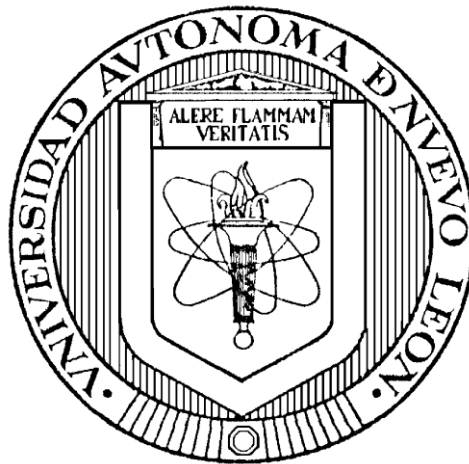


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**PRODUCCIÓN DE PHA POR BACTERIAS AISLADAS DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

POR

Q.F.B. OLIVIA LÓPEZ AYALA

**Como requisito para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

MONTERREY, N. L.

FEBRERO, 2015

“PRODUCCIÓN DE PHA POR BACTERIAS AISLADAS DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO”

Revisión de la tesis:

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
Director de Tesis

Dr. Mauricio Salinas Santander
Codirector de Tesis

Dr. Ulrico Javier López Chucken
Comité Tutorial

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
Comité Tutorial

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Comité Tutorial

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu Asesor de tesis. Así como al Dr. Mauricio Andrés Salinas Santander Co-Director de tesis y a los Doctores Ulrico Javier Chucken López, Allan Blanco Gámez y Xristo Zárate por formar parte del Comité tutorial de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por darme la oportunidad de realizar mi grado de maestría en sus instalaciones.

Al Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas (CELAES), al Laboratorio de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León (UGRNL) y al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por permitirme el uso de sus equipos para la realización del presente proyecto.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por darme la oportunidad para la realización de una estancia y el uso de sus equipos para la finalización del proyecto.

Al Dr. Daniel Genaro Segura, al Dr. Alfredo Rosales y al Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa por sus valiosas sugerencias y apoyo a este proyecto.

A mis amigos y compañeros de generación de posgrado: Erika Barbosa, Albert Lerma, Yair de los Ángeles por ser grandes amigos y enseñarme el trabajo en equipo y saber compartir ideas.

A mi familia por el apoyo que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Primeramente, a **Dios** por ilustrarme y guiarme para continuar con mis estudios darme fuerzas en los momentos difíciles.

A mis padres **Jacinto López De La Cruz, María Ayala Cortez**, y a todos mis hermanos: **Josefina, Licely, Salvador, Héctor, Juany, Silvia, Lorenzo, Patricia y Gabriel** por su apoyo incondicional, por su cariño y amor, y porque siempre estuvieron de una u otra forma conmigo a lo largo de toda mi vida.

A la familia **Jiménez Laffitte** y a la familia **Laffitte Rojas** por sus buenos consejos y su valioso apoyo, siempre estuvieron presentes para darme ese ánimo para seguir avanzando y no dejarme caer.

RESUMEN

Nombre: Q.F.B. Olivia López Ayala Fecha de Graduación: Diciembre, 2015
Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de ciencias Químicas

“PRODUCCIÓN DE PHA POR BACTERIAS AISLADAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO”

Número de páginas:98

Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con orientación en
Microbiología Aplicada.

Área de Estudio: Microbiología Ambiental Aplicada

Propósito y Método de Estudio: 17 muestras fueron recolectadas de suelo, agua y sedimentos obtenidas de diferentes ecosistemas del Estado de Nuevo León, donde se aislaron 250 cepas bacterianas, 118 de éstas fueron estudiadas para evaluar su capacidad para producir biopolímeros pertenecientes a la familia de los Polihidroxicanoatos (PHA), encontrándose que 68 ellas fueron capaces de producir biopolímeros. Con esto, se planteó el propósito de encontrar una cepa bacteriana capaz de producir algún tipo de PHA con características fisicoquímicas similares a los plásticos convencionales, empleando productos agroindustriales como fuente de carbono. Los biopolímeros fueron caracterizados mediante IR, RMN, DSC y SEM a fin de establecer sus propiedades fisicoquímicas.

Conclusiones y contribuciones: El 55% de las cepas aisladas, pertenecientes principalmente al filo de las proteobacterias, fueron capaces de producir PHA bajo condiciones de estrés nutricional por la falta de nitrógeno y fósforo, empleando productos agroindustriales como fuente de carbono. La presencia de gránulos intracelulares de PHA fue confirmada por microscopía de fluorescencia empleando Azul Nilo al 1%. De entre las 68 bacterias confirmadas como productoras de PHA, la cepa designada como 21D, presentó altos niveles de producción empleando grano de soya como fuente de carbono. Las técnicas de caracterización indicaron que el biopolímero obtenido de la cepa 21D es capaz de producir P-(P3HB-P3HV) con una proporción de 1:0.055.

Asesor: Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu: _____

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

AN	Azul Nilo
ANOVA	Análisis de varianza
DO	Densidad óptica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FC	Fuente de carbono
HB	Hidroxibutirato
HV	Hidroxivalerato
IR	Infrarrojo
LB	Bouillon, Lennox
M	Molar
MC	Medio de cultivo
MMM	Medio Mineral Mínimo
mM	Milimolar
MPM	Marcadores de Peso Molecular
NMR	Resonancia magnética nuclear
NS	Negro Sudán
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Polietileno
PET	Tereftalato de polietileno
PF	Punto de fusión
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PHO	Polihidroxi octanoato
PP	Polipropileno
RPM	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS	ii
TABLA DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
1.1.- INTRODUCCIÓN	1
1.2.- JUSTIFICACIÓN.....	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	4
2.1.- GENERALIDADES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	4
2.2.- HISTORIA DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	5
2.3.- PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	6
2.4.- APLICACIONES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS.....	8
2.5.- VÍAS DE SÍNTESIS DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	9
2.6.- CLASIFICACIÓN DE LAS SINTASAS.....	11
2.7.- DETECCIÓN DE LOS GRÁNULOS DE PHA	14
2.8.- CONDICIONES DE FORMACIÓN DE LOS GRÁNULOS DE PHA	14
2.9.- LA PRODUCCIÓN DE PHA EN CULTIVOS MIXTOS	15
2.10.- OTRAS TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN.....	17
2.11.- SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PHA	18
2.12.- LOS ACEITES VEGETALES COMO FUENTES DE CARBONO	21
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1.-HIPÓTESIS.....	23
3.2.- OBJETIVO GENERAL.....	23
3.3.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
CAPÍTULO 4. LOCALIZACIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1.- LOCALIZACIÓN.....	25
4.2.- MATERIALES Y EQUIPO	25
4.4.- ESTRATEGIA GENERAL DEL PROYECTO.....	27
4.5.- MUESTREO DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO	27
4.6.- AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS POR EL MÉTODO DE DILUCIONES EN SERIE Y SIEMBRA POR ESTRÍAS EN PLACA	28
4.7.- BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE PHA	28
4.8.- SCREENING DE PRODUCCIÓN DE PHA EMPLEANDO ACETATO DE SODIO COMO FUENTE DE CARBONO	29
4.10.- DETECCIÓN DE LOS GRÁNULOS DE PHA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	31

4.11.- PRODUCCIÓN DE PHA UTILIZANDO LA CEPA 21D Y DOS CONTROLES POSITIVOS, EMPLEANDO EL GRANO DE SOYA COMO FUENTE DE CARBONO	32
4.12.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO PRODUCIDO POR LAS CEPAS: 21D, <i>P. AERUGINOSA</i> Y <i>B. MEGATERIUM</i>	33
4.13.- DETECCIÓN DE LOS GRÁNULOS DE PHA MEDIANTE SEM.....	33
4.14.- CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS PRODUCIDOS POR LAS CEPAS: 21D, <i>P. AERUGINOSA</i> Y <i>B. MEGATERIUM</i>	34
4.15.- IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE DE LA BACTERIA SELECCIONADA COMO PRODUCTORA DE PHA.....	34
4.16.- REALIZACIÓN DEL ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN Y TOXICIDAD DEL PRODUCTO GENERADO POR LA CEPA 21D.....	35
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1.- COLECTA DE LAS MUESTRAS DE SUELO, AGUA Y SEDIMENTO	37
5.2.- MODELOS TEÓRICOS SOBRE LOS GENES Y MECANISMOS DE CONTROL PRESENTES EN LAS VÍAS METABÓLICAS DE PRODUCCIÓN DE PHA	39
5.2.1.- Frecuencia de las diferentes clases de sintasas.....	39
5.2.2.- Género de bacterias que contienen el gen <i>phaC II</i>	40
5.2.3.- Tipo de reguladores presentes en las bacterias que contienen el gen <i>phaC II</i>	41
5.3.- SELECCIÓN DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA CON ACETATO DE SODIO COMO FUENTE DE CARBONO.....	42
5.4.- PRODUCCIÓN DE PHA CON PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES COMO FUENTE DE CARBONO.....	44
5.4.1.- Pruebas de capacidad de la cepa 20C para producir PHA con productos agroindustriales.....	46
5.4.2.- Prueba de capacidad de la cepa 32A para producir PHA empleando productos agroindustriales.....	50
5.4.3.- Prueba de capacidad de la Cepa 20D para producir PHA empleando productos agroindustriales.....	53
5.4.4.- Prueba de capacidad de la Cepa 21D para producir PHA empleando Residuos Agroindustriales	56
5.5.- CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA CEPA 21D COMO LA MEJOR PRODUCTORA DE PHA Y DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL COMO LA MEJOR FUENTE DE CARBONO	59
5.6.- PRODUCCIÓN A MEDIANA ESCALA DEL BIOPOLÍMERO POR LA CEPA 21D, <i>P. AERUGINOSA</i> Y <i>B. MEGATERIUM</i> EMPLEANDO EL GRANO DE SOYA COMO ESTRÉS NUTRICIONAL	60
5.7.- CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO PRODUCIDO POR LA CEPA 21D, <i>P. AERUGINOSA</i> Y <i>B. MEGATERIUM</i>	63
5.7.1.- Micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido.....	63
5.7.2.- Espectro infrarrojo del biopolímero producido por la Cepa 21D, <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. megaterium</i>	64
5.7.3.- Espectro de ¹ H-RMN del biopolímero producido por la Cepa 21D, <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. megaterium</i>	67
5.7.4.- Análisis por DSC del biopolímero de la Cepa 21D, <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. megaterium</i>	71
5.8.- IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA 21D.....	73
5.9.- ENSAYO DE TOXICIDAD Y BIODEGRADACIÓN DEL BIOPOLÍMERO GENERADO POR LA CEPA 21D EMPLEANDO <i>EISENIA FOETIDA</i>	76
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	79
6.1.- CONCLUSIONES	79
CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Principales monómeros que conforman los PHA producidos por microorganismos (Lee 1996).....	6
Tabla 2.- Propiedades físicas de diferentes tipos de PHA y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo (Bhubalan et al. 2008).	7
Tabla 3.- Reactivos utilizados	25
Tabla 4.- Resumen de los equipos que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto	26
Tabla 5.- Residuos generados durante el desarrollo del presente proyecto	26
Tabla 6.- Diferentes clases de Sintetas y los microorganismos modelos	29
Tabla 7.- Claves de las cepas aisladas de las muestras y ubicación geográfica de las regiones de muestreo.....	38
Tabla 8.- Clases de sintetas y homólogos reportados	40
Tabla 9.- Funciones de los principales reguladores presentes en las bacterias con el gen phaC II.....	42
Tabla 10.- Cepas seleccionadas como mejores productoras de PHA y los controles positivos y negativo.....	45
Tabla 11.- Productos agroindustriales empleados como fuentes de carbono	45
Tabla 12.-Tabla de resultados de incrementos en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorbancia a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.....	47
Tabla 13.- Resultados de la tinción con Azul Nilo 1% de la Cepa 20C empleando la Harinolina como fuente de carbono frente al control negativo E. coli y dos controles positivos P. aeruginosa y B. megaterium	48
Tabla 14.- Tabla de resultados de incremento en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorción a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.....	51
Tabla 15.- Cepa 32A empleando el salvado como fuente de carbono frente al control negativo como E. coli y dos controles positivos P. aeruginosa y B. megaterium.	52
Tabla 16.- Resultados de incremento en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorción a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.....	54
Tabla 17.- Cepa 20D empleando el Pericarpio como fuente de carbono frente al control negativo como E. coli y dos controles positivos P. aeruginosa y B. megaterium.	55
Tabla 18.- Resultados de incremento en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorción a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.....	57
Tabla 19.- Cepa 20D empleando el Grano de soya como fuente de carbono frente al control negativo como E. coli y dos controles positivos P. aeruginosa y B. megaterium.	58

Tabla 20.- Cepas seleccionadas como mejores productoras de PHA con sus respectivos mejores fuente de carbono y las condiciones de producción.	59
Tabla 21.- Estimación de costos de los principales residuos agroindustriales (Programa de Investigación: PASTIZALES Y CULTIVOS FORRAJEROS N° de Proyecto: 3247132P, 2012).....	60
Tabla 22.- Datos de la biomasa de las diferentes cepas	61
Tabla 23.- Datos del productos agroindustrial empleado en las diferentes cepas	61
Tabla 24.- Datos obtenidos de la producción de PHA en las diferentes cepas	61
Tabla 25.- % de rendimiento respecto a Biomasa, Fuente de Carbono e inóculo	62
Tabla 26.- Biodegradación de los polímeros	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Micrografía electrónica de <i>Pseudomonas oleovorans</i> con gránulos de PHA (Berlanga et al. 2006).	4
Figura 2.- Estructura general de los polihidroxialcanoatos (Lee 1996).	5
Figura 3.- Ruta metabólica para la síntesis y degradación de PHB a partir de carbohidratos (Barbosa et al. 2005).	11
Figura 4.- Esquema de la metodología general para el desarrollo del presente proyecto	27
Figura 5.- Cluster de PHA de los microorganismos modelos de cada clase (Shah 2007)	29
Figura 6.- Ubicación de los sitios de muestreo Bustamante, La Cola de Caballo, Presa “La Boca”, Río “La Silla” y el lago artificial de Centrika en el Estado de Nuevo León. ..	37
Figura 7.- Frecuencia de las diferentes clases de sintasas.....	39
Figura 8.- Género de bacterias que contienen el gen <i>phaC II</i>	40
Figura 9.- Reguladores presentes en las bacterias con el gen <i>phaC II</i>	41
Figura 10.- Tinción Negro Sudán 0.04%	43
Figura 11.- Tinción Azul Nilo 1%	43
Figura 12.- Cepas ambientales con capacidad de crecimiento celular bajo estrés nutricional	44
Figura 13.- Incremento en la turbidez del cultivo 20C en Harinolina como resultado de estrés nutricional	48
Figura 14.- (A) <i>E. coli</i> con Harinolina 13 días (-), (B) 20D con Pericarpio 13 días (++) y (C) 21D con Grano de soya (+++)	49
Figura 15.- Incremento en la turbidez del cultivo 32A empleando el salvado como fuente de carbono.	52
Figura 16.- Incremento en la turbidez del cultivo 20D en Pericarpio como resultado de estrés nutricional.	55
Figura 17.- Incremento en la turbidez del cultivo 21D en Grano de soya como resultado de estrés nutricional.....	58
Figura 18.- Micrografías de la biomasa y polímero de <i>P. aeruginosa</i> (A), 21D (B) y <i>B. megaterium</i> (C).....	63
Figura 19.- Espectro de Infrarrojo del producto obtenido de la Cepa 21D	64
Figura 20.- Espectro Infrarrojo del producto obtenido por <i>B. megaterium</i>	65

