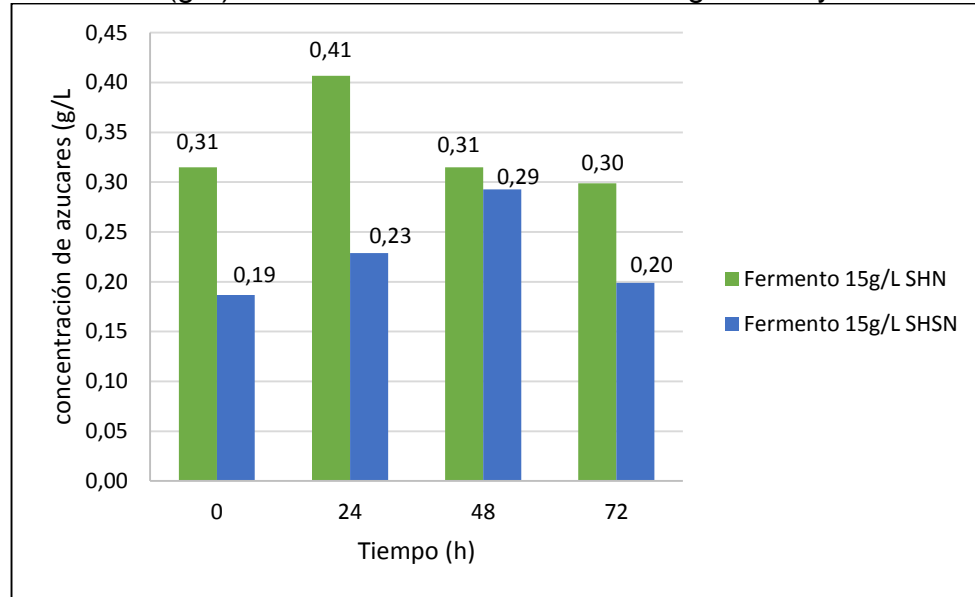
En la **Gráfica 2**, se observa el comportamiento de la concentración de azúcares reductores basado en los dos tratamientos realizados, sin hidrólisis y con nutrientes (SHN), y el otro tratamiento sin hidrólisis y sin nutrientes (SHSN), durante el proceso de fermentación en los fermentos de 5 g/L SHN y SHSN, donde se observa que el microorganismo inició hidrolizando el sustrato hasta las 24 horas en el fermento de 5g/L SHN y en el fermento de 5g/L SHSN hasta las 48 horas de proceso; esto indica que con el aporte de nutrientes al sustrato el microorganismo puede hidrolizar el almidón en menor tiempo que sin el aporte de nutrientes. En cuanto al consumo de los azúcares reductores producto de la hidrólisis de almidón por el microorganismo comparando entre las 72 horas de proceso y el inicio del mismo, se evidencia mayor consumo de los mismos en el fermento al que se le añadió nutrientes ya que se determinó una concentración de azúcares reductores de 0,05g/L en el tiempo 0 y 0,03g/L a las 72 horas de proceso, esto identifica un consumo neto de azúcares reductores en el proceso del 36,88% en dicho fermento; mientras que en el fermento al que no se le añadió nutrientes este consumo neto de azúcares reductores en el proceso fue de 0%. Esto determinó la importancia de la adición de nutrientes que limiten el nitrógeno como nutriente al microorganismo para conducirlo a la producción de PHA.

Gráfica 3. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en los fermentos de almidón 10g/L SHN y SHSN.



En cuanto a los fermentos de concentración de 10g/L se observa en la **Gráfica 3** que el comportamiento de la concentración de azúcares reductores durante la fermentación fue diferente al presentado en los fermentos de concentración de 5g/L de sustrato. En las determinaciones de azúcares reductores en los fermentos presentados, se observa que la concentración de dichos azúcares aumenta hasta las 24 horas en el fermento de 10g/L SHN y en el de 10g/L SHSN presenta un aumento hasta las 48 horas del proceso fermentativo; posteriormente en el fermento de SHN presenta un decrecimiento en las 48 horas y un crecimiento en las 72 horas el cual no supera a la concentración reportada en el muestreo de las 24 horas de proceso. Estos resultados indican que el microorganismo debería necesitar de mayor tiempo de fermentación para la hidrolizar el almidón, además de observar con claridad resultados de consumo neto de azúcares reductores para la producción de PHA.

Gráfica 4. Tiempo de muestreo (h) vs. Concentración de azúcares reductores (g/L) en los fermentos de almidón 15g/L SHN y SHSN.



El comportamiento de la concentración de azúcares reductores durante el tiempo fermentación se evidencia en la **Gráfica 4**, se observa el aumento de dicha concentración hasta el muestreo de 24 horas en la muestra de 15g/L SHN y en la muestra de 15g/L SHSN hasta el muestreo de 48 horas; este aumento en la concentración de azúcares reductores hasta esos tiempos, identifica la hidrólisis del sustrato por parte del almidón. En cuanto a la concentración de dichos azúcares en el muestro de 72 horas con respecto a la presentada al inicio de la fermentación en el fermento SHN presento una disminución del 5,08% de la concentración de azúcares reductores presentada al inicio del proceso fermentativo, y en el fermento SHSN no presenta una disminución de la concentración de azúcares reductores comparando el final de la fermentación con el inicio de la misma, esto debido a que el microorganismo necesito de mayor tiempo sin nutrientes para la hidrólisis del almidón e inicio del consumo de los azúcares reductores resultantes de dicha hidrólisis.

Para determinar el porcentaje de pellet extraído con respecto a la biomasa utilizada para este proceso de extracción por medio de la **ecuación 3**:

Ecuación 3. Porcentaje Consumo de azúcares reductores.

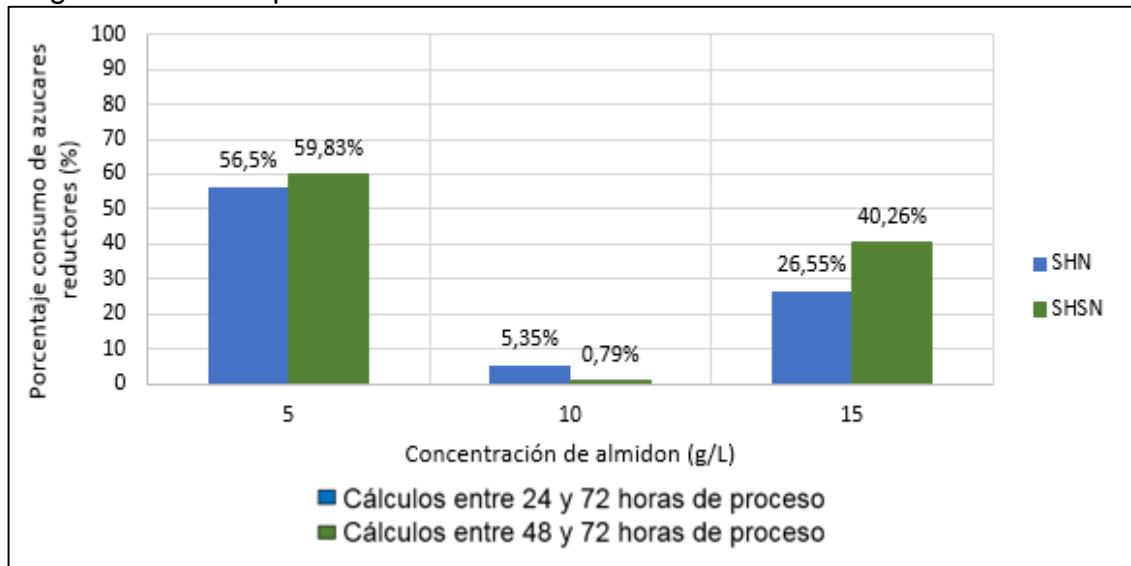
$$\% \text{ consumo de azúcares reductores} = \frac{AR_M - AR_m}{AR_M} \times 100$$

ARM: Concentración mayor de Azucares reductores.