Figura 21.- Espectro Infrarrojo del producto obtenido por <i>P. aeruginosa</i>	66
Figura 22.- Espectro de RMN del producto de la Cepa 21D.....	68
Figura 23.- Espectro de RMN del producto de <i>B. megaterium</i>	69
Figura 24.- Espectro de RMN del producto de <i>P. aeruginosa</i>	70
Figura 25.- Termograma de DSC del producto obtenido de la cepa 21D.....	71
Figura 26.- Termograma de DSC del producto obtenido de <i>B. megaterium</i>	72
Figura 27.- Termograma de DSC del producto obtenido de <i>P. aeruginosa</i>	72
Figura 28.- Extracción de DNA de la bacteria 21D	73
Figura 29.- Electroforesis en Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM corresponde a marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder	74
Figura 30.- Gel para cortar Bandas de PCR.....	75
Figura 31.- Fragmentos PCR 16S, aproximadamente 1000 pb, se cargaron 2.5ul, purificado con QiaGen.....	75
Figura 32.- Supervivencia de lombrices	76
Figura 33.- (A) Lombriz viva y (B) Lombriz sin vida	77
Figura 34.- Biodegradación del producto generado por la cepa 21D frente al PET.....	78

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1.- Introducción

El Tereftalato de polietileno mejor conocido como PET, es un tipo de materia prima plástica derivada del petróleo que fue descubierta por los científicos Británicos Whinfield y Dierson en el año 1941 (Van Wegen *et al.* 1998). Éste material se comenzó a emplear para el embasamiento de alimentos y embotellamiento de bebidas carbonatadas en el año de 1976 (Trollmo *et al.* 1989). El uso extensivo de este producto trae consigo, la generación de desechos que se acumulan en el ambiente, ya que una vez que los plásticos han sido utilizados, se convierten en desechos que forman parte de los residuos sólidos urbanos (RSU) (da Rosa *et al.* 2011). Además, estos desechos tienen la característica de que pueden permanecer inalterables en el ambiente por un período de tiempo entre 100 y 500 años (Hachi y Rodriguez 2010); esto se debe a que no fungen como fuente de carbono ni de energía para ningún organismo vivo. Por otra parte, su degradación es muy lenta y ésta consiste solamente en la fragmentación del envase en partículas más pequeñas, mismas que se distribuyen en los mares, ríos, sedimentos y suelos (Al-Sabagh *et al.* 2015).

A través de los años, se ha intentado atacar la problemática de la acumulación de plásticos en el ambiente por diversos procesos, como los de incineración, reciclaje, foto degradación o reúso, pero estas medidas presentan importantes desventajas, por lo que no se consideran como soluciones 100% efectivas (Wang *et al.* 2015). En la actualidad el plástico es un recurso de uso diario, de aquí nace el interés a nivel mundial de sustituir los plásticos derivados del petróleo por bioplásticos (Baghaee Moghaddam *et al.* 2015).

De esta manera, los polihidroxialcanoatos (PHA) están atrayendo mucho interés de los investigadores debido a sus propiedades físicas, la cuales presentan alta similitud a los termoplásticos convencionales, tales como polietileno (PE) y

polipropileno (PP) (Wang *et al.* 2015). Los PHA son biopolímeros sintetizados por microorganismos como un material de reserva de carbono y energía, almacenada en forma de gránulos en el citoplasma a los cuales se les denomina carboxomas (Chang *et al.* 2011). La acumulación de PHA en las bacterias ocurre cuando existe en el medio de cultivo una limitación de un nutriente esencial como N, P, Mg, O, K o S y en exceso de fuente de carbono (García *et al.* 2013).

La naturaleza propia del biopolímero, así como la especificidad de la enzima involucrada en la polimerización y las rutas metabólicas implicadas en la formación de dichos monómeros por parte de las bacterias productoras de PHA depende de la fuente de carbono que se les suministre (Hassan *et al.* 2013). De esta manera, las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los PHA, tales como rigidez, fragilidad, cristalinidad, elasticidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia, dependen de la composición monomérica del biopolímero (Stülten *et al.* 2008). Así, se pueden definir a los PHA como poliésteres lineales en los que la variabilidad de sus propiedades reside en la longitud y naturaleza de la cadena lateral de cada monómero, además de la proporción en que se encuentre cada tipo de monómero en el polímero final (Rai *et al.* 2011). Los polímeros de PHA pueden estar formados por monómeros de igual naturaleza (homopolímeros), o estar contruidos por más de un tipo de unidades monoméricas diferentes (heteropolímeros) (Braunegg *et al.* 1998). En función del número de carbonos que conforman la cadena lateral de los monómeros, los PHA se pueden clasificar en tres grupos: PHA de cadena corta (SCL-PHA) con $C \leq 5$, PHA de cadena media (MCL-PHA) con $6 \leq C \leq 14$, y PHA de cadena larga (LCL-PHA) con $C \geq 15$ (Höfer *et al.* 2011). Es importante destacar que los PHA de cadena corta son poliésteres rígidos y quebradizos, con un alto grado de cristalinidad y con propiedades mecánicas y térmicas similares a las del PP, y los PHA de cadena media presentan temperaturas de fusión y de transición vítrea más baja, una cristalinidad limitada y una gran flexibilidad (Gumel *et al.* 2012).

1.2.- Justificación

En 2012, la generación diaria de RSU en México se estimó en cerca de 103 mil toneladas (INEGI). A pesar de que el volumen nacional de generación de RSU es relativamente bajo en comparación con otros países, en México los sistemas municipales de recolección son insuficientes y deficientes, dado a que no existe la suficiente infraestructura para el reciclaje de los residuos de plástico (Gentil *et al.* 2011). Esto ha ocasionado un grave problema en México relacionado a la generación y acumulación de los envases PET desechados. Este residuo es considerado como el producto de desecho de mayor crecimiento en volumen, representando el 20% de la basura, equivalentes a 0.6 millones de toneladas anuales (Al-Sabagh *et al.* 2015). Aunque se ha intentado atacar la problemática de la acumulación de plásticos en el ambiente a través de diversos procesos del reciclaje dado que el plástico PET es 100% reciclable, en México solamente se recicla cerca del 20% del PET desechado (Baghaee Moghaddam *et al.* 2015).

Si se considera a México como el segundo consumidor a nivel internacional de la resina PET para la producción de botellas, y tomando como base la estimación de que para producir 1 tonelada de plástico PET se requieren 17 barriles de petróleo, por consiguiente, se puede calcular que México requiere 10.2 millones de barriles de petróleo anualmente para la producción anual nacional de envases elaborados con PET (Wang *et al.* 2015). Por ende, la búsqueda para la producción de bioplásticos derivados de PHA como sustituyente de los polímeros derivados del petróleo resulta de gran interés industrial y ambiental, sabiendo que la ventaja principal de estos biopolímeros es que pueden degradarse hasta un 80% en sólo siete semanas, sin requerir condiciones de composta (Bello *et al.* 2009).

Capítulo 2. ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades de los polihidroxicanoatos

Los PHA son biopolímeros no tóxicos, biodegradables, termoplásticos y biocompatibles, que son producidos de forma natural por un amplio rango de microorganismos (Lee 1996), en la Figura 1 se presenta la micrografía de células de *Pseudomonas oleovorans* con gránulos de PHA de manera intracelular. Estos biopolímeros son poliésteres lineales de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos sintetizados por las bacterias, en condiciones de desequilibrio nutricional, como reserva de carbono y energía que puede ser empleada por la célula cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables (Jacquel *et al.* 2008). La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante la condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster de allí que también se le conozca como biopoliésteres (Khanna y Srivastava 2005), en la Figura 2 se presenta la estructura general de los biopolímeros de la familia de los PHA. Los PHA pueden ser degradados intracelularmente por las propias bacterias que los acumulan y también por otros microorganismos que pueden hidrolizar, fuera de la célula, el material aislado (Sudesh *et al.* 2000).

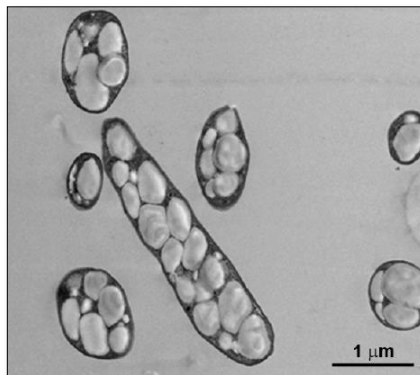


Figura 1.- Micrografía electrónica de *Pseudomonas oleovorans* con gránulos de PHA (Berlanga *et al.* 2006).

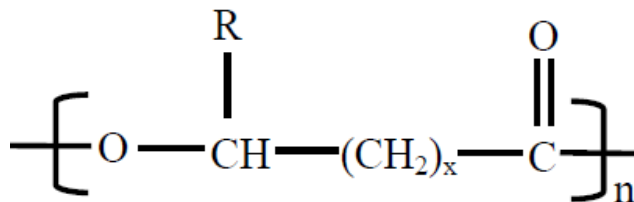


Figura 2.- Estructura general de los polihidroxicanoatos (Lee 1996).

2.2.- Historia de los polihidroxicanoatos

La observación al microscopio de los gránulos denominados carboxomas en células bacterianas se remonta al año 1888. El estudio para la determinación de la composición de estos gránulos se inició en el año 1926 por Maurice Lemoigne en *Bacillus megaterium* (Trollmo *et al.* 1989), quien en su investigación determinó al poli-3-hidroxibutirato (P3HB) como único componente del gránulo intracelular (Braunegg *et al.* 1998). Posteriormente, en el año 1958 Macrae y Wilkinson observaron que *B. megaterium* acumulaba el biopolímero cuando la relación carbono:nitrógeno del medio era alta (Gurieff y Lant 2007). En 1972, Wallen y Rohdwedder confirmaron la presencia de otros monómeros como 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxihexanoato (3HH) Y 3-hidroxihexanoato (3HHep), al extraer dichos compuestos con cloroformo (Annuar *et al.* 2007). Además, se observó que la degradación del mismo ocurría rápidamente cuando la bacteria se encontraba en ausencia de una fuente de carbono y energía exógena y la restauración de las condiciones nutricionales de fósforo (P) o nitrógeno(N) (Barbosa *et al.* 2005). Se concluyó que el P3HB era un material de reserva de carbono y energía que retardaba la autólisis y muerte de las células (Bello *et al.* 2009).

Sin embargo, el alto costo de la producción de los biopolímeros los llevo a ser ignorados por un largo tiempo. Las investigaciones sobre la producción de PHA retomaron importancia a causa de la crisis mundial del petróleo que se sufrió durante los años 70 (Van Wegen *et al.* 1998). Nuevamente en el 2004, la producción del petróleo disminuyó y el precio aumentó considerablemente,

además se ha tomado conciencia de que las reservas petrolíferas en el mundo se están agotando de manera alarmante (Castilho *et al.* 2009).

Tabla 1.- Principales monómeros que conforman los PHA producidos por microorganismos (Lee 1996).

Símbolo	Nombre del monómero	Tamaño de la cadena (# de carbonos)	Posición del grupo hidroxilo
3HP	Acido 3-hidroxi-propionico	3	3
3HB	Acido 3-hidroxi-butirico	4	3
3HV	Acido 3-hidroxi-valerico	5	3
3HHx	Acido 3-hidroxi-baxanoico	6	3
3HHp	Acido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Acido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Acido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Acido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Acido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Acido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Acido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Acido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Acido 4-hidroxi-butirico	4	4
4HV	Acido 4-hidroxi-valerico	5	4
4HHx	Acido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Acido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Acido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Acido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Acido 5-hidroxi-valerico	5	5
5HHx	Acido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Acido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

2.3.- Propiedades fisicoquímicas de los polihidroxicanoatos

En los años posteriores se continuó estudiando extensamente el P3HB en diferentes géneros de bacterias, tales como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Cyanobacterium*, entre otras (van Hee *et al.* 2006). Adicionalmente se estudiaron las propiedades físicas y químicas de este biopolímero, determinando su peso molecular, temperatura de fusión, cristalinidad, morfología del granulo, estipulando diferentes métodos de

extracción, enzimología, degradación y función fisiológica (Bhubalan *et al.* 2008). Esta etapa fue de gran interés debido a que se encontró la relación entre la biosíntesis de P3HB y el ambiente extracelular. Las condiciones que favorecen la síntesis de P3HB fueron identificadas como aquellas que daban lugar a altas concentraciones de NAD(P)H y acetyl-CoA, y baja concentración de coenzima-A libre. Se observó que estas condiciones variaban según el microorganismos, pero la biosíntesis del polímero siempre involucra un factor de limitación de crecimiento como N, P, S, O o Mg (Cavalheiro *et al.* 2009).

De esta manera, a la fecha se han identificado más de 150 monómeros distintos que pueden fungir como constituyentes de PHA, dando una gran variedad de propiedades y aplicaciones. A pesar de esto, el PHB sigue siendo el PHA más común sintetizado por bacterias, lo que lo hace ser el ampliamente estudiado dadas sus aplicaciones en la industria como bioplásticos para empaquetado y en la biomedicina como biomateriales compatibles con el tejido humano (Escapa 2012).

Tabla 2.- Propiedades físicas de diferentes tipos de PHA y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo (Bhubalan *et al.* 2008).

Polímero	Temperatura de fusión	Módulo de Young(Gpa)	Fuerza tensil (Mpa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
P(3HB) P(HB-co-3HV)	179	3.5	40	5	4
3 mol % 3HV	170	2.9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1.5	35	*	*
25 mol % 3HV P(3HB-co-4HB)	137	0.7	30	*	*
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1.7	34.5	400	45
Poliétileno-tereftalato	262	2.2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3.1	50	*	21
Nylon- 6.6	265	2.8	83	60	*

* Información no disponible

2.4.- Aplicaciones de los polihidroxicanoatos

En 1976 la empresa inglesa *Imperial Chemical Industries* (ICI) estudió la síntesis de P3HB en *Ralstonia eutropha*, y para 1981 patentaron la producción del copolímero de cuatro y cinco carbonos, denominado P(3HB-co-3HV) en una relación aproximada de 10% en moles de 3HB y 90% en moles de 3HV (Witholt y Kessler 1999). Esto resulta cuando las bacterias se encuentran frente a un exceso de oferta de carbono, pero una limitación de nitrógeno, fósforo u oxígeno. Como resultado, el tamaño de las bacterias comienza a expandirse por la acumulación de PHA, reflejándose en cambios morfológicos visibles (van Hee *et al.* 2006). Estos estudios concluyeron que las estrategias de control de la concentración de fosfato dirigidas mejoran eficazmente el rendimiento de la producción de los PHA (Li *et al.* 2014). Es importante destacar que este copolímero, conocido como BIOPOL®, es obtenido a partir de glucosa y ácido propiónico. A pesar de su alto costo, el BIOPOL® ha sido utilizado en varias aplicaciones en algunos países (Laycock *et al.* 2014).