ARm: Concentración menor de Azucares reductores.

Esta ecuación fue aplicada a los resultados obtenidos de cada uno de los fermentos de 5, 10 y 15 g/L en sus respectivos muestreos y se determinó el consumo de azucares reductores durante el proceso fermentativo.

Gráfica 5. Porcentaje consumo de azucares reductores en los fermentos 5, 10, 15 g/L de los dos tipos de tratamiento del sustrato.



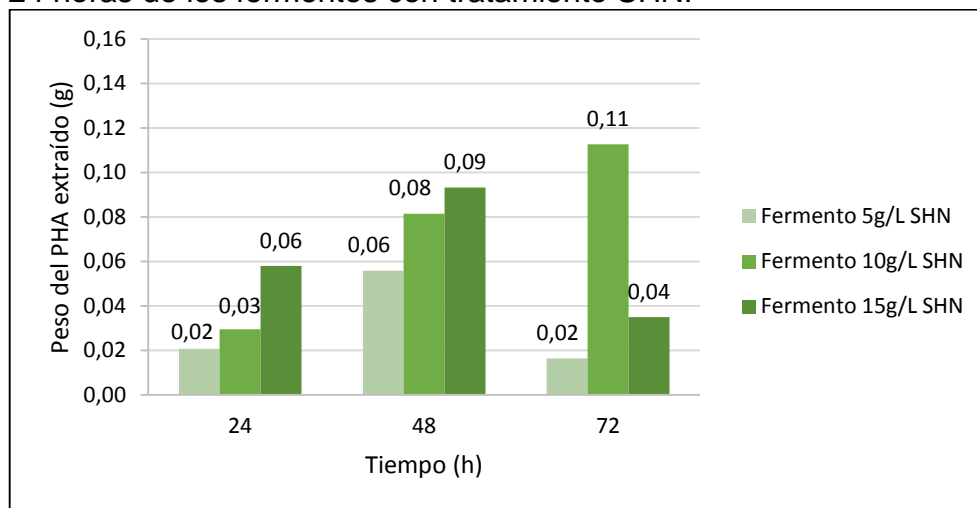
En la **Grafica 5**, se presenta el porcentaje de consumo de azucares reductores por parte del microorganismo al finalizar el proceso fermentativo, basado en los dos tratamientos que se realizaron en el proceso, ambos tratamiento sin hidrolizar con nutrientes y sin nutrientes. Dentro de los resultados se evidencia que hay un comportamiento similar en cada una de las concentraciones con sus respectivos tratamientos; se observa que la concentración de 5 g/L arroja porcentajes mayores en los dos tratamientos, 59,83% en el tratamiento sin nutrientes y 56,5% con nutrientes a comparación de las concentraciones de 10 g/L (5,35% en el tratamiento con nutrientes y 0,79% en el tratamiento sin nutrientes) y 15 g/L (26,55% en el tratamiento con nutrientes y 40,26% en el tratamiento sin nutrientes), sin embargo esto no determina un aumento en el consumo de azucares reductores que sean transformados en PHA dado que la concentración que presento mayor consumo de azucares reductores en el fermento de concentración de sustrato de 15g/L con valores puntuales de 4 g/L en el tratamiento con nutrientes y 6,04 g/L en el tratamiento sin nutrientes, identificando así que entre mayor concentración de sustrato se presente en el proceso, mayor será el consumo de azucares reductores por parte del microorganismo para la producción de PHA basado en que el

porcentaje de rendimiento no determina del todo si la concentración es la ideal para el proceso de producción del PHA.

4.3 EXTRACCIÓN

Luego de realizar el proceso de extracción descrito en el capítulo 3, donde se determinó que el experimento c del artículo “Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2” de los autores Siti Nor Syairah Anis, Nurhezreen Md Iqbal, Sudesh Kumar, Al-Ashraf Amirul¹⁹, el cual presento mejores resultados en la extracción de PHA en cuanto a mayor peso de biomasa extraída como se observa en la **Tabla 5**, se prosiguió con la extracción del PHA en las muestras de 20ml de cada fermento, tomadas cada 24 horas donde se determinó la cantidad de biomasa a la cual se le realizo el proceso extractivo, datos presentados en la **Tabla 6** y posteriormente se realizó la cuantificación de pellet extraído como se muestra en la **Tabla 7**.

Gráfica 6. Peso del PHA extraído (g) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHN.

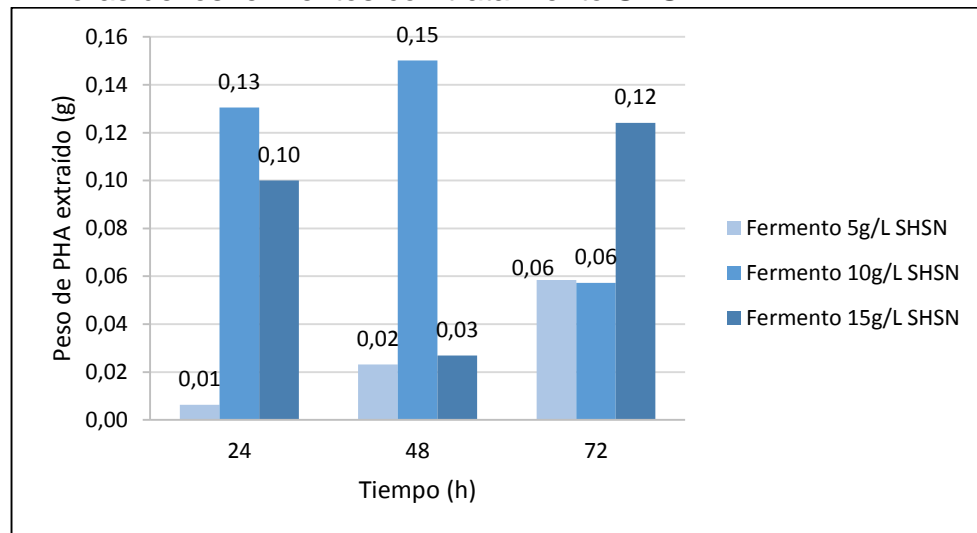


En la **Gráfica 6**, se observa las concentraciones del PHA extraído con el experimento seleccionado en el capítulo 3 los cuales presentan mayor concentración en las muestras de 48 horas en los fermentos de 5 y 15 g/L SHN y

¹⁹ SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-ASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217> >. [Citado el 23 de noviembre de 2016]

en el muestreo de 72 horas para el fermento de 10g/L SHN; en cuanto a la comparación entre la concentración de sustrato y PHA extraído se presenta un aumento a medida que la concentración de almidón se incrementa, hasta las 48 horas de muestreo, posteriormente a ello, es mayor en la concentración de 10g/L SHN en el muestreo de 72 horas que el de 15g/L SHN en el mismo muestreo, esto demuestra el aumento en la concentración del PHA extraído a medida que aumenta el tiempo de muestreo hasta finalizar la fermentación en la muestra de 10g/L SHN siendo el fermento con mayor producción de PHA a finalizar el proceso.