Recientemente se realizó un estudio para evaluar la producción de PHA mediante la utilización de ácidos orgánicos sintéticos, así como de efluentes acidogénicos de un reactor de biohidrógeno utilizando *Pseudomonas otitidis*, una nueva cepa aislada del mismo proceso fermentativo (Tripathi *et al.* 2013). El co-biopolímero producido presentó un alto contenido de P3HB y P3HV (Reddy *et al.* 2003).

Las aplicaciones comerciales a corto plazo de los PHA se enfocan principalmente en las industrias médicas, de biomateriales y farmacéutica. Un ejemplo de esto es *Metabolix*, una empresa con sede en EUA la cual ha tenido éxito comercial con la incorporación de su bioplástico Mirel™ en la producción de contenedores de jardinería biodegradables y de alta calidad, así como en juguetes de playa ecológicos (Thakor *et al.* 2005). Por otra parte, la realización de PHA como reemplazo de plásticos no biodegradables derivados del petróleo todavía parece ser una meta a largo plazo. Sin embargo el elevado precio del petróleo y la creciente demanda de alternativas sostenibles han contribuido para motivar a los

investigadores a mejorar los procesos de producción de PHA a pesar de los obstáculos en el pasado a la comercialización (Agnew y Pflieger 2013).

2.5.- Vías de síntesis de los polihidroxicanoatos

El metabolismo de los PHA es muy complejo debido a que su acumulación es controlada por muchos genes, los cuales codifican una serie de enzimas que están directa o indirectamente involucrados en su síntesis. La vía de síntesis que ha sido altamente estudiada, es empleando como organismo modelo a *Ralstonia eutropha*, contiene tres enzimas principales: β -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH y PHA sintasa, codificadas por genes *phaA*, *phaB* y *phaC* (Salehizadeh y Van Loosdrecht 2004). Estos tres genes se encuentran juntos en un operón cuya expresión es constante. La fuente de carbono se convierte inicialmente en tioésteres de la coenzima A, a continuación, puede catalizar la condensación de dos monómeros de tioéster coenzima A (tal como un acetyl-CoA y un monómero propionil-CoA reductasa). Esto es seguido por una reducción para dar (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA reductasa ó (*R*)-3-hidroxi-valeril-CoA (catalizada por la acetoacetyl-CoA reductasa), que se convierte luego por la PHA sintasa en PHA (Rao *et al.* 2010). Las bacterias han desarrollado varias vías para la síntesis de PHA, dependiendo del nicho ecológico donde se desarrollen. También se ha visto que las condiciones de crecimiento influyen en la formación de los PHA (Jia *et al.* 2013).

Como se ha mencionado previamente, el PHA más estudiado es el PHB producido por la bacteria *R. eutropha*, por lo que la ruta de biosíntesis en este microorganismo a partir de carbohidratos ha sido descrita a detalle. En general, el proceso metabólico para la producción de PHA de cadena corta comienza a partir de acetyl-CoA, en una secuencia de tres reacciones catalizadas por las enzimas 3-cetotiolasa (acetyl-CoA acetyltransferasa, acetoacetyl-CoA reductasa, hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa, y la poli(3-hidroxi-butirato) sintetasa) (Akiyama *et al.* 2003). Las rutas metabólicas para la biosíntesis de P3HB también han sido estudiadas en otras bacterias y las enzimas involucradas en el proceso también

han sido caracterizadas (Ye *et al.* 2013). La enzima 3-cetotiolasa de bacterias como *Azotobacter beijerinckii*, *R. eutropha*, *Zooglea ramigera* y *Rhizobium japonicum* ha sido purificada y estudiada. Esta enzima ha mostrado ser la que controla la biosíntesis de P3HB en *R. eutropha*, con la CoA como el metabolito clave. Por su parte la enzima acetoacil-CoA reductasa ha sido investigada en las bacterias *Azotobacter beijerinckii*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Streptomyces coelicolor* (Wang *et al.* 2010).

Generalmente las bacterias que sintetizan PHB no producen PHA de cadena media. Con respecto a la ruta metabólica para la biosíntesis de PHA de cadena media, la mayoría de los intermediarios para la síntesis de PHA de cadena media se obtiene a partir de la β -oxidación (López-Cuellar *et al.* 2011).

En la β -oxidación se generan intermediarios como enoil-CoA, 3-cetoacil-CoA y el (S)-3-hidroxiacil-CoA. Estos son precursores de los monómeros de PHA (Sudesh *et al.* 2000).

Los ácidos grasos son degradados por la remoción de unidades de dos C como acetil-CoA. El resto de la vía oxida acil-CoA a 3-cetoacil-CoAs vía intermediarios 3-hidroxiacil-CoA (Verlinden *et al.* 2007). La especificidad de sustrato de la polimerasa de PHA de cadena media (mcl) oscila entre monómeros de 6 y 14 carbonos de (R)-3-hidroxi-alcanoil-CoAs, con preferencia hacia monómeros de 8, 9 y 10 carbonos (Haba *et al.* 2007). Aún no está determinado si el transporte de intermediarios de la β -oxidación, para la síntesis de PHA mcl es realizado por una epimerasa, 3-cetoacil reductasa o enoil-CoA hidratasa. La composición de estos polímeros está estrechamente relacionada con la fuente de carbono suministrada (Fernández *et al.* 2005).

En el proceso de producción de PHA, la provisión de 3-hidroxiacil-CoA tioésteres a la ruta metabólica, es decir la concentración de sustrato para la PHA sintetasa, es uno de los principales factores que determinan la masa molecular y la composición del biopoliéster, aunque también influye la existencia de despolimerasas, esterases o lipasas inespecíficas que hidrolicen el polímero ya

acumulado. Otro factor es el nivel de expresión de la proteína de PHA sintetasa activa (Reddy *et al.* 2003). Por su parte la composición del PHA depende estrictamente de la especificidad de sustrato de la PHA sintetasa y del potencial metabólico del microorganismo para proveer (R)- 3-hidroxiacil-CoA tioésteres a partir de la fuente de carbono empleada (Quintero *et al.* 2005). En la Figura 3 se muestra la ruta metabólica para la síntesis y degradación de PHB a partir de carbohidratos.

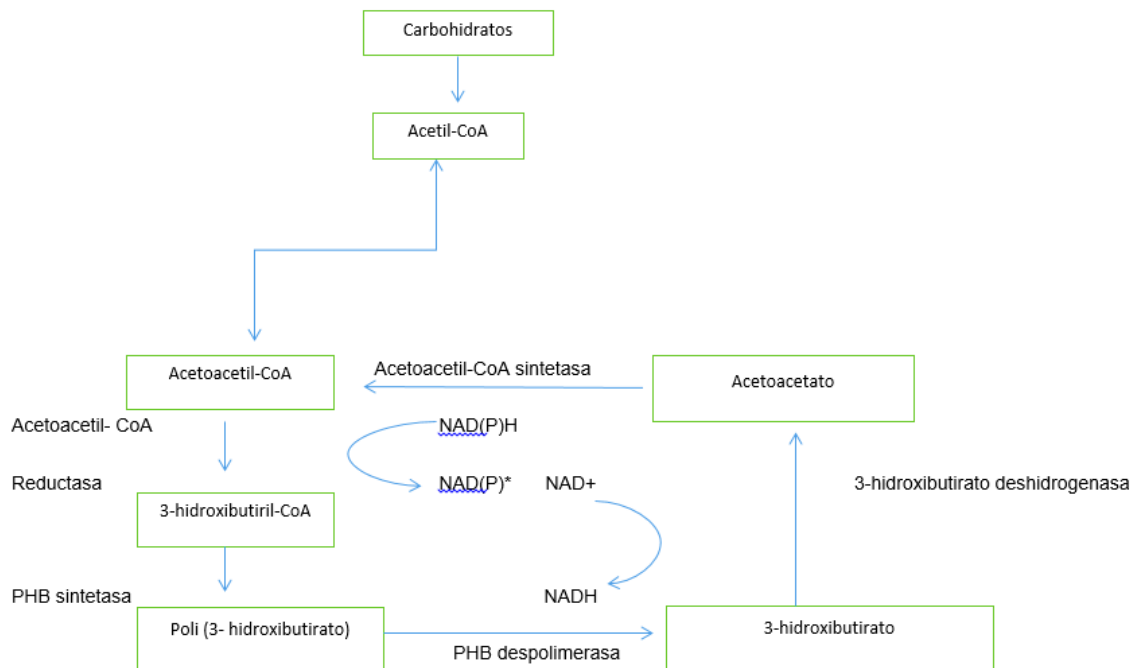


Figura 3.- Ruta metabólica para la síntesis y degradación de PHB a partir de carbohidratos (Barbosa *et al.* 2005).

2.6.- Clasificación de las sintetasas

Se han caracterizado 88 PHA sintetasas distintas, clasificándose en cuatro clases principales. La clase I utiliza los ácidos grasos con 3-5 átomos de carbono; clase II utiliza aquellos con 6-14 átomos de carbono; y las clases III y IV sintetizan cadenas de longitud corta.

En la reacción de despolimerización a la PHA acumulado se hidroliza en 3HB por la PHA despolimerasa (codificada por el gen *phaZ*), y luego se puede convertir

de nuevo en acetoacetil-coenzima (Laycock *et al.* 2014). El gen *phaZ* que codifica la proteína *PhaZ* se encuentra en medio de las sintetasas y su producto cumple una función fundamental, ya que los gránulos de PHA se forman en la célula como reserva de carbono y energía de esta manera cuando se necesita en los procesos celulares es fundamental la presencia de una enzima que degrade esta inclusión y es ahí donde la proteína *PhaZ* aparece (Tripathi *et al.* 2013). Esta proteína despolimerasa está relacionada estructuralmente con la familia de las esterases (Thakor *et al.* 2005). Estas enzimas catalizan la liberación de (R)-3-hidroxi-acil /aril -CoA derivados de polímeros intracelulares (Tanadchangsang *et al.* 2009). Se ubican en la superficie del gránulo e hidrolizan todas las inclusiones de PHA incluso los formados por monómeros poco usuales, lo que demuestra que actúa sobre gran cantidad de sustratos (Sudesh *et al.* 2000).

La principal ventaja de los polihidroxialcanoatos es su biodegradabilidad, y esto lo logran ya que los gránulos son hidrolizados por microorganismo que buscan en ellos fuentes de carbono y energía; lo hacen por medio de depolimerasas que son secretadas de las células y se adhieren a la superficie del polímero convirtiéndola en unidades de monómeros independientes (Urtuvia *et al.* 2014). El tiempo que demora la degradación depende de la naturaleza propia del polímero así como también de las condiciones ambientales a las que sean expuestos, se ha observado degradación de los PHA en gran cantidad de ambientes incluyendo aerobios, anaerobios, salinos, marinos y otros (Rao *et al.* 2010).

Con respecto a la P3HB sintetasa, se ha descubierto que en la mayoría de los casos está asociada con los gránulos de P3HB, como en el caso de *R. eutropha*, *R. rubrum*, *B. megaterium*, *A. beijerinckii* y *Z. ramigera* (Barbosa *et al.* 2005). También se ha encontrado que existen cuatro clases principales de PHA sintetasas (Thakor *et al.* 2005). Las clases I y II son enzimas que consisten en un solo tipo de subunidad (*PhaC*). Según su especificidad de sustrato, tanto in vivo como in vitro, la clase I utiliza preferentemente tioésteres-CoA de (R)-3-hidroxiácidos grasos de 3 a 5 átomos de carbono; mientras que las sintetasas

clase II usan tioésteres-CoA de (R)-3-hidroxiácidos grasos de entre 6 y 14 átomos de carbono. La clase III de PHA sintetasas son enzimas que tienen dos tipos diferentes de subunidades, la PhaC y la PhaE (Rao *et al.* 2010). Las PHA sintetasas de la clase IV se parecen a las de la clase III, pero en lugar de la subunidad PhaE tienen una subunidad PhaR. La polimerasa tipo III existe en *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa pennigii* y *Synechocystis sp.* Este tipo de enzima polimeriza principalmente hidroxiácidos de cadena corta, pero también puede polimerizar a los de cadena media (Reddy *et al.* 2003).

Uno de los estudios más detallados sobre la regulación de la síntesis de P3HB es el realizado en *A. beijerinckii*. Esta bacteria acumula P3HB bajo condiciones de limitación por oxígeno a partir de glucosa (Quintero *et al.* 2005). La clave del control de la síntesis en este microorganismo es el destino de la acetil-CoA, la cual puede ser oxidada vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) o puede servir como sustrato para la síntesis de P3HB. La ruta que tome la acetil-CoA depende de las condiciones ambientales, especialmente limitación por oxígeno cuando la relación NADH/NAD aumenta (Posada *et al.* 2011). Las enzimas citrato sintetasa y la isocitrato deshidrogenasa se inhiben por el NADH y en consecuencia la acetil-CoA no entra al CAT (ciclo de los ácidos trocarboxílicos) en la misma cantidad, por lo que es convertida a acetoacetil-CoA por la 3-cetotiolasa la que a su vez es inhibida por CoA. Cuando la cantidad de oxígeno es adecuada, la concentración de CoA es alta y la acetil-CoA entra al ciclo CAT mientras que la 3-cetotiolasa es inhibida y consecuentemente la síntesis de P3HB cesa (Barbosa *et al.* 2005).

Senior y Dawes (1971) propusieron que el P3HB servía no solamente como reserva de carbono y energía, sino que es un resumidero de poder reductor, considerado como un regulador redox dentro de la célula. Bajo condiciones de crecimiento limitadas por otros nutrientes se deja de sintetizar proteína y un proceso endergónico acoplado a la generación de ATP, vía la cadena de transferencia de electrones, podría dar lugar al incremento de la concentración intracelular de NAD(P)H, en cuanto a la degradación interna del gránulo de P3HB,

es también es un mecanismo complejo que requiere de la acción de varias despolimerasas (Luzardo *et al.* 2012).

2.7.- Detección de los gránulos de PHA

Tradicionalmente la detección de gránulos de PHA en células microbianas se ha llevado a cabo por medio de la tinción con el colorante lipofílico Negro Sudán B, debido a la naturaleza lipídica de los PHA (Spiekermann *et al.* 1999). Sin embargo, actualmente existen otros colorantes que tienen mayor afinidad y especificidad por compuestos de naturaleza lipídica entre los que destaca el azul Nilo A (cloruro de 5-amino-9-dietilamino-benzo [alfa] fe nazonio), que pertenece a la familia de las oxazinas y que presenta una fluorescencia naranja a una longitud de onda de 460 nm (Berlanga *et al.* 2006). El Rojo Nilo (7-diethylamino-3,4-benzofenoxazina-2-ona) es también un colorante excelente para la detección de inclusiones intracelulares de este tipo. Los gránulos de PHA una vez teñidos presentan una fluorescencia que va del amarillo-dorado (excitación de 450-500 nm) al rosa-rojo (excitación de 515-560 nm) (Akiyama *et al.* 2003).