Gráfica 7. Peso del PHA extraído (g) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHSN.

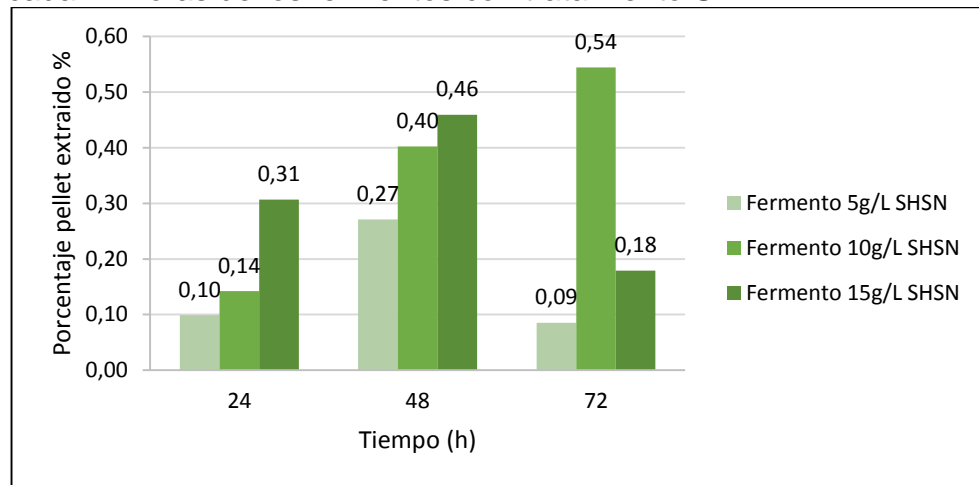


Las concentraciones de PHA extraído con el experimento seleccionado en el capítulo 3 se observan en la **Gráfica 7**, en el cual se presenta un crecimiento de PHA extraído a medida que transcurre el tiempo de muestreo en el fermento de 5g/L SHSN, un aumento hasta el muestreo de 48 horas en el fermento de 10g/L SHSN y un aumento en el fermento de 15g/L SHSN desde las 48 horas hasta las 72 horas. Esto evidencia un comportamiento similar de aumento en la cantidad de pellet extraído entre los fermentos de 5 y 10 g/L SHSN y los fermentos de 5 y 10 g/L SHN de la **Gráfica 6**.

En cuanto a la comparación entre los dos tipos de tratamientos del sustrato se observa que hay mayor pellet extraído en los fermentos a los cuales no se les añadió nutrientes en correlación al muestreo de 72 horas de los mismos, aunque en el fermento de 10g/L SHN presento mayor concentración de PHA que los de tratamiento SHSN, en los fermentos de 5 y 15 g/L SHSN se extrajo mayor cantidad que en los de SHN. Siendo el fermento de 10g/L SHN el que presento mayor concentración y producción de PHA en el último muestreo.

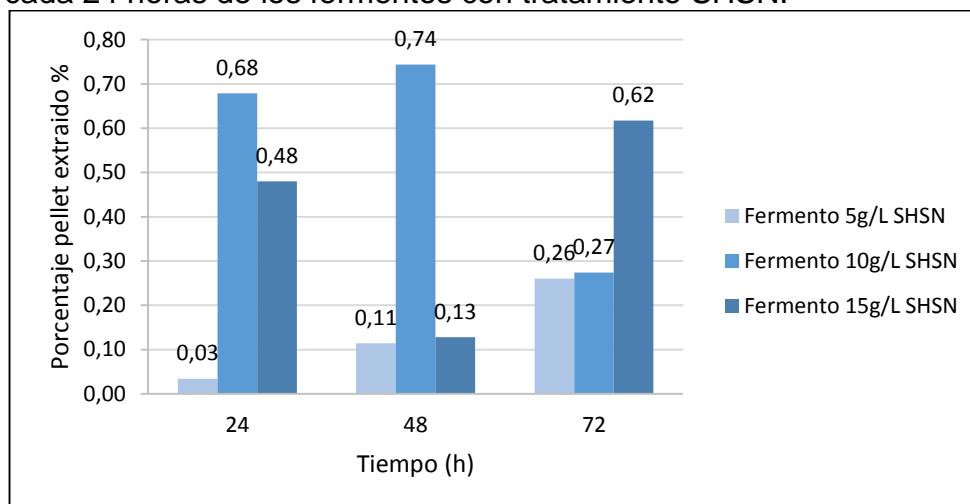
En cuanto al porcentaje de pellet extraído con respecto a la biomasa utilizada para este proceso de extracción presentado en la **Tabla 8**, fue determinado por la ecuación 2 y se encuentran plasmados dichos resultados para cada una de las condiciones de proceso fermentativo en las **Gráficas 8 y 9**.

Gráfica 8. Porcentaje del pellet extraído (%) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHN.



En la **Gráfica 8**, se observa un aumento en el porcentaje de pellet extraído durante los muestreos en el fermento de 10g/L, comportamiento esperado en el proceso, debido que este porcentaje debe aumentar a medida que el tiempo de muestreo sea mayor. En cuanto a los fermentos de 5 y de 15g/L este comportamiento se dio hasta las 48 horas de proceso y posteriormente disminuyo.

Gráfica 9. Porcentaje del pellet extraído (%) de las muestras tomadas cada 24 horas de los fermentos con tratamiento SHSN.



El comportamiento del porcentaje de pellet extraído en la **gráfica 9**, presenta resultados diferentes al presentado en la **gráfica 8** de los fermentos en los cuales fueron añadidos nutrientes al sustrato; puesto que el aumento en este porcentaje se dio en las muestras extraídas del fermento de 5g/L y en el de 10g/L aumento hasta las 48 horas y luego disminuyó y en el de 15g/L tuvo su valor más bajo en las 48 horas y un aumento en las 72 horas. El comportamiento en estas dos concentraciones de sustrato no fue el esperado debido a que se buscaba encontrar un aumento progresivo en el porcentaje extraído; la variación en los resultados determina que la interacción de los solventes con el biopolímero no es la misma a la que presentan con el biopolímero utilizado en el artículo científico “Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2” de los autores Siti Nor Syairah Anis, Nurhezreen Md Iqbal, Sudesh Kumar, Al-Ashraf Amirul²⁰, puesto que el porcentaje de pellet extraído en este artículo fue entre el 70 y el 94% y en el presente trabajo de grado se obtuvo como máximo un 0,62% al finalizar la extracción en el fermento de 15g/L sin la adición de nutrientes al sustrato y a nivel global en todos los muestreos un 0,74% en el fermento de 10g/L sin la adición de nutrientes al sustrato a las 48 horas de muestreo.