Por otro lado, la detección de PHA intracelular también puede llevarse a cabo mediante espectroscopia de infrarrojo (FT-IR). Los espectros de PHA con esta técnica exhiben un pico alrededor de los 1730 cm^{-1} correspondiente al enlace éster carbonilo característico de los PHA (Jacquel *et al.* 2008).

2.8.- Condiciones de formación de los gránulos de PHA

En cuanto a las estrategias de fermentación, el medio de cultivo debe contener compuestos orgánicos de bajo peso molecular; de naturaleza mono-o disacáridos y/o ácidos orgánicos (Bosco y Chiampo 2010). De esta manera, el empleo de fuentes de carbono como carbohidratos, aceites, alcoholes, ácidos, alcanos, o el uso de fuentes de carbono crudas como las mieles de caña y remolacha, aceites vegetales o hidrolizados de carbohidratos de yuca y maíz (Morgan-Sagastume *et al.* 2010) pueden influir positivamente en la reducción de

los costos de producción de los PHA ya que sus precios son mucho más accesibles que aquellos sustratos carbonados puros (Bello *et al.* 2009).

Dado a que los PHA pueden ser producidos por cultivos microbianos mixtos, se han buscado ya consorcios microbianos con capacidad de utilizar materias primas de los desechos o excedentes (Albuquerque *et al.* 2010), aunque uno de los principales retos en este modelo, es la utilización de materias primas reales para obtener un biopolímero con una composición consistente para asegurar propiedades constantes (Duque *et al.* 2014). Esto fue demostrado manteniendo constantes las condiciones de operación del proceso, donde el polímero producido tuvo una composición constante, dependiente de la materia prima utilizada (Villano *et al.* 2014).

2.9.- La producción de PHA en cultivos mixtos

La producción de PHA basado en cultivos mixtos abiertos ha sido una propuesta como un medio para reducir los costes de producción y no esterilización de reactores (Singh *et al.* 2011). La síntesis de PHA en cultivos mixtos se observó por primera vez en 1974 en las plantas de tratamiento de aguas residuales diseñadas para eliminación biológica de fósforo (EBPR) (Van Wegen *et al.* 1998). La mayor producción de cultivo mixto se basa en la buena selección de las condiciones ecológicas que favorecen a los organismos con elevada capacidad de almacenamiento de PHA, así como el consorcio microbiano (Morgan-Sagastume *et al.* 2010). Uno de los métodos es enriquecer el proceso de fermentación de los microorganismos de acumulación de PHA mediante la adopción de condiciones alternantes a través de un número de ciclos en condiciones aeróbicas y otros ciclos en condiciones anaeróbicas en este caso se enriquecen selectivamente (Koutinas *et al.* 2007) y (Xu *et al.* 2010)

Por otra parte, los ácidos grasos volátiles (AGV) se pueden almacenar fácilmente como PHA por cultivos mixtos, por lo que la mayoría de los estudios sobre la producción de PHA por cultivos mixtos se han llevado a cabo utilizando ácidos

orgánicos (tales como acetato, propionato, butirato y valerato) como materia prima (Davis *et al.* 2013). Los ácidos grasos son sustratos energéticamente ventajosos desde el punto de vista metabólico, ya que en la β -oxidación genera más energía química equivalente de la oxidación completa de un mol de la glucosa (Simon-Colin *et al.* 2008). Una ventaja importante de la producción de PHA de cultivo mixto es la oportunidad de utilizar los desechos de bienes fermentados como materia prima en lugar de sustratos sintéticos (Li *et al.* 2014), ya que los costos de sustrato son conocidos por ser un factor crítico en la determinación de la economía de la producción de PHA (Baskaran *et al.* 2013). El uso de materia prima de bajo costo, tales como melaza de caña de azúcar (Albuquerque *et al.* 2010), efluentes de las plantas de papel fermentado, aceite de girasol saponificado, frutas, verduras, efluentes de fábricas de conservas, lodos municipales fermentados, alimentos fermentados, aguas residuales industriales y domésticos (Bengtsson *et al.* 2010), fermentados de efluentes de fábricas de aceite de oliva han dado como resultado hasta el momento un gran éxito en la acumulación de PHA (CAI *et al.* 2009), y hay una base de conocimiento creciente en el uso de otras materias primas tales como alcoholes y glicerol (Campanari *et al.* 2014).

Una amplia gama de composiciones de PHA se puede producir fácilmente utilizando cultivos mixtos basados en diferentes materias primas, con otras unidades de monómero tales como 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxi-2-metilbutirato (3H2MB), 3-hidroxi-2-metilvalerato (3H2MV) y 3-hidroxihexanoato (3-HHX) siendo componentes comunes en P (3HB) (Tamisa *et al.* 2014). Por el contrario, los cultivos puros a menudo necesitan grandes cantidades de co-sustratos para producir polímeros con pequeñas fracciones de monómeros distintos de P (3HB) (Lee *et al.* 2008), por ejemplo, para producir de 2 a 8 % moles de HV se necesitaron mezclas que contienen cantidades iguales de aceites vegetales y ácido propionico (Leong *et al.* 2014). Esto puede ser debido al hecho de que los cultivos mixtos contienen una diversidad de microorganismos que son propensos a emplear una variedad de vías de producción de PHA

(Thakor *et al.* 2005). Se necesita más investigación para entender el efecto de los factores de control clave como estrategia de alimentación y la microestructura en cultivos mixtos, ya que pueden tener efectos muy diferentes en estas condiciones en comparación con el cultivo puro para la producción de PHA (Albuquerque *et al.* 2007).

Dados los múltiples microorganismos y posiblemente también las vías de producción de PHA presentes en un entorno de cultivo mixto, una de las cuestiones clave será la distribución de la composición del polímero producido y el efecto de estas composiciones de mezcla sobre propiedades fisicoquímicas y mecánicas (Bhubalan *et al.* 2008).

2.10.- Otras técnicas de producción

Fotosíntesis alimentada es un sistema de producción basado en plantas para la producción de PHA esta técnica ha estado bajo intensa investigación en los últimos años (van Hee *et al.* 2006). Poirier demostró por primera vez este enfoque en 1992 usando *Arabidopsis* transgénica que expresa acetoacetyl-CoA reductasa y PHB sintasa de *Ralstonia eutropha* (Samorì *et al.* 2015). El desarrollo comercial de los procesos de producción de PHA de origen vegetal ya está en marcha, aunque todavía queda mucha investigación por hacer (Sawant *et al.* 2015). Por ejemplo, Metabolix ha estado desarrollando tecnologías en una gama de plantas transgénicas, como el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Chang *et al.* 2011). Las investigaciones preliminares también están en marcha en la producción de PHA usando microalgas (Jacquel *et al.* 2008).

Por último, los PHA pueden ser sintetizados a partir de los propiolactonas sustituidos usando, por ejemplo, de aluminio o de zinc alquilo (Banković-Ilić *et al.* 2012). Sin embargo, este proceso tiene costo muy elevado para la producción a gran escala e implica el uso de reactivos tóxicos (Canadas *et al.* 2014).

La principal barrera para la producción comercial y la aplicación de PHA es el alto costo de la fermentación bacteriana, elevando hasta aproximadamente 15 veces más caros que los polímeros derivados del petróleo tales como el polipropileno (Silva *et al.* 2014). La producción industrial de PHA se determina por el costo del sustrato. El análisis del ciclo de vida para la producción de PHA indicó que los sustratos constituyen una parte significativa del costo de producción de PHA (Bhubalan *et al.* 2008). Por lo tanto, los investigadores están tratando de encontrar nuevos sustratos que permitan la producción de plásticos renovables para ser competitivos en el mercado mundial de los plásticos (Koller *et al.* 2012).

2.11.- Sustratos para la producción de PHA

La selección de las fuentes de carbono debe centrarse no sólo en los precios de mercado, sino también de la disponibilidad continua y la coherencia global de precios. Además, fuentes de carbono de bajo costo, tales como residuos agrícolas y subproductos industriales pueden incurrir en costos adicionales debido a pre-tratamiento de pasos, tiempos de cultivo extendidas, y la purificación (Chanprateep 2010).

La selección de la corriente de desechos apropiado como materia prima para fines biotecnológicos depende principalmente de la región global donde se llevara a cabo la producción industrial de PHA (Cheng *et al.* 2010). Los costos de producción de PHA serán menores, si la planta de producción se integrara con las líneas de producción existentes, donde la materia prima sea directamente de flujos de residuos (Kung *et al.* 2007). Uno de los sustratos prometedores, que se podrían transformar en PHA es suero de queso, un producto secundario de la industria lechera (Jiang *et al.* 2012). El suero de queso contiene lactosa, lípidos y proteínas solubles y está disponible en grandes cantidades en las industrias lecheras (Kampire *et al.* 2011). En muchos países de Europa del suero es producto excedente, por lo tanto, el gasto para la producción de PHA podría ser un valor añadido (Ntaikou *et al.* 2014). En el 2006 se empleó el suero de leche para la síntesis de PHA utilizando *E. coli* recombinante K24K, los resultados

obtenidos revelaron que la aplicación de este sustrato puede conducir a la producción de PHA con una concentración de 72,9 %, por otro lado *Cupriavidus necator* DSM 545 recombinante fue capaz de sintetizar P3HB utilizando suero de leche hidrolizada como fuente de carbono (Nduko *et al.* 2012). También se ha utilizado la cepa de *Thermus thermophilus* HB8 para la acumulación de PHA y alcanza una concentración de 35% (Pantazaki *et al.* 2009).

El almidón, uno de los productos más importantes sintetizados por las plantas, también puede ser utilizado como sustrato viable alternativo para la producción eficiente de PHA (Majid *et al.* 1999). El almidón se compone principalmente de dos polímeros diferentes de glucosa, amilosa y amilopectina (Koller *et al.* 2012). La mayoría de los procesos para la producción de PHA a base de almidón requieren la conversión de almidón a sustratos fácilmente convertibles tales como glucosa por hidrólisis enzimática o química (Jia *et al.* 2013). La cepa de *Halofera mediterranei* alcanza una concentración de PHB de 55,6% en una fermentación de alimentación discontinua empleando la mezcla de salvado, arroz extruido y maíz (Haba *et al.* 2007). Las aplicaciones de almidón de yuca hidrolizado describieron que *B. megaterium* acumula PHB a una concentración de 29,7%. Por otra parte, otros documentos describen la producción de PHA en base al almidón de papa procedente de residuos (Chen *et al.* 2013).

La melaza, un subproducto de la producción de azúcar, está ampliamente disponible, es una fuente de carbono de bajo costo para la producción de PHA. Porque, contiene casi el 45% de sacarosa y azúcares simples que podría ser considerado como sustrato ideal para la fermentación bacteriana (Salehizadeh y Van Loosdrecht 2004). Uno de los primeros informes sobre la producción de PHA utilizando la melaza fue escrito en 1992 (Sawant *et al.* 2015). El autor informó, que incluso se puede acumular hasta un 25% de P (3HB) empleando la cepa de *A. vinelandii* en un medio a base de melaza (Gouda *et al.* 2001). De acuerdo con ello *B. megaterium* es capaz de acumular hasta un 46,2% de P (3HB) empleando melaza de caña de azúcar (Davis *et al.* 2013). Empleando

otras bacterias que son genéticamente modificadas para sintetizar PHA utilizando melaza, los autores describen la acumulación por *Klebsiella aerogenes* de aproximadamente el 50% de P(3HB) en la masa celular (Zribi-Maaloul *et al.* 2013).

Estudios más recientes indican la capacidad de *E. coli* recombinante para producir PHA utilizando la melaza como fuente de carbono, los autores muestran que la cepa utilizada permitió producir hasta 30.6% de PHA, que es superior al rendimiento obtenido por esta misma cepa cuando se suministró la sacarosa (25%) (Bengtsson *et al.* 2010). El otro subproducto de la industria de la caña de azúcar es el bagazo, que contiene principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina (Cavalheiro *et al.* 2009). Debido al alto nivel de fibras, este material debe ser tratado antes de ser utilizado (Yu y Stahl 2008). Empleando la cepa de *Ralstonia eutropha* y utilizando bagazo hidrolizado para la síntesis de PHA se acumula el 57% del biopolímero (Gurieff y Lant 2007).

El glicerol crudo que es el principal subproducto de la producción de biodiesel, puede ser utilizado por las bacterias como una fuente de carbono de bajo costo para la producción de PHA (Banković-Ilić *et al.* 2012). La cepa de *C. necator* DSM 545 acumula hasta un 68.8% de PHA utilizando residuos de glicerol (Carvalho *et al.* 2014). La concentración de PHB alcanzó el 50% de peso seco de células, cuando el contenido de nitrógeno es limitado (John *et al.* 2001). El glicerol crudo también fue utilizado como sustrato en la producción de PHB-HV copolímero por *Haloferax mediterranei*. En este trabajo, la concentración de PHA más alto se obtuvo con el glicerol en bruto (16.2%) que el glicerol puro (13.4%) (Kim *et al.* 2003). Mientras que Kawata y Aiba en el 2010 informaron que *Halomonas* sp. utiliza glicerol puro más eficazmente que otras formas de residuos en la producción de PHB, aunque el contenido de glicerol inicial del cultivo de glicerol puro 2% era casi la misma que la de residuos de glicerol 3%.

Recientemente, se reveló que la harina de semillas de oleaginosas como subproducto de la industria de biodiesel podrían ser utilizado con éxito para la producción de PHA (Merlino *et al.* 2013). Los estudios que aplican fermentaciones fed-batch de *C. necator* DSM 545 utilizando hidrolizados de harina de colza como suplemento de nutrientes han demostrado que las bacterias son capaces de sintetizar hasta un 55,6% de P (3HB-co-3HV) (García *et al.* 2013). Los mismos resultados han sido reportados con la misma cepa cuando el medio de fermentación se complementa con hidrolizados de harina de girasol (Krueger *et al.* 2012).

Varios miembros de la familia de las gramíneas se han probado para la producción de bioplásticos. Se ha examinado el potencial de una biorrefinería a base de trigo para la producción de PHA (Koutinas *et al.* 2007) y (Xu *et al.* 2010). En el primer informe, Koutinas y colaboradores mostraron que el trigo hidrolizado mezclado con extracto de hongos podría producir hasta 51.1% de PHB empleando *Cupriavidus necator* (Cerrone *et al.* 2015).

Recientemente, la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) se ha propuesto como una materia prima para la producción de PHB (Ye *et al.* 2013). Según los autores, es posible utilizar el hidrolizado de alcachofa de Jerusalén, pero el medio de fermentación debe ser enriquecida con suplementos ricos en nutrientes (Yadira y Ria 2010).

2.12.- Los aceites vegetales como fuentes de carbono

Los aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de palma y aceite de maíz son fuentes de carbono para la producción de PHA deseables ya que son relativamente más barato que la mayoría de los azúcares (Akiyama *et al.* 2003). Se informó de que el rendimiento teórico de la producción de PHA a partir de ácidos grasos es 0,65 g/g, mientras que el rendimiento teórico de la producción de PHA a partir de glucosa oscila entre 0,30 y 0,40 g/g (Chanprateep 2010). La composición química de los aceites vegetales incluye ésteres

completos de glicerina y ácidos monocarboxílicos más altos por lo tanto son sustratos de excelencia para la producción de bioplásticos por fermentación microbiana (Baghaee Moghaddam *et al.* 2014). La demanda de aceites vegetales ha aumentado rápidamente en la última década, principalmente como resultado de un mayor consumo de aceites comestibles y el desarrollo de la industria del biodiesel (Berlanga *et al.* 2006). La producción mundial de aceites vegetales sigue aumentando por otra parte, en un futuro próximo se podrían producir grasas de desecho por "biocatálisis no convencional" o por microorganismos oleaginosos (Bhubalan *et al.* 2008).

Capítulo 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1.-Hipótesis

Bacterias nativas del Estado de Nuevo León son capaces de producir polihidroxicanoatos de propiedades fisicoquímicas similares a plásticos convencionales bajo condiciones controladas de laboratorio, empleando fuentes de carbono provenientes de productos agroindustriales.

3.2.- Objetivo general

Aislar, caracterizar e identificar bacterias nativas del Estado de Nuevo León capaces de producir polihidroxicanoatos de propiedades fisicoquímicas similares a plásticos convencionales, empleando productos agroindustriales como fuente de carbono.

3.3.- Objetivos específicos

1. Realizar un análisis bioinformático para conocer la distribución de los distintos tipos de PHA sintasas en las bacterias reportadas en bases de datos.
2. Realizar un muestreo de diferentes zonas del Estado de Nuevo León para la generación de un cepario de bacterias que serán evaluadas para su capacidad biológica de producción de PHA.
3. Realizar un screening de la capacidad biológica de producción de PHA por bacterias del cepario generado empleando el acetato de sodio como fuente de carbono.
4. Realizar un screening con las cepas seleccionadas para la producción de PHA empleando fuentes agroindustriales.

5. Producir y caracterizar el PHA obtenido por la bacteria seleccionada y comparar las propiedades fisicoquímicas frente a polímeros convencionales.
6. Identificar el microorganismo productor de PHA seleccionado mediante el análisis nucleotídico de la región 16s.
7. Realizar pruebas de biodegradación y toxicidad del producto generado del producto generado.

Capítulo 4. LOCALIZACIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Localización

Los experimentos del presente trabajo fueron desarrollados principalmente en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas (CELAES). Además, se contó con el apoyo de diversos laboratorios donde se realizaron ensayos específicos. Entre estos se encuentra el Laboratorio Central de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT), el Laboratorio de polímeros del Centro de Investigación de Química Analítica (CIQA).

4.2.- Materiales y equipo

En las tablas 3 y 4 se presentan los reactivos, materiales y los equipos que se utilizaron en el desarrollo del presente proyecto.

Tabla 3.- Reactivos utilizados

Nombre
Azul Nilo 1%
Negro Sudán 0.04%
Cloroformo
Hipoclorito de sodio 5%
Etanol 96%
Metanol
Acetato de sodio
Cloruro de sodio
Cloruro de potasio
Citrato de hierro de amonio
Sulfato de magnesio heptahidratado
Solución traza
Vitaminas
Productos agroindustriales

Tabla 4.- Resumen de los equipos que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto

Nombre	Marca/Modelo
Material de vidrio	Pyrex y Kimax
Espectro de infrarrojo	IR Brunner Tensor 27
Espectrofotómetro UV/VIS	Thermo Spectronic/400114
Calorimetría Diferencial de Barrido	Perkin Elmer Sapphire DSC
Resonancia Magnética Nuclear	Tesla Bruker Avance III
Microscopio de fluorescencia	Leica/DM3000
Microscopio Binocular	Carl Zeiss/KF2
Liofilizadora	Thermofisher/FR.Drying
Sonicador	Fisher Scientific/FB120
Balanza Analítica	Ohaus/PA214
Centrífuga Refrigerada	Thermoelectron/Centra CL3R
Microcentrífuga	Eppendorf/5415D
Campana de Bioseguridad nivel II	Babconco/clase II
Autoclave	AESA/CV300
Incubadora con agitación	SHEL-LAB/1575
Estufa de secado	Thelco/17

4.3.- Disposición de residuos generados

Tabla 5.- Residuos generados durante el desarrollo del presente proyecto

Residuos mayores	Colectores
Colorantes para tinción (Negro Sudan, Rojo Nilo)	Colorantes y Lugol
Medios de cultivo líquidos post-esterilización	Drenaje
Medios de cultivo sólidos post-esterilización	Bolsa roja

Todo residuo generado no considerado en la tabla anterior será clasificado de acuerdo al documento de Procedimientos para clasificación de residuos peligrosos PR-CLB-SRR/000 de la Facultad de Ciencias Químicas. De esta manera, se busca que todo procedimiento y residuo generado en este proyecto sea compatible con los procedimientos del Departamento de Manejo y Control de Residuos de nuestra facultad.

4.4.- Estrategia general del proyecto

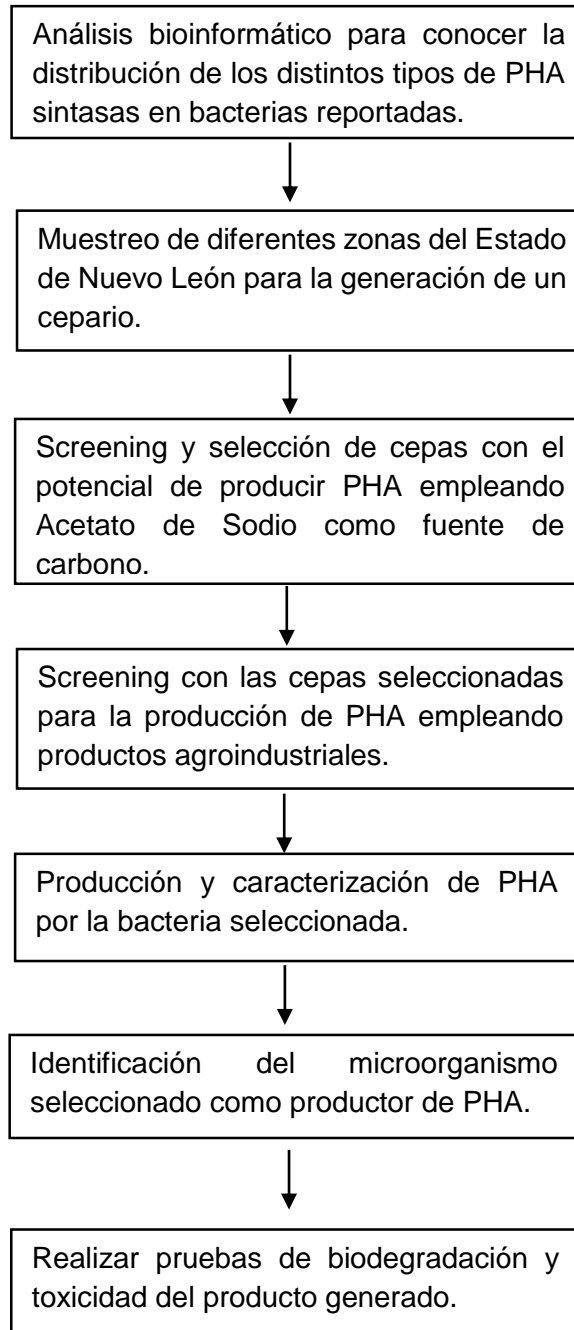


Figura 4.- Esquema de la metodología general para el desarrollo del presente proyecto

El presente proyecto de investigación dio inicio con la recolección de muestras de suelo, agua y sedimentos de diferentes regiones del Estado de Nuevo León para el posterior aislamiento de microorganismos y así probar la capacidad de estos a producir PHA. Las regiones de muestreo fueron: La cola de caballo y Presa “La Boca” del municipio de Villa de Santiago, Municipio de Bustamante, Lago artificial de Centrika, Río “La Silla” del municipio de Monterrey.

4.6.- Aislamiento de microorganismos por el método de diluciones en serie y siembra por estrías en placa

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento fue el caldo y agar Bouillon Lennox, este medio incluye diversos sustratos que son utilizados por los microorganismos como fuente de energía para su crecimiento y metabolismo. Primeramente, para la selección de los microorganismos más eficientes se incubaron las muestras en caldo LB a 28°C, 150 rpm/48 hrs. Todo el proceso se realizó en condiciones aerobias. Posteriormente con un asa bacteriológica, se pasa una porción de la muestra a la superficie del agar LB y se siembra en el medio por estrías cruzadas. Se aislaron las diferentes colonias microbianas que se lograron observar en las placas y una porción de cada colonia se pasó al caldo LB como cultivo puro. Después de una incubación apropiada, se empleó la técnica de tinción de Gram, el cual se observó al microscopio para verificar que es puro.

4.7.- Búsqueda bioinformática de enzimas involucradas en el metabolismo de PHA

Se realizó un estudio bioinformático para conocer la distribución de las enzimas involucradas en la producción y acumulación de PHA en organismos previamente secuenciados a manera de establecer potenciales candidatos para la producción de estos biopolímeros. Entre las enzimas estudiadas se encuentran la PHA sintasa (PhaC), PHA depolimerasa (PhaZ) y la fasinasa (PhaP). Para realizar esta búsqueda se empleó el Análisis de Alineación Básica (BLAST), utilizando como criterio de búsqueda los siguientes datos: Algoritmo: blastp (protein-protein

BLAST), Base de datos: Refseq – protein, Valor E: 1 x 10⁻⁹⁹, Matriz: Blosum 62 y Costos: Existencia 1, Existencia 14.

A manera de establecer las familias o clases de las enzimas encontradas, se procedió a la construcción de árboles filogenéticos empleando para esto el software Mega 6, usando el método estadístico Neighbor-Joining.

Tabla 6.- Diferentes clases de Sintetas y los microorganismos modelos

PhaC I	<i>Ralstonia eutropha</i>	Suriyamongkol <i>et al.</i> 2007	GI: 113867451
PhaC II	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Suriyamongkol <i>et al.</i> 2007	GI:397883931
PhaC III	<i>Allochromatium vinosum</i>	Suriyamongkol <i>et al.</i> 2007	GI:118132680
PhaC IV	<i>Bacillus megaterium</i>	Steinbuechel <i>et al.</i> 2009	GI: 675479523

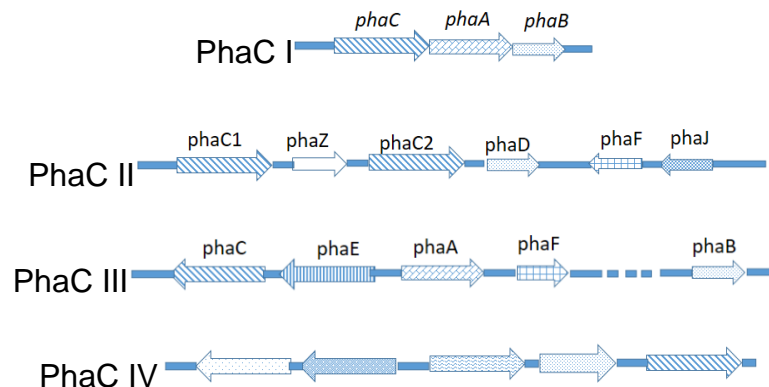


Figura 5.- Cluster de PHA de los microorganismos modelos de cada clase (Shah 2007)

4.8.- Screening de producción de PHA empleando acetato de sodio como fuente de carbono

Se realizaron ensayos que permitieron confirmar la capacidad biológica para producir y acumular PHA. Primeramente, las cepas fueron reactivadas en caldo LB a 37 °C/24 hrs. y 150 rpm, después de este periodo de tiempo se midió la densidad óptica a 620 nm; se realizaron cálculos de $C_1V_1=C_2V_2$ para poder

obtener el volumen inicial de la cepa en caldo LB a una concentración final de 0.05 nm en 5 ml del Medio Mineral Mínimo (MMM), una vez teniendo el volumen inicial de la cepa ésta se centrifuga para obtener el pellet el cual es añadido al MMM previamente preparado en el Laboratorio, las condiciones de experimentación fueron a 37°C/48 hrs. y 150 rpm. Al término de este periodo de tiempo se midió la densidad óptica para verificar si existe un aumento en la turbidez del cultivo, lo cual indica la producción de gránulos de PHA como consecuencia del estrés nutricional en el que se encuentran. Se empleó como medio de cultivo el MMM, cuya formulación permite controlar las condiciones nutricionales según sean requeridas. Este medio fue enriquecido con acetato de sodio como fuente de carbono y se probó la limitación en fosforo. El ensayo le fue realizado a 118 cepas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Biotecnología I.

Para confirmar la presencia de los gránulos de PHA, se empleó como técnica preliminar la tinción con Negro Sudán al 0.04%, el colorante se deja actuar durante 40 minutos con el frotis posteriormente es lavado con etanol al 96% y observados al microscopio óptico. Las cepas positivas se tiñeron de una coloración morado y las negativas se observan sin ninguna coloración; para la confirmación de la presencia de estos gránulos se optó por la tinción con el Azul Nilo al 1%, en esta técnica el colorante se añade al pellet de la cepa y se lleva a baño maría a 60°C/10 minutos posteriormente se lava el pellet dos veces con agua y una con ácido acético. El frotis se observó por microscopia de fluorescencia; las cepas productoras de PHA se aprecia claramente la emisión de fluorescencia que indica la presencia de PHA.

Finalmente fueron realizados análisis estadísticos para poder seleccionar las mejores cepas como productoras de PHA.

4.9.- Screening de producción de PHA empleando residuos agroindustriales como fuente de carbono

Las cepas que fueron capaces de producir turbidez dado a cambios morfológicos fueron re-inoculadas y evaluadas para la producción de PHA empleando diferentes fuentes de carbono las cepas seleccionadas como buenas productoras de PHA fueron las identificadas como 32A, 20C, 20D Y 21D; y como fuente de carbono se utilizó el grano de soya, harina de soya, ácidos grasos, harinolina, salvado, avena, pericarpio, pulido, maíz molido, cascara de soya, sorgo y acetato de sodio como control. Los criterios de selección fueron los mismos que se utilizaron en el punto 4.7 empleando el acetato de sodio como fuente de carbono, la medición de la densidad óptica y la detección de los gránulos por microscopia de fluorescencia. Las condiciones de experimentación fueron las siguientes: 37°C/150 rpm, los muestreos fueron a los 6 y 13 días, todos los experimentos se realizaron por triplicado en volumen de 5 ml del MMM con su correspondiente fuente de carbono.

Se realizaron análisis estadísticos para seleccionar la mejor cepa como productora de PHA y la mejor fuente de carbono, utilizando residuos agroindustriales.

4.10.- Detección de los gránulos de PHA por Microscopia de Fluorescencia

La acumulación del biopolímero en bacterias evaluadas fue monitoreada a través de la tinción específica para PHA con el colorante Azul Nilo al 1%. De esta manera, se visualizaron los carboxomas por medio de un microscopio de fluorescencia que se basa en la luz de una fuente de longitud de onda múltiple que se selecciona por medio de un filtro que solo permite el paso de la radiación de la longitud de onda deseada. Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz por fluorescencia de una longitud de onda específica. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte

pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.