²⁰ SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-ASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217>>. [Citado el 23 de noviembre de 2016]

4.4 CARACTERIZACIÓN DEL PHA OBTENIDO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para determinar la existencia de PHA en las muestras tomadas de cada cultivo, se resuspendió el PHA obtenido en la extracción adicionando 1,5ml de metanol y se procedió de acuerdo a lo mencionado en el capítulo 3 para realizar la caracterización por cromatografía de gases donde se determinaron metil ésteres presentes en la resuspensión del PHA obtenido, pero antes de esto se hizo pasar una muestra de PHB proporcionado por la universidad nacional de Colombia para tener un punto de comparación, aunque no sea un PHA estándar, pero si hace parte de la familia de estos.

El proceso anteriormente mencionado se realizó en la Pontificia Universidad Javeriana de la Compañía de Jesús, sede Bogotá, Colombia, donde se realizó bajo las condiciones de proceso planteadas en el **Cuadro 11**, dichas condiciones de proceso fueron aportadas por el centro de gestión industrial del Sena, sede paloquemao, en donde han obtenido PHA por diferentes procesos.

Los cromatogramas de las muestras tomadas de cada fermento están en el **ANEXO D**, junto con los espectros de masas de cada uno de los mismos, donde se determina por el rompimiento de las moléculas y la relación masa / carga (m/z) para la identificación de los compuestos presentes en las muestras inyectadas con el cotejo de estos resultados a los tiempos de retención donde se observaron los mayores picos con la biblioteca del equipo y la calidad del compuesto presente con el compuesto encontrado en la base de datos.

Los resultados obtenidos en la correlacion de los cromatogramas de las muestras de PHA producido por el almidón con los dos tipos de tratamientos tiene similitudes con el PHB suministrado por la Universidad Nacional; en este PHB se encuentra una calidad del 70% de 2,3-dihidroxiopropil éster, éster más complejo a los encontrados en las muestras, en las cuales se encontraron metil ésteres plasmados los **cuadro 12** y **13**, dejando claro la presencia de los mismos en las muestras tomadas durante la etapa de fermentación y posterior extracción.

Cuadro 12. Determinación de metil ésteres por Cromatografía de gases en muestras tomadas de los fermentos de almidón sin hidrolizar con la adición de nutrientes.

Muestra	No. Pico	Tiempo de retención	Compuesto	Calidad
5g/L SHN 24h	1	12.548 min	9-Ácido octadecenoico (Z)-, metil éster	99%
	2	12.803 min	Metil estearato	99%
5g/L SHN 48h	1	12.583 min	9-Ácido octadecenoico (Z)-, metil éster	99%
	2	12.829 min	Metil estearato	96%
5g/L SHN 72h	1	12.636 min	9-Ácido octadecenoico (Z)-, metil éster	99%
	2	12.865 min	Metil estearato	99%
10g/L SHN 24h	1	12.663 min	9-Ácido octadecenoico (Z)-, metil éster	99%
	2	12.847 min	Metil estearato	99%
10g/L SHN 48h	1	12.733 min	9-Ácido octadecenoico (E)-, metil éster	98%
	2	12.900 min	Metil estearato	99%
10g/L SHN 72h	1	11.082 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	99%
	2	12.750 min	9-Ácido octadecenoico (E)-, metil éster	99%
	3	12.900 min	Metil estearato	99%
15g/L SHN 24h	1	11.082 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	99%
	2	12.785 min	10-Ácido octadecenoico, metil éster	98%
	3	12.882 min	Metil estearato	99%
15g/L SHN 48h	1	11.135 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	99%
	2	12.785 min	7-Ácido octadecenoico, metil éster	83%
	3	12.917 min	Metil estearato	99%

Cuadro 12. (Continuación)

Muestra	No. Pico	Tiempo de retención	Compuesto	Calidad
15g/L SHN 72h	1	9.870 min	Metil 9-metiltetradecanoato	91%
	2	11.117 min	Ácido bencenopropanoico, 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxi-, metil éster	98%
	3	12.821 min	11-Ácido octadecenoico, metil éster	99%
	4	12.970 min	Metil estearato	98%

Cuadro 13. Determinación de metil ésteres por Cromatografía de gases en muestras tomadas de los fermentos de almidón sin hidrolizar y sin la adición de nutrientes.

Muestra	No. Pico	Tiempo de retención	Compuesto	Calidad
5g/L SHSN 24h	1	12.838 min	9-Ácido octadecenoico (Z)-, metil éster	83%
5g/L SHSN 48h	1	9.888 min	Ácido pentadecanoico, metil éster	92%
	2	11.222 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	99%
	3	13.014 min	Ácido tetradecanoico, 12-metil-, metil éster, (S)-	96%
5g/L SHSN 72h	1	9.932 min	Metil 13-metiltetradecanoato	95%
	2	11.214 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	98%
	3	12.988 min	Metil estearato	98%
10g/L SHSN 24h	1	13.180 min	Metil estearato	92%

Cuadro 13. (Continuación)

Muestra	No. Pico	Tiempo de retención	Compuesto	Calidad
10g/L SHSN 48h	1	11.337 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	98%
	2	13.023 min	Ácido heptadecanoico, 16-metil-, metil éster	98%
10g/L SHSN 72h	1	11.205 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	98%
	2	12.970 min	Metil estearato	99%
15g/L SHSN 24h	1	13.233 min	Ácido heptadecanoico, 14-metil-, metil éster	86%
15g/L SHSN 48h	1	11.503 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	97%
	2	13.145 min	Metil estearato	96%
15g/L SHSN 72h	1	11.468 min	Ácido hexadecanoico, metil éster	76%
	2	13.172 min	Metil estearato	97%

Según lo observado en el **Cuadro 12**, se encontraron metil ésteres en las muestras de tratamiento SHN como metil éster (Z)- 9 -Ácido octadecenoico y Metil estearato con tiempos de retención similares de estos compuestos en las muestras; en cuanto a las muestras de tratamiento SHSN del **Cuadro 13**, se encontraron metil ésteres de cadena más corta como lo fueron metil éster Ácido pentadecanoico, metil éster Ácido hexadecanoico, metil éster Ácido heptadecanoico además de los metil estearatos encontrados en las muestras de tratamiento SHN.