4.11.- Producción de PHA utilizando la cepa 21D y dos controles positivos, empleando el grano de soya como fuente de carbono

Una vez encontrada la bacteria con capacidad de producir PHA empleando algún residuo agroindustrial como fuente de carbono, se precedió a acumular el biopolímero a mayor escala. Se seleccionó la cepa 21D y como fuente de carbono el grano de soya, también se utilizaron dos controles positivos: *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus megaterium*. Las condiciones de producción fueron las mismas que se utilizaron en el screening anterior, pero el cultivo se dejó en incubación hasta 13 días, esto debido a los datos obtenidos en el subcapítulo 4.7, a los trece días la cepa alcanza el punto máximo de producción todo el experimento se llevó a cabo por triplicado.

Se empleó la técnica de peso seco para obtener los datos de producción del biopolímero y así poder comparar frente a los controles positivos. Para el ensayo se emplearon matraces de 250 ml con 50 ml del MMM y 3.33 g de grano de soya, se le añadió una concentración de 0.05 de la cepa a cada matraz; se llevó a peso constante el residuo y la cepa para tener el peso seco inicial del residuo, una vez pasado el tiempo establecido para la experimentación se filtró el residuo utilizando gasas previamente llevadas a peso constante, de igual manera se llevó a peso constante el residuo con la gasa para tener el peso seco final de éste y así poder reportar el % de rendimiento respecto a residuo. Después de filtrar el residuo se mezcló bien todo el cultivo y luego centrifugar para obtener la biomasa la cual también se llevó a peso constante para tener los datos de % de rendimiento respecto a bacterias, se empleó el mismo procedimiento para las tres cepas, la 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*.

4.12.- Extracción y purificación del biopolímero producido por las cepas: 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

Para la extracción del biopolímero se empleó la técnica propuesta por (Moreno *et al.* 2006). Utilizando 1 ml de hipoclorito de sodio comercial al 5% (p/v) y 1 ml de cloroformo al 50% por cada 0.02 g de biomasa liofilizada. La mezcla se llevó a ultrasonificación cuatro pulsos de un minuto y dejando un descanso de dos minutos entre cada pulso. Para poder tener una buena separación de las fases se centrifuga a 4,300 rpm/25 minutos esto con el fin de separar la fase orgánica que es en donde se encuentra nuestro biopolímero. Una vez separada la fase ésta se evapora hasta un volumen de 10 ml y se precipita el biopolímero adicionando una concentración de 1:10 de fase orgánica y metanol frío, se deja reposar la mezcla por 12 horas a 4°C. El precipitado se filtra y se seca a temperatura ambiente durante 24 horas. Para la purificación del biopolímero se empleó hexano destilado y acetona se llevó a cabo un lavado con cada uno de éstos solventes.

Se emplearon datos del punto 4.9 para realizar cálculos y reportar el % del biopolímero producido por cada cepa empleando el grano de soya como fuente de carbono.

4.13.- Detección de los gránulos de PHA mediante SEM

Para la visualización directa de los carboxomas intracelulares se empleó la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), esta técnica permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando una micrografía con información morfológica del material analizado. En las micrografías se observan distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para su caracterización. Para esta técnica se empleó la biomasa liofilizada, ya que las bacterias aún presentan polímero de manera intracelular.

4.14.- Caracterización de los biopolímeros producidos por las cepas: 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

La identificación de grupos funcionales de los biopolímeros obtenidos se llevó a cabo mediante Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{HMRN}$) de 500 MHz, utilizando cloroformo deuterado como solvente para la disolución de las muestras. Para conocer el comportamiento térmico de los biopolímeros se empleó la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) realizando experimentos de 25 a 300 °C en atmósfera de N_2 a una velocidad de 10 °C/min.

4.15.- Identificación de género y especie de la bacteria seleccionada como productora de PHA

Con el fin de identificar a la bacteria productora de PHA con características termomecánicas similares a los plásticos convencionales, se realizó una extracción de DNA de la misma y se realizó la secuenciación completa del genoma por técnicas moleculares de la bacteria identificada como 21D.

Los primers utilizados fueron los reportados por (Souza *et al.* 2006):

F515 (Forward) 5'-GCG GAT CCT CTA GAC TGC AGT GCC AGC AGC CGC GGT AA-3'

R1492 (Reverse) 5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT-3'

Se llevó a cabo la alineación de los primers para verificar si amplifican; esto se llevó a cabo en el Primer Blast, ubicada en el sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Se confirmó que amplifica 16s RNA mt (mitochondrial) aproximadamente 1000pb. Para la reacción de PCR utilizada se añadió aproximadamente 100 ng de DNA bacteriano, 1x PCR Buffer

Promega, 1.65 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP'S, 0.5 μM de cada primer, 2 unidades de Taq Polimerasa promega.

La programación de PCR fue de: 94°C/4 minutos, 35 ciclos de 92°C/1,5 minutos, 50°C/1,5 minutos, 72°C/2 minutos y extensión final a 72°C por 10 minutos, (Termociclador miniMJ de Biorad).

Se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% buffer TBE1X teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 g/ml para su visualización mediante luz UV en transiluminador.

Se cargaron 50 μl del producto de PCR en el gel de agarosa 1% para purificarlo. Se realizó la electroforesis y las bandas de aproximadamente 1000 pb fueron cortadas con bisturí para purificar el producto de PCR del 16s mediante un kit de purificación de producto de PCR desde geles de agarosa (minelute gel extraction kit de QiaGen).

Posteriormente se analizaron 2.5 μl del producto de PCR puro por electroforesis en gel de agarosa 1%. Las muestras fueron cuantificadas mediante espectrometría en microvolumen con (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer), utilizando 1.5 μl del ADN obtenido.

A partir de las muestras puras y utilizando los primers mencionados anteriormente se realizó la secuenciación mediante el método de Sanger.

4.16.- Realización del ensayo de biodegradación y toxicidad del producto generado por la cepa 21D

Para el llevar acabo el ensayo de biodegradación y toxicidad fue necesario emplear lombrices las cuales fueron donadas por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se empleó tierra de jardín la cual fue pesada y se emplearon 50 g para cada experimento ésta fue humedecida con agua desionizada y colocada en un recipiente de plástico, también se pesaron las lombrices para tener el peso inicial. El producto generado

por la cepa 21D, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus megaterium* fueron colocados en recipientes separados para llevar acabo la experimentación. Como control negativo se empleó la 2-cloroacetamida y como control positivo una fruta que fue la pera.

Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Colecta de las muestras de suelo, agua y sedimento

En la figura 6 se indican los cinco sitios donde fueron recolectadas las diferentes muestras ambientales. En la tabla 6 se indican las claves con que fueron registradas en el cepario y el lugar de donde fueron obtenidas las cepas aisladas para el ensayo biológico para la producción de PHA.

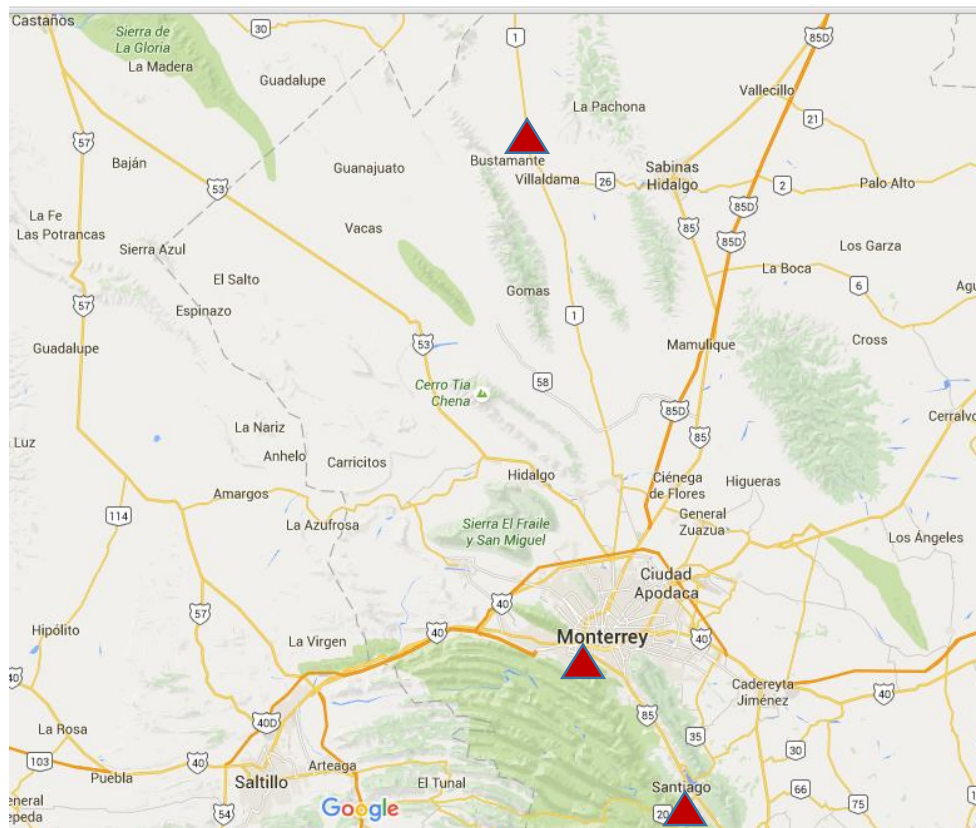


Figura 6.- Ubicación de los sitios de muestreo Bustamante, La Cola de Caballo, Presa “La Boca”, Río “La Silla” y el lago artificial de Centrika en el Estado de Nuevo León.

Tabla 7.- Claves de las cepas aisladas de las muestras y ubicación geográfica de las regiones de muestreo.

Clave	Lugar de colecta	Coordenadas (Latitud, Longitud y Elevación)
09A-09S	M009-Bustamante, NL	26.5343082, -100.5055369, 463 m
10A-10H	M010-Bustamante, NL	26.5343082, -100.5055369, 463 m
11A-11W	M011-Bustamante, NL	26.5343082, -100.5055369, 463 m
12A-12N	M012-Bustamante, NL	26.5343082, -100.5055369, 463 m
13A-13D	M013-Bustamante, NL	26.5343082, -100.5055369, 463 m
14A-14M	M014-Bustamante, NL	26.5343082, -100.5055369, 463 m
15A-15Y	M015-Cola de Caballo, NL	25.3849784, -100.161222, 649 m
16A-16Z	M016-Cola de Caballo, NL	25.3849784, -100.161222, 649 m
17A-17V	M017-Cola de Caballo, NL	25.3849784, -100.161222, 649 m
18A-18F	M018-Presa "La Boca", NL	25.4212934, -100.1339164, 450 m
19A-19N	M019-Presa "La Boca", NL	25.4212934, -100.1339164, 450 m
20A-20J	M020-Rio "La Silla", NL	25.5874333, -100.2508556, 591 m
21A-21E	M021-Lago artificial "Centrika", NL	25.6975515, -100.3062925, 533 m
30B-30D	M030-Presa "La Boca", NL	25.4212934, -100.1339164, 450 m
31A-31G	M031-Presa "La Boca", NL	25.4212934, -100.1339164, 450 m
32A-32D	M032-Presa "La Boca", NL	25.4212934, -100.1339164, 450 m
35G	M035-Boca de Potrerillos, NL	26.044924, -100.637531, 684 m

5.2.- Modelos teóricos sobre los genes y mecanismos de control presentes en las vías metabólicas de producción de PHA

Se realizaron modelos teóricos para la búsqueda de bacterias reportadas que contienen los genes encargados de sintetizar PHA y los reguladores que activan la producción de los biopolímeros, esto con el fin de poder diseñar el ensayo biológico.

5.2.1.- Frecuencia de las diferentes clases de sintasas

Después de realizar el análisis bioinformático por BLAST, se encontró que existen cuatro diferentes clases de PHA sintasas. La clase tipo II es la que produce PHA de composición variable donde se puede encontrar el PHA de interés para el presente proyecto que tenga las propiedades fisicoquímicas similares a los plásticos convencionales, sin embargo, en esta clase solo se encuentra el 14% de bacterias secuenciadas con el gen *phaC II*. Las clases I, III y IV producen PHA de calidad inferior para los fines de este proyecto.

En la Figura 7 se presenta la frecuencia de las diferentes clases de sintasas y en la Tabla 7 se presentan los homólogos reportados de cada clase.

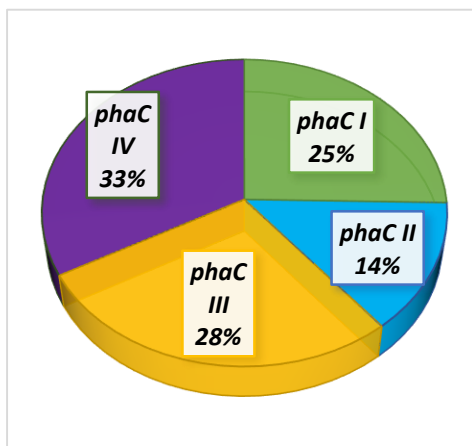


Figura 7.- Frecuencia de las diferentes clases de sintasas

Tabla 8.- Clases de sintasas y homólogos reportados

Clase de sintasas	Homólogos reportados
<i>phaC I</i>	210
<i>phaC II</i>	114
<i>phaC III</i>	232
<i>phaC IV</i>	273

5.2.2.- Género de bacterias que contienen el gen *phaC II*

En la figura 8 se observa el porcentaje obtenido de las principales cepas pertenecientes al gen *phaC II*, donde se puede observar que el 60% de las cepas pertenecen al género de *Pseudomonas* este resultado coincide con lo reportado en el 2003 por Reddy (Reddy *et al.* 2003).

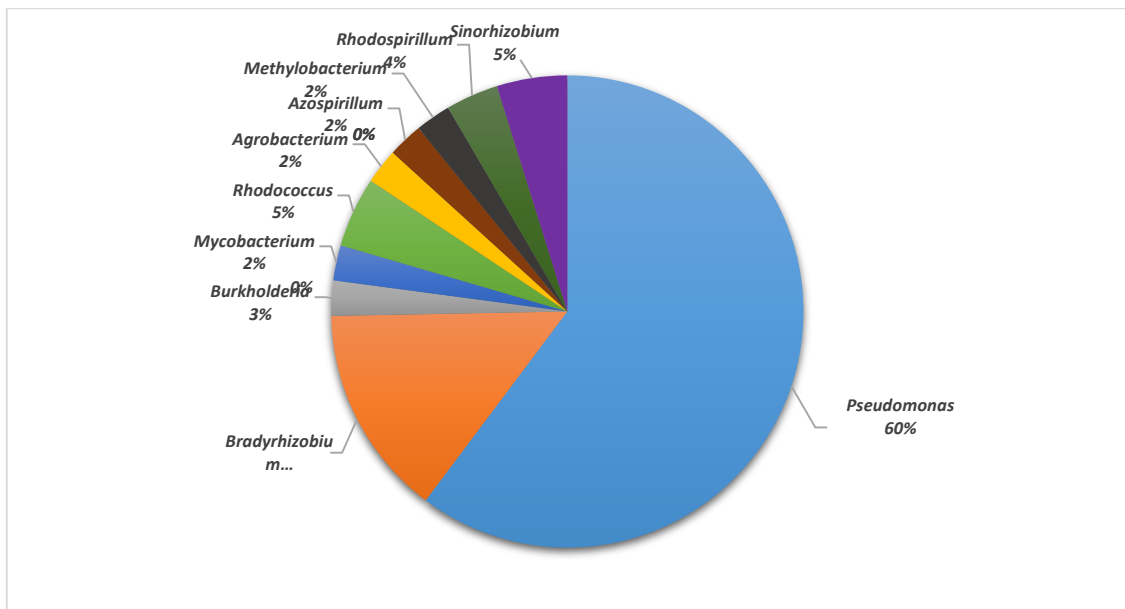


Figura 8.- Género de bacterias que contienen el gen *phaC II*

5.2.3.- Tipo de reguladores presentes en las bacterias que contienen el gen *phaC II*

Se realizó una búsqueda de los reguladores presentes en las cepas pertenecientes a la clase tipo II, este resultado fue de gran importancia debido a que los reguladores son los encargados de activar la síntesis de PHA y en cada microorganismo este proceso se lleva de manera diferente de acuerdo al regulador presente. La Figura 9 muestra el porcentaje de los cinco reguladores presentes en las bacterias de la clase tipo II, donde se observa que los regulares AcrR y TerR son los más representativos y en la Tabla 8 se describen sus funciones, lo cual justifica la importancia del análisis teórico antes de los ensayos biológicos para el diseño del medio de cultivo adecuado para inducir la producción de PHA.

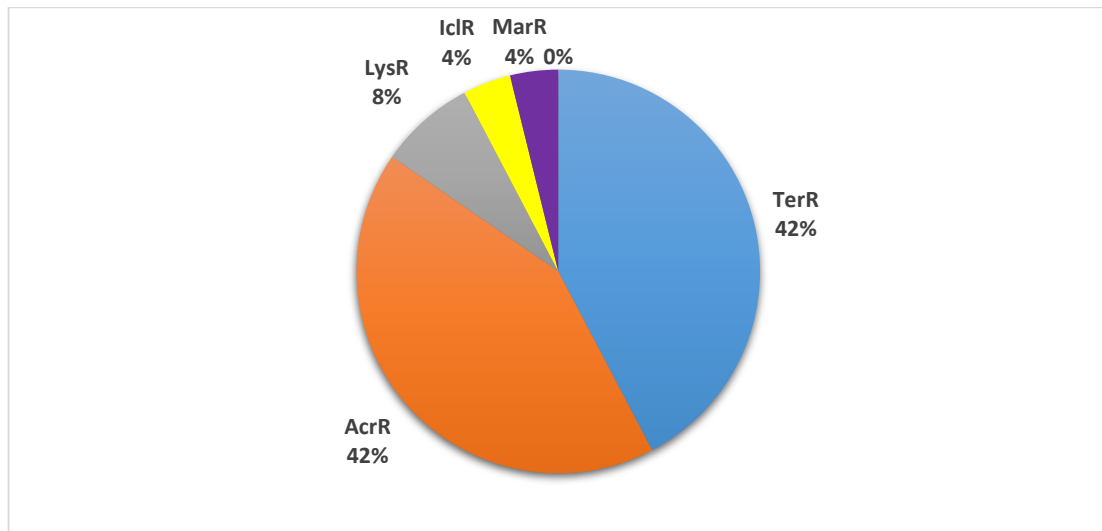


Figura 9.- Reguladores presentes en las bacterias con el gen *phaC II*

Tabla 9.- Funciones de los principales reguladores presentes en las bacterias con el gen *phaC II*

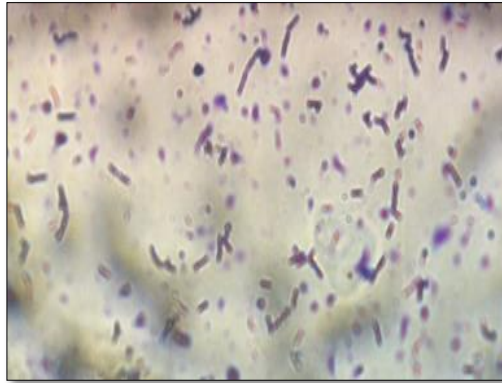
Regulador	Acción	Funciones
AcrR	Represor	Biosíntesis de antibióticos, bomba de expulsión y el estrés osmótico.
TerR	Represor	Biosíntesis de antibióticos, bomba de expulsión y el estrés osmótico.

5.3.- Selección de las bacterias productoras de PHA con acetato de sodio como fuente de carbono

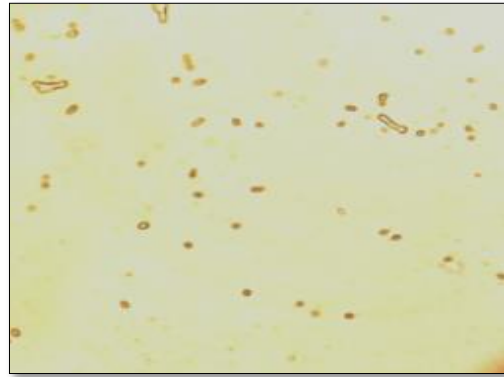
El proyecto dio inicio con 254 cepas aisladas de las diferentes muestras colectadas, de las cuales a 118 se le realizaron ensayos biológicos, donde se pudo observar que 65 cepas fueron capaces de producir algún tipo de biopolímero de la familia de los PHA.

Los criterios de selección para una bacteria candidata productora de PHA fueron los siguientes.

- Tinción Negro Sudán al 0.04% observadas por microscopio óptico: Las bacterias positivas a producir PHA presentan una coloración morada (Figura 10 A), y las bacterias que son negativas a producir PHA no presentan coloración (Figura 10 B).
- Tinción Azul Nilo 1% por microscopia de fluorescencia: En las bacterias candidatas a producir PHA se observan los gránulos brillosos (Figura 11 A) y las negativas no presentan emisión de fluorescencia (Figura 11 B).

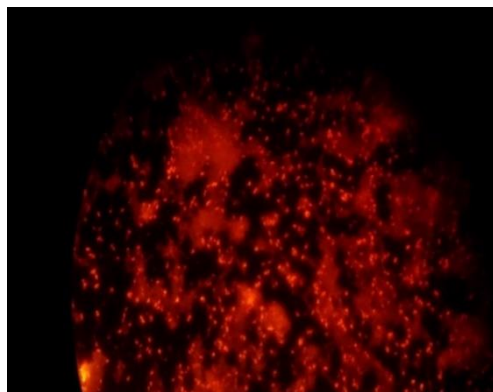


(A)

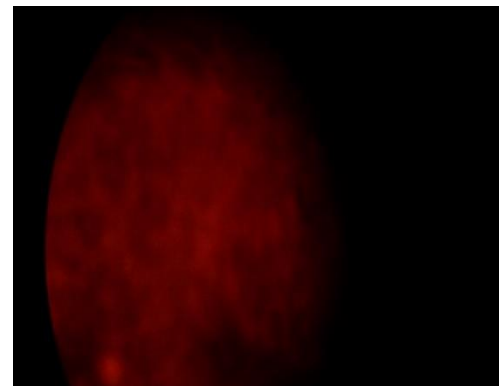


(B)

Figura 10.- Tinción Negro Sudán 0.04%



(A)



(B)

Figura 11.- Tinción Azul Nilo 1%

Se realizaron análisis estadísticos de criterio de decisión sobre el promedio de ambas poblaciones, donde se observó que el promedio de las bacterias productoras de PHA es mayor al de bacterias no productoras, esta diferencia es estadísticamente significativa. Los resultados se resumen en la Figura 12.

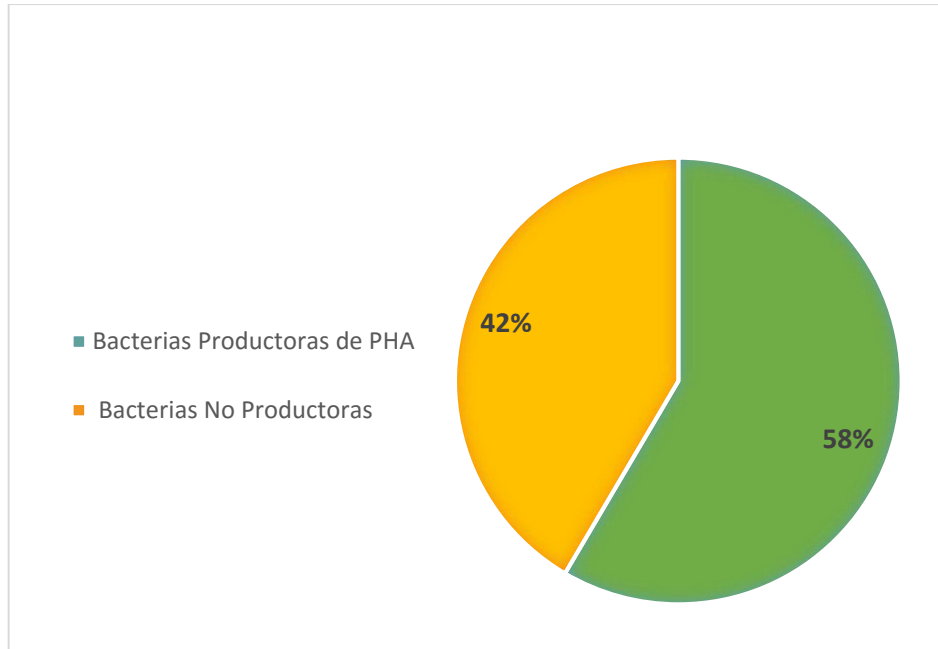


Figura 12.- Cepas ambientales con capacidad de crecimiento celular bajo estrés nutricional

5.4.- Producción de PHA con productos agroindustriales como fuente de carbono

Se seleccionaron las cuatro mejores cepas bacterianas de acuerdo a los análisis estadísticos, esto para continuar con la segunda etapa del ensayo biológico empleando diferentes fuentes de carbono para la producción de PHA. En la tabla 10 se muestran las cepas seleccionadas y en la Tabla 11 se pueden observar las diferentes fuentes de carbonos que fueron empleados para este ensayo.

Tabla 10.- Cepas seleccionadas como mejores productoras de PHA y los controles positivos y negativo

Cepas seleccionadas
<ul style="list-style-type: none"> • 20C • 32A • 20D • 21D
Controles
<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> (-) • <i>P. aeruginosa</i> (+) conPHAsintasa tipo II • <i>B. megaterium</i> (+) con PHA sintasa tipo I

Tabla 11.- Productos agroindustriales empleados como fuentes de carbono

Residuo agroindustrial
<ul style="list-style-type: none"> • Maíz molido • Pericarpio • Harina de soya • Grano de soya • Cascara de soya • Mezcla de aceites (ajonjolí, aguacate, cártamo) • Aceite de cacahuete • Sorgo • Salvado • Harinolina • Avena • Aserrín • Acetato

5.4.1.-Pruebas de capacidad de la cepa 20C para producir PHA con productos agroindustriales

La cepa 20C fue capaz de producir al menos un biopolímero bajo las condiciones establecidas en este proyecto empleando los productos agroindustriales mencionados en la Tabla 5.5 como fuente de carbono. En la Tabla 5.6 se observan los datos obtenidos en los diferentes días de experimentación, donde los valores de DO obtenidos son aceptables, sin embargo, esta DO no es determinante para la confirmación de la presencia de gránulos de PHA. Para verificar la producción de gránulos de PHA se realizaron tinciones con el colorante Azul Nilo 1%, a manera de ejemplo en la Tabla 5.7 se muestran los datos obtenidos de la cepa 20C con harinolina (destacado en gris en la tabla) comparando con *P. aeruginosa* y *B. megaterium* como controles positivos y *E. coli* K12 como control negativo.

Tabla 12.-Tabla de resultados de incrementos en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorbancia a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.

CEPA	Fuentes de carbono	DO Inicial del cultivo en MM-NP	DO del cultivo a 6 días en MM-NP	DO del cultivo a 13 días en MM-NP
20C	Acetato	0.061 ± 0.024	0.080 ± 0.039	0.104 ± 0.044
20C	Maíz molido	0.086 ± 0.001	0.202 ± 0.032	0.177 ± 0.046
20C	Pericarpio	0.093 ± 0.016	0.128 ± 0.020	0.127 ± 0.060
20C	Grano de soya	0.094 ± 0.036	0.145 ± 0.049	0.221 ± 0.051
20C	Cascara de soya	0.093 ± 0.017	0.154 ± 0.061	0.276 ± 0.126
20C	Harina de soya	0.078 ± 0.017	0.145 ± 0.046	0.185 ± 0.078
20C	Ácidos grasos	0.077 ± 0.014	0.117 ± 0.053	0.120 ± 0.054
20C	Cacahuete	0.035 ± 0.022	0.048 ± 0.019	0.077 ± 0.006
20C	Sorgo	0.120 ± 0.022	0.182 ± 0.011	0.227 ± 0.022
20C	Pulido	0.029 ± 0.023	0.101 ± 0.007	0.136 ± 0.029
20C	Avena	0.091 ± 0.012	0.150 ± 0.043	0.237 ± 0.133
20C	Salvado	0.099 ± 0.011	0.135 ± 0.011	0.169 ± 0.018
20C	Harinolina	0.045 ± 0.017	0.046 ± 0.021	0.105 ± 0.082

Tabla 13.- Resultados de la tinción con Azul Nilo 1% de la Cepa 20C empleando la Harinolina como fuente de carbono frente al control negativo *E. coli* y dos controles positivos *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

CEPAS	AZUL NILO
20C	+++
<i>E. coli</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	++
<i>B. megaterium</i>	+

En la Figura 13 se observa la gráfica del incremento de la turbidez de la cepa 20C frente a los controles. La cepa 20C empieza con un valor de turbidez de 1.0 y se mantiene durante los primeros seis días ya partir de ahí se observa un leve incremento, *E. coli* actúa de manera similar al 20C, mientras que la *P. aeruginosa* y *B. megaterium*, actúan de manera semejante, alcanzando un máximo de producción a los 8 días, y una disminución significativa a los 12 días.