4.5 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL PHA OBTENIDO

De acuerdo a los análisis durante el proceso de fermentación donde se realizó un seguimiento a fermentos de 500 mL con las concentraciones y tratamientos planteados anteriormente, por medio de determinaciones de azúcares reductores cada 24 horas hasta las 72 horas en las que finalizó el proceso fermentativo; se determina el porcentaje de rendimiento del proceso a partir de la **ecuación 1**, a su vez se determina el rendimiento de la fermentación por medio de la diferencia entre la concentración de azúcares reductores más alta registrada durante la fase fermentativa y la concentración de los mismos al finalizar el proceso. Estos porcentajes de rendimiento se encuentran en la **Tabla 4** para cada fermento, donde se determinó que la concentración de sustrato en la cual se produjo mayor

rendimiento fue la de 5g/L con la adición de nutrientes, en la que se obtuvo una eficiencia de proceso de 0,8% donde se indica que el 56,5% de los azúcares reductores producidos por la hidrólisis del almidón por parte del microorganismo, fueron transformados en producto, de acuerdo a lo observado en la **Gráfica 5**.

A partir de la extracción realizada y por la afinidad del solvente al PHA, reportado en el artículo científico “Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2” de los autores Siti Nor Syairah Anis, Nurhezreen Md Iqbal, Sudesh Kumar, Al-Ashraf Amirul²¹, se puede afirmar que se obtuvo el PHA pero no en los porcentajes esperados comparados con los obtenidos en el artículo mencionado anteriormente, donde se muestra un porcentaje de pellet extraído entre el 70 y el 94%; en el presente trabajo de grado se obtuvo como máximo un 0,62% al finalizar el proceso extractivo en el fermento de 15g/L sin la adición de nutrientes al sustrato. (Véase **Gráficas 9 y 10**).

La variación en los resultados determina, que la interacción de los solventes con el biopolímero no es la misma a la que presentan con el biopolímero trabajado en el artículo científico de los autores Siti Nor Syairah Anis y colaboradores²⁰, lo cual conlleva a que sea menor la cantidad de pellet extraído.

Por tales motivos se realiza un proceso cualitativo para determinar la presencia de PHA en cada una de las muestras tomadas y extraídas posterior a la fermentación, mediante una cromatografía de gases, donde los picos característicos obtenidos determinan la presencia de metil ésteres, resultados que se encuentran en las **cuadros 12 y 13** y en las imágenes del **ANEXO D**.

²¹ SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-ASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217> >. [Citado el 23 de noviembre de 2016]

5. CONCLUSIONES

- Se acondiciono el almidón de papa al neutralizar su pH con carbonato de calcio (CaCO_3). El almidón es un sustrato adecuado que no requiere cambios que demuestren una falta o exceso dentro de las condiciones de proceso las cuales son: un pH de 7, temperatura de 36°C y $15,75 \text{ rad/s}$, con un ambiente aerobio.
- Se establecieron las condiciones del proceso fermentativo en las cuales la bacteria creció en un medio desbalanceado con un exceso de carbono proveniente de almidón de papa sin hidrolizar con la adición y ausencia de nutrientes y limitándole el nitrógeno presente en el medio. Las condiciones para dicha fermentación fueron las mencionadas en la conclusión número 1, concentraciones de sustrato sin hidrolizar con y sin nutrientes de 5, 10 y 15 g/L y un pH neutro para un volumen de 500mL; condiciones en las cuales la bacteria tuvo el menor tiempo en cuanto a la hidrolisis del almidón y consumo de azúcares reductores fue entre 48 y 72 horas.
- Se obtuvo durante el proceso fermentativo un rendimiento de proceso del 0,8% en el sustrato de concentración de 15g/L con adición de nutrientes, de acuerdo a los azúcares consumidos en el proceso y en la extracción un porcentaje de pellet extraído del 0,62% en el fermento de 15g/L sin la adición de nutrientes al sustrato, con respecto a la cualificación del PHA producido se determinó la presencia de metil esterés en todas las muestras extraídas de las diferentes concentraciones trabajadas y sus respectivos condiciones de proceso.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el proceso de fermentación con este sustrato pero con otros tipos de microorganismos los cuales pueden ser modificados o con mayor producción en peso seco de PHA con el fin de aumentar la cantidad de PHA obtenido.
- Se recomienda estudiar diferentes procesos de extracción en los cuales se obtenga mayor cantidad de pellet.
- Se recomienda realizar una curva de calibración de PHA con diferentes patrones estándar para la cuantificación del biopolímero después del proceso de extracción, puesto que no se pudo obtener dicha curva de calibración en el presente trabajo de grado.
- Se recomienda trabajar con concentraciones de sustrato superiores a 10g/L para obtienen mejores resultados en el rendimiento extractivo.

BIBLIOGRAFÍA

BANACORE Analia. Estudio de la producción de Polihidroxicanoatos (PHA) por *Bacillus sp.* Utilizando glicerol como fuente de carbono. p. 41. Tesis de grado (Licenciatura en Biología opción Biotecnología). Universidad de la República de Uruguay. Facultad de ciencias. Disponible en repositorio institucional de la Universidad de la República de Uruguay colección digital. < <https://www.colibri.udelar.edu.uy/>>

BECERRA JIMÉNEZ Mónica Liliana. Producción de un polímero tipo PHA empleando residuos de la industria de biodiesel. ANEXO B. Anexo Protocolos experimentales. B-8 CROMATOGRFÍA DE GASES Tesis de grado (Magister en Ciencias Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Facultad de ciencias. Disponible en < <http://www.bdigital.unal.edu.co/10715/1/01186471.2013.pdf> >.

CASTILLO FRANCO, Diego Armando. Efecto del gen *fadH1* en la producción de PHA contenido en monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. 2008.

CUERVO GARCÉS, Laura Viviana. ECHEVERRY VARGAS, Julio Cesar. Evaluación de la síntesis de ácido polilactico proveniente del suero de quesería a nivel laboratorio. p50. Trabajo de grado. Fundación Universidad de América. 2016.

GOMEZ CARDOZO Javier Ricardo. Producción y caracterización de Polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. p42. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 2013.

GONZÁLEZ GARCÍA Yolanda y Colaboradores. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano p1. Universidad de Guadalajara. Departamento de Madera, Celulosa y Papel. 2012.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El instituto, 2008. 110 p.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El instituto. 2008. 45 p.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. Bogotá: El instituto. 1998. 33 p.

_____. Azúcar. Métodos de ensayo para la determinación de humedad. NTC 572. Bogotá: El instituto. 2012.

_____. Miel de caña. Método para determinar azúcares totales expresados como reductores. NTC 1779. Bogotá: El instituto. 1997.

ISAZA JÁCOME. Angie Catherine. USCATEGUI ALFONSO. María del pilar. Evaluación de viabilidad técnico-financiera de la producción de polihidroxicanoatos a partir de ácidos grasos obtenidos en la refinación del aceite de palma en Gradesa S.A. a nivel laboratorio. p47. Trabajo de grado (Ingeniero químico). Fundación Universidad de América. 2014.

LI Shen, JULIANE Haufe, MARTIN K. Patel. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics PRO-BIP 2009. Final Report June 2009. Utrecht The Netherlands.

MARIANO. Polihidroxicanoatos (PHA). Blog Tecnología de los plásticos. 2012. Disponible en: <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.co/2012/10/polihidroxicanoatos-pha.html>. [Citado el 23 de noviembre de 2016].

MENDEZ. Angeles. El almidón y su química. La Guía. 2012. Disponible en: <http://quimica.laguia2000.com/compuestos-quimicos/el-almidon-y-su-quimica>. [Citado el 23 de noviembre de 2016].

NARANJO VASCO Javier Mauricio. Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales. p65. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales. 2010.

SANG YUP Lee. (1996). ¿Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. TIBTECH. November (VOL 14).

SITI NOR SYAIRAH ANIS, NURHEZREEN MD IQBAL, SUDESH KUMAR, AL-AASHRAF AMIRU. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. USM2. En Revista: Separation and Purification Technology. Vol 102. (octubre 2012-enero 2013) Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612005217> >. [Citado el 23 de noviembre de 2016].

STEINBÜCHEL A., FÜCHTENBUSCH B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. TIBTECH OCTOBER (vol16).

TORTORA. Gerard j., FUNKE Berdell R., CASE Christine L. Introducción a la microbiología. Capítulo 5: Metabolismo Microbiano. Editorial Médica Panamericana Novena edición. Madrid España 2007. p 123.

ANEXOS

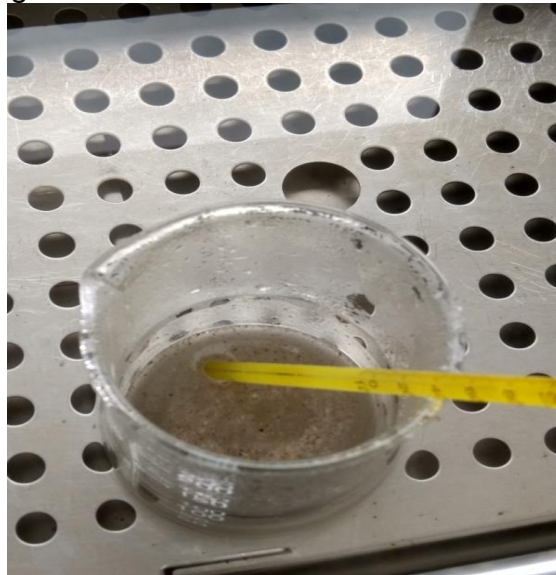
ANEXO A

CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE PAPA

Se presentan los resultados obtenidos en la caracterización del almidón de papa obtenido de la empresa Comercializadora Nacional de papas R&G S.A.S.

- **Temperatura de gelatinización.** Basado en el método establecido de Grace, 1977 se pesan 9,0012 g de almidón (base seca) para disolverlos en 200 ml de agua destilada en un vaso de precipitado, se agita constantemente. Se procede a llevarlo al baño de maría, calentando el agua a una temperatura de 95°C. Con un termómetro, se va agitando mientras se observa que la temperatura se mantenga constante en un punto, esperando que se forme una capa de gel en el medio como se aprecia en la **Imagen 1**.

Imagen 1. Procedimiento para determinar temperatura de gelatinización



Luego de esperar a que la temperatura se mantuviera constante dentro del medio durante cierto tiempo además de la formación de una capa de gel en el medio, la prueba arrojó un valor de temperatura de 80°C, esa es la temperatura de gelatinización del almidón de papa.

- **Porcentaje de humedad.** Se obtuvieron los siguientes datos tomando en cuenta un tiempo de calentamiento de 3 horas con 30 minutos, cumpliendo con la norma

NTC 572, buscando obtener el porcentaje de humedad y de sólidos totales, como se aprecia en la **Imagen 2**:

Tabla 1. Pesos de las capsulas y las muestras de almidón de papa.

Elemento / Peso	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
Capsula	44,9675	49,0147
Almidón de papa	5,0316	5,0602
Capsula + almidón de papa	49,9582	54,0188
Elemento / Peso	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
Capsula (seca)	47,3647	51,4181

Imagen 2. Muestras obtenidas después del tiempo de secado



Estos son los cálculos respectivos, usando las siguientes formulas:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(\text{Peso muestra humeda} - \text{Peso muestra seca (g)}) \times 100}{\text{Peso muestra humeda (g)}}$$

$$\text{Humedad (\%)}_1 = \frac{(49,9582 - 47,3647)g \times 100}{49,9582 g}$$

$$\text{Humedad (\%)}_1 = 5,2 \%$$

$$\text{Humedad (\%)}_2 = \frac{(54,0188 - 51,4181) g \times 100}{54,0188 g}$$

$$\text{Humedad } (\%)_2 = 4,81 \%$$

- **Porcentaje de cenizas.** Basado en la norma AOAC 942.05, 2000. Se han tomado los siguientes valores en peso de los crisoles y las muestras por duplicado, además de pasado el tiempo establecido, se obtuvieron los pesos de los crisoles:

Tabla 2. Pesos de los crisoles y las muestras de almidón de papa.

Elemento / Peso	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
Crisol	20,1312	16,6827
Almidón de papa	4,9918	3,512
Crisol + almidón de papa	25,1230	20,1947
Elemento / Peso	Muestra 1 (g)	Muestra 2 (g)
Crisol (cenizas)	20,1631	16,0118

Imagen 3. Muestras obtenidas luego de someter el almidón a altas temperaturas.



Se procede a realizar los cálculos respectivos para las dos muestras mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas } (\%) = \frac{\text{Peso de las cenizas (g)} \times 100}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

$$\text{Cenizas } (\%)_1 = \frac{20,1631 \text{ g} \times 100}{25,1230 \text{ g}}$$

$$\text{Cenizas } (\%)_1 = 80,26 \%$$

$$\text{Cenizas } (\%)_2 = \frac{16,0118 \text{ g} \times 100}{20,1947 \text{ g}}$$

$$\text{Cenizas } (\%)_2 = 79,29 \%$$

- **Calculo de pH.** Para este procedimiento se calibro el medidor de pH con soluciones tampón de pH 4 y 7. Se mezclaron 10 g de almidón (base seca) en 200 ml de agua destilada, previamente hervida) durante 20 minutos. Mediante filtración se obtiene una muestra la cual permite el cálculo de pH, el valor arrojado por el medidor de pH para la muestra es de 4,8.

Imagen 4. Filtración de muestra para determinación de pH.



- **Determinación de azúcares no reductores**

Estandarización glucosa 0,5%

1. 2,7 ml
2. 2,8 ml
3. 2,7 ml

Azúcares no reductores

Muestra 1. Almidón 0,5%

1. 3,9 ml
2. 3,9 ml

3. 4,0 ml

Muestra 2. Almidón 0,5%

1. 4,0 ml

2. 4,0 ml

3. 3,8 ml

Se desarrollan los cálculos respectivos de la siguiente manera:

$$F_s = 25 \times 10^{-5} \times V_t$$

Fs: factor estándar equivalente a gramos de glucosa que reacciona con 1 ml de la solución de fehling.

Vt: volumen de solución estándar de azúcar hidrolizada gastado en la estandarización.

Estandarización glucosa 0,5%

1. $F_s = 6,75 \times 10^{-4}$

2. $F_s = 7 \times 10^{-4}$

3. $F_s = 6,75 \times 10^{-4}$

Muestra 1. Almidón 0,5%

1. $F_s = 6,75 \times 10^{-4}$

2. $F_s = 6,75 \times 10^{-4}$

3. $F_s = 1 \times 10^{-3}$

Muestra 2. Almidón 0,5%

1. $F_s = 1 \times 10^{-3}$

2. $F_s = 1 \times 10^{-3}$

3. $F_s = 9,5 \times 10^{-4}$

$$\% \text{ azucares no reductores} = \frac{F_s \times 2 \times 10^8}{V_t \times P_m}$$

Fs: factor estándar equivalente a gramos de glucosa que reacciona con 1 ml de la solución de fehling.

Vt: volumen de solución estándar de azúcar hidrolizada gastado en la estandarización.

Pm: masa de la muestra.

Muestra 1. Almidón 0,5%

1. $F_s = 1 \times 10^{-3}$
2. $F_s = 1 \times 10^{-3}$
3. $F_s = 9,5 \times 10^{-4}$

Muestra 2. Almidón 0,5%

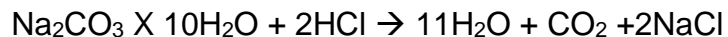
1. $F_s = 1 \times 10^{-3}$
2. $F_s = 1 \times 10^{-3}$
3. $F_s = 9,5 \times 10^{-4}$

- **Determinación del porcentaje de nitrógeno**

Peso muestras almidón:

1. 0,11g
2. 0,1017g
3. 0,1002g
4. 0,1014g

Estandarización de solución HCl



$$8\text{ml HCl} \times \frac{0,1 \text{ mmol HCl}}{1\text{ml HCl}} \times \frac{1 \text{ mmol Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}}{2 \text{ mmol HCl}} \\ \times \frac{286,1412 \text{ mg Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mmol Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}} \\ = 114,45\text{mg Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$$

$$113,8\text{mg Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O} \times \frac{1 \text{ mmol Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}}{286,1412 \text{ mg Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}} \times \frac{2 \text{ mmol HCl}}{1 \text{ mmol Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}} \\ \times \frac{1}{9,4 \text{ ml HCl}} \\ = 0,0846 \text{ M HCl}$$

ml gastados en la titulación con HCl:

1. 3,9ml HCl (blanco)
2. 0,3ml HCl
3. 0,25ml HCl
4. 0,25ml HCl

5. 0,25ml HCl

Gramos de nitrógeno presentes en las muestras:

1. $4,62 \times 10^{-3}$ g N (blanco)
2. $3,55 \times 10^{-4}$ g N
3. $2,96 \times 10^{-4}$ g N
4. $2,96 \times 10^{-4}$ g N
5. $2,96 \times 10^{-4}$ g N

Porcentaje de nitrógeno presente en las muestras:

1. 0,323%
2. 0,291%
3. 0,295%
4. 0,292%

ANEXO B

DATOS DE CONTEO EN PLACA DE LAS UFC EN LA FASE DE FERMENTACIÓN

Se presentan los resultados del conteo en placa de las UFC presentes en las muestras durante la fermentación.

Cuadro 1. Resultado del conteo en placa durante la fermentación de las muestras por duplicado de su respectiva concentración y condiciones de fermento

Fermento basado en un tiempo de 24 horas			
Concentración	Muestra	SHN	SHSN
5 g/L	1	470	Incontable
	2	888	806
10/g/L	1	Incontable	40
	2	404	203
15 g/L	1	1092	Incontable
	2	1072	457
Fermento basado en un tiempo de 48 horas			
Concentración	Muestra	SHN	SHSN
5 g/L	1	872	Incontable
	2	214	Incontable
10/g/L	1	323	1160
	2	Incontable	503
15 g/L	1	25	Incontable
	2	12	38
Fermento basado en un tiempo de 72 horas			
Concentración	Muestra	SHN	SHSN
5 g/L	1	1990	405
	2	1717	507
10/g/L	1	206	296
	2	112	110
15 g/L	1	66	415
	2	416	1514

ANEXO C

CURVA DE CALIBRACIÓN DE DNS

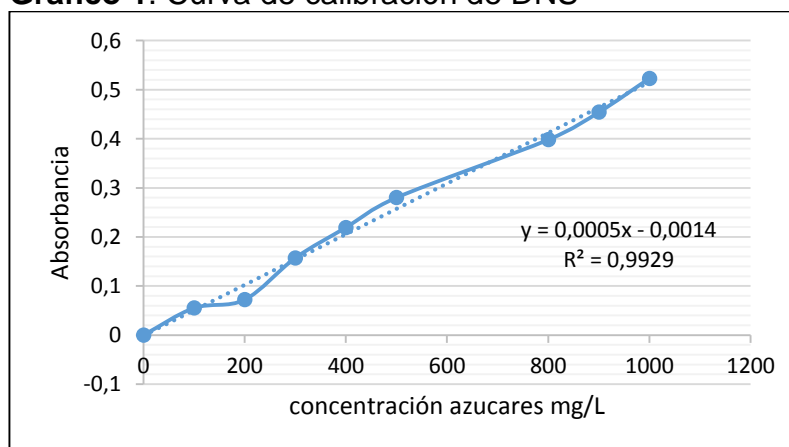
En el siguiente anexo se colocara la curva de calibración de DNS para la determinación de azúcares reductores durante la selección de condiciones de proceso fermentativo y fermentación microbiana.

Tabla 2. Datos curva de calibración de DNS

Tubo	Concentración mg/L	Absorbancia
0	0	0
1	100	0,055
2	200	0,072
3	300	0,157
4	400	0,219
5	500	0,28
6*	600*	0,18*
7*	700*	0,225*
8	800	0,398
9	900	0,454
10	1000	0,523

*Valores en cuadro rojo no se tomaron en cuenta debido a que modificaban la linealidad de la curva.

Gráfico 1. Curva de calibración de DNS



ANEXO D

CARACTERIZACIÓN DEL PHA OBTENIDO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

En el siguiente anexo se encuentra la respectiva numeración de los viales durante la cromatografía de gases con su respectiva concentración y tiempo establecido, además de los cromatogramas de las muestras de los fermentos dictados por el cromatografo de gases (masa), basado en que cada uno de estos diagramas posee dos picos que fueron analizados buscando la presencia de los compuestos respectivos.

Cuadro 2. Numeración de viales con las muestras extraídas.

Numero de vial	Muestra		
1	Sin hidrolizar, con nutrientes	5 g/L	24 h
2			48 h
3			72 h
4		10 g/L	24 h
5			48 h
6			72 h
7		15 g/L	24 h
8			48 h
9			72 h
10	Sin hidrolizar, sin nutrientes	5 g/L	24 h
11			48 h
12			72 h
13		10 g/L	24 h
14			48 h
15			72 h
16		15 g/L	24 h
17			48 h
18			72 h

Imagen 5. Cromatograma del vial N° 1 (Pico 1)

File : C:\MassHunter\GCMS\1\Data\DavidS\1.D
Operator : DavidS
Acquired : 16 Nov 2016 20:34 using AcqMethod DavidS.M
Instrument : gc msd
Sample Name: 1
Misc Info :
Vial Number: 3

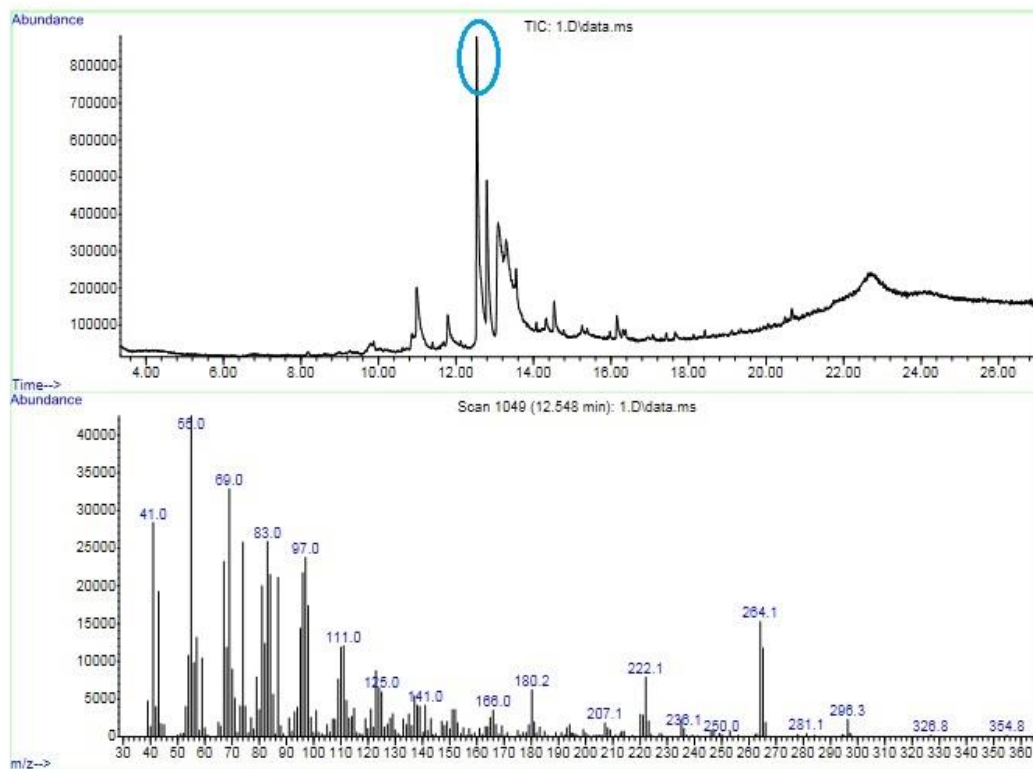
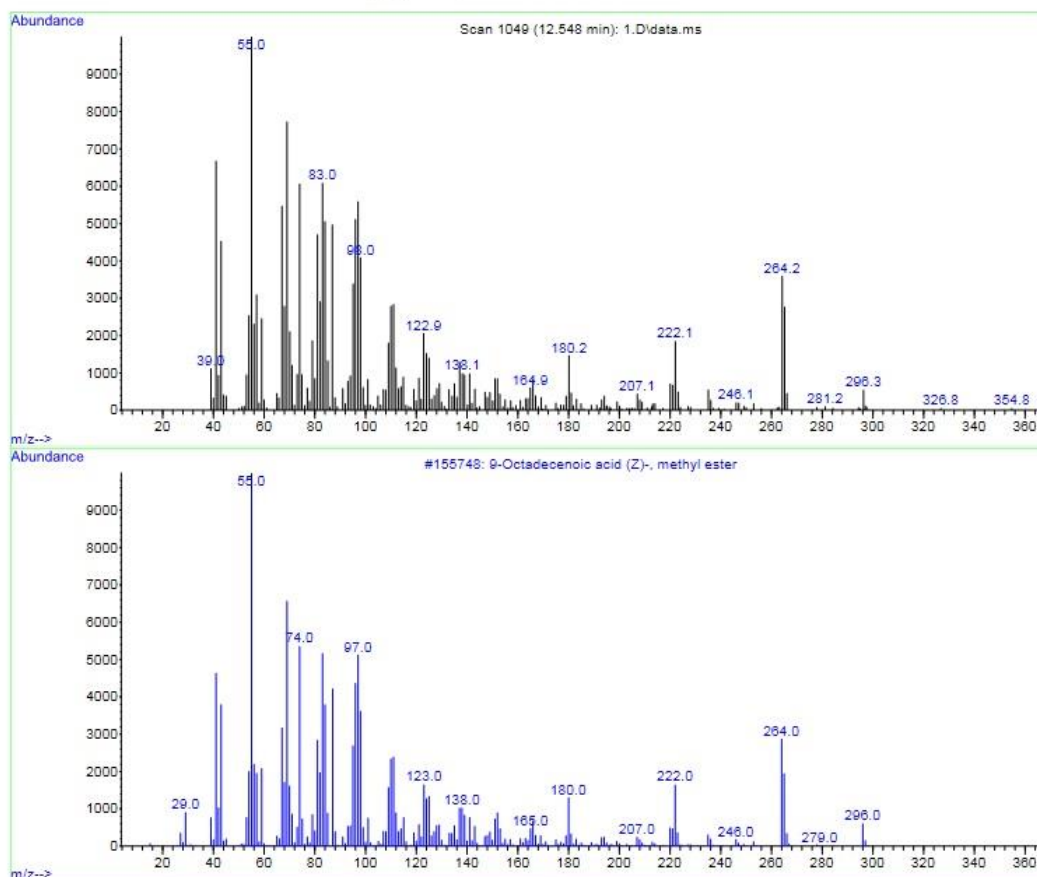



Imagen 6. Espectro de masas del vial N°1 (Pico 1)

Library Searched : C:\MassHunter\Library\NIST14.L
Quality : 99
ID : 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester



Debido a la cantidad de cromatogramas y espectros de cada uno de sus viales con sus respectivos picos, se decidió anexar toda esa información en un CD para volverlo más práctico.

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:	T 660.28449 S197 2017
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0	
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016	


AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES




Nosotros **Camilo Andrés Sanabria Rodríguez** y **Daniel Esteban Sarmiento Lemus**, en calidad de titulares de la obra **Evaluación de la obtención de polihidroxicanoatos (PHAs) partiendo del residuo de almidón de papa por medio de *bacillus subtilis* a nivel laboratorio**, elaborada en el año **2016**, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:


AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	x	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	x	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		x

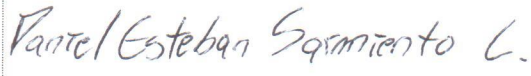
Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D.C., a los 17 días del mes de marzo del año 2017.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Camilo Andrés	Sanabria Rodríguez
Documento de identificación No	Firma
c.c. 1.014.242.217	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Daniel Esteban	Sarmiento Lemus
Documento de identificación No	Firma
c.c. 1.022.393.955	

1660 