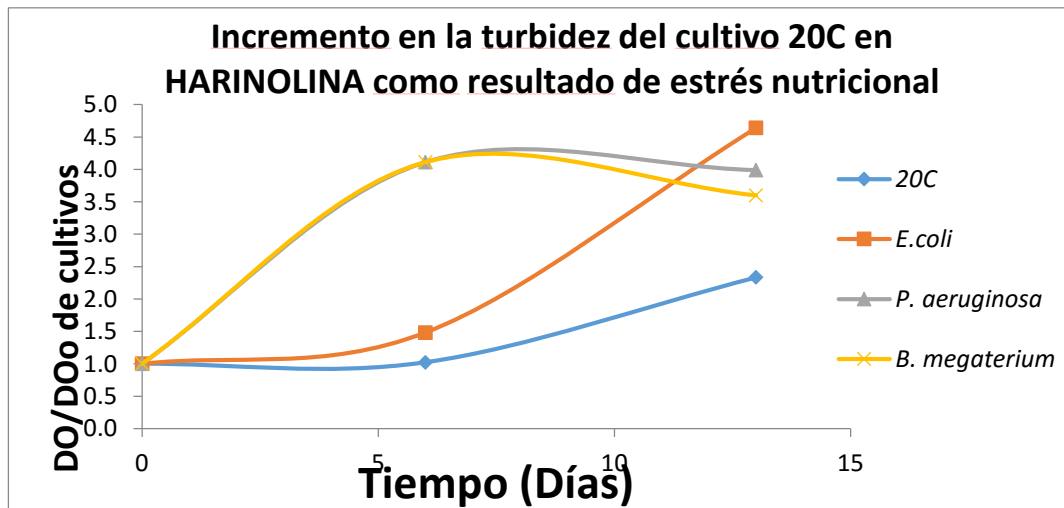


Figura 13.- Incremento en la turbidez del cultivo 20C en Harinolina como resultado de estrés nutricional

Las imágenes de La Figura 14 A, B y C, muestran los gránulos por microscopia de fluorescencia de las cepas *E. coli* K12 con harinolina (negativa), 20D con pericarpio (positiva ++) y 21D (positiva +++). Donde se visualizan los gránulos de PHA a una escala de 1 a 3 (+++), mediante microscopia electrónica a 40X.

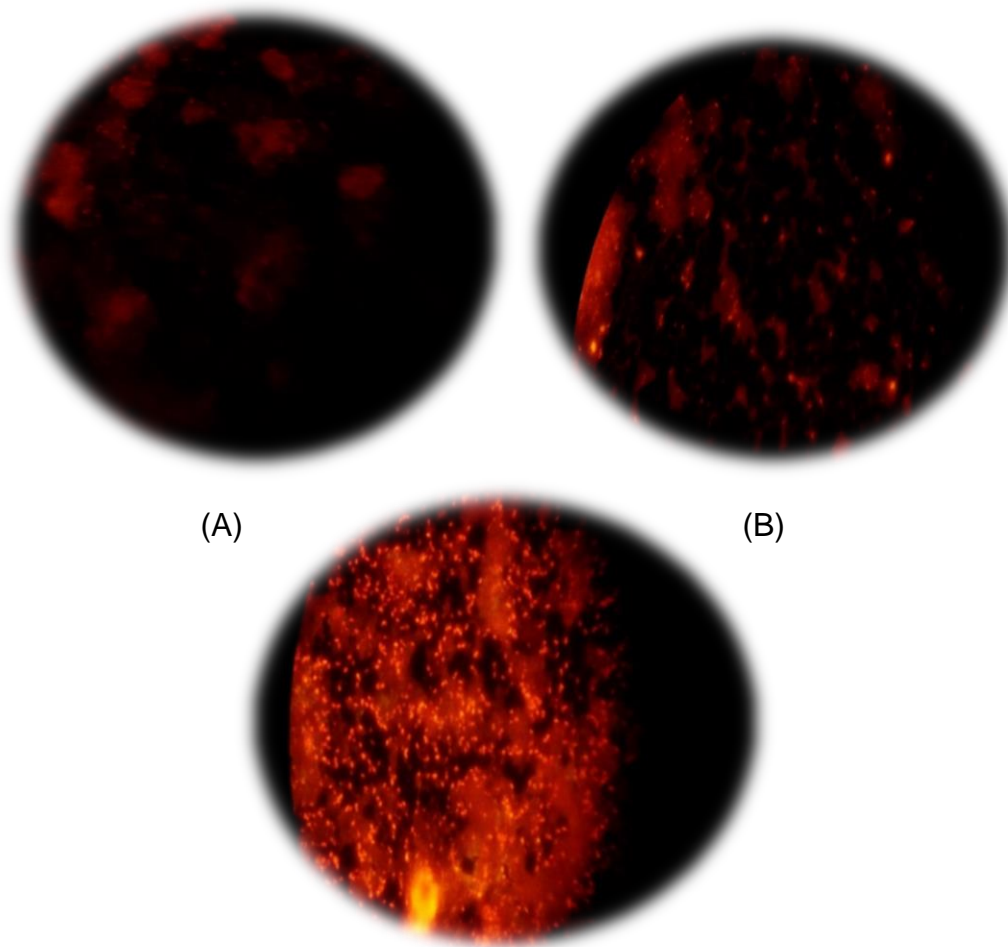


Figura 14.- (A) *E. coli* con Harinolina 13 días (-), (B) 20D con Pericarpio 13 días (++) y (C) 21D con Grano de soya (+++)

5.4.2.- Prueba de capacidad de la cepa 32A para producir PHA empleando productos agroindustriales

La cepa 32A fue capaz de producir al menos un biopolímero bajo las condiciones establecidas en este proyecto empleando los productos agroindustriales mencionados en la Tabla 11 como fuente de carbono. En la Tabla 14 se observan los datos obtenidos en los diferentes días de experimentación, donde los valores de DO obtenidos son aceptables, sin embargo, esta DO no es determinante para la confirmación de la presencia de gránulos de PHA. Para verificar la producción de gránulos de PHA se realizaron tinciones con el colorante Azul Nilo 1%, a manera de ejemplo en la Tabla 14 se muestran los datos obtenidos de la cepa 32A con salvado comparando (destacado en gris) con *P. aeruginosa* y *B. megaterium* como controles positivos y *E. coli* K12 como control negativo.

Tabla 14.- Tabla de resultados de incremento en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorción a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.

CEPA	Fuentes de carbono	DO Inicial del cultivo en MM-NP	DO del cultivo a 6 días en MM-NP	DO del cultivo a 13 días en MM-NP
32A	Acetato	0.027 ± 0.002	0.058 ± 0.026	0.058 ± 0.021
32A	Maíz molido	0.041 ± 0.025	0.048 ± 0.024	0.083 ± 0.057
32A	Pericarpio	0.095 ± 0.016	0.022 ± 0.008	0.027 ± 0.016
32A	Grano de soya	0.075 ± 0.021	0.096 ± 0.020	0.110 ± 0.055
32A	Cascara de soya	0.034 ± 0.006	0.171 ± 0.030	0.077 ± 0.016
32A	Harina de soya	0.113 ± 0.025	0.166 ± 0.022	0.129 ± 0.003
32A	Acidos grasos	0.029 ± 0.008	0.040 ± 0.016	0.040 ± 0.012
32A	Cacahuete	0.040 ± 0.018	0.052 ± 0.014	0.078 ± 0.023
32A	Sorgo	0.025 ± 0.014	0.121 ± 0.011	0.054 ± 0.015
32A	Pulido	0.022 ± 0.010	0.088 ± 0.030	0.067 ± 0.020
32A	Salvado	0.031 ± 0.008	0.054 ± 0.020	0.150 ± 0.026
32 ^a	Harinolina	0.023 ± 0.009	0.087 ± 0.040	0.184 ± 0.049
32 ^a	Avena	0.025 ± 0.008	0.096 ± 0.026	0.113 ± 0.029

N= 3 ± error estándar

Tabla 15.- Cepa 32A empleando el salvado como fuente de carbono frente al control negativo como *E. coli* y dos controles positivos *P. aeruginosa* y *B. megaterium*.

CEPAS	AZUL NILO
32A	+++
<i>E. coli</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	++
<i>B. megaterium</i>	++

En la Figura 15 se observa la gráfica del incremento de la turbidez de la cepa 32A frente a los controles. La cepa 32A empieza con un valor de turbidez de 1.0 y se mantiene durante los primeros seis días y a partir de ahí se observa un leve incremento, *E. coli* actúa de manera similar a *P. aeruginosa*, mientras que *B. megaterium* se mantiene estable durante toda la experimentación.

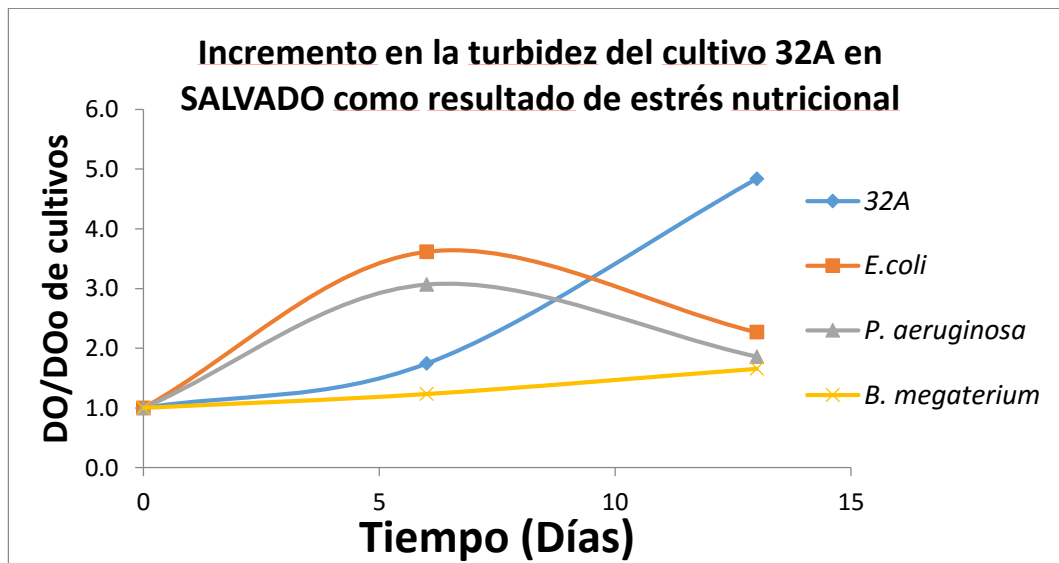


Figura 15.- Incremento en la turbidez del cultivo 32A empleando el salvado como fuente de carbono.

5.4.3.- Prueba de capacidad de la Cepa 20D para producir PHA empleando productos agroindustriales

La cepa 32^a fue capaz de producir al menos un biopolímero bajo las condiciones establecidas en este proyecto empleando los productos agroindustriales mencionados en la Tabla 11 como fuente de carbono. En la Tabla 16 se observan los datos obtenidos en los diferentes días de experimentación, donde los valores de DO obtenidos son aceptables, sin embargo, esta DO no es determinante para la confirmación de la presencia de gránulos de PHA. Para verificar la producción de gránulos de PHA se realizaron tinciones con el colorante Azul Nilo 1%, a manera de ejemplo en la Tabla 17 se muestran los datos obtenidos de la cepa 20D con salvado comparando con *P. aeruginosa* y *B. megaterium* como controles positivos y *E. coli K12* como control negativo.

Tabla 16.- Resultados de incremento en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorción a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.

CEPA	Fuentes de carbono	DO Inicial del cultivo en MM-NP	DO del cultivo a 6 días en MM-NP	DO del cultivo a 13 días en MM-NP
20D	Acetato	0.022 ± 0.005	0.085 ± 0.006	0.031 ± 0.008
20D	Maíz molido	0.040 ± 0.036	0.088 ± 0.066	0.097 ± 0.050
20D	Pericarpio	0.018 ± 0.003	0.054 ± 0.011	0.059 ± 0.017
20D	Grano de soya	0.043 ± 0.011	0.066 ± 0.014	0.071 ± 0.011
20D	Cascara de soya	0.036 ± 0.007	0.065 ± 0.010	0.050 ± 0.007
20D	Harina de soya	0.090 ± 0.004	0.276 ± 0.025	0.235 ± 0.059
20D	Ácidos grasos	0.024 ± 0.006	0.097 ± 0.020	0.056 ± 0.006
20D	Cacahuete	0.066 ± 0.001	0.069 ± 0.001	0.074 ± 0.004
20D	Sorgo	0.025 ± 0.014	0.121 ± 0.011	0.054 ± 0.015
20D	Pulido	0.048 ± 0.018	0.070 ± 0.015	0.067 ± 0.007
20D	Salvado	0.045 ± 0.007	0.054 ± 0.016	0.070 ± 0.018
20D	Harinolina	0.087 ± 0.016	0.202 ± 0.034	0.213 ± 0.024
20D	Avena	0.015 ± 0.004	0.056 ± 0.013	0.089 ± 0.017

N= 3 ± error estándar

Tabla 17.- Cepa 20D empleando el Pericarpio como fuente de carbono frente al control negativo como *E. coli* y dos controles positivos *P. aeruginosa* y *B. megaterium*.

CEPAS	AZUL NILO
20D	++
<i>E. coli</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	+
<i>B. megaterium</i>	++

En la Figura 16 se observa la gráfica del incremento de la turbidez de la cepa 20D frente a los controles. La cepa 20D empieza con un valor de turbidez de 1.0 y se observa el incremento de la turbidez desde los primeros días y se mantiene a partir del día 6 hasta el día 13, *E. coli* actúa de manera similar, *P. aeruginosa* y *B. megaterium* se mantiene estable durante toda la experimentación, pero la turbidez va disminuyendo con el paso de los días.

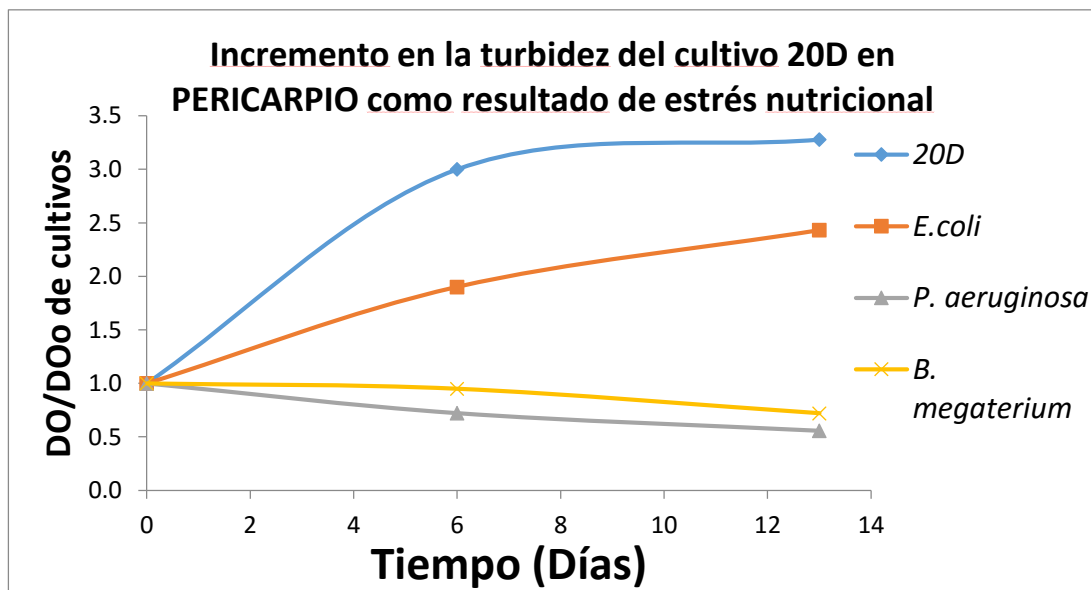


Figura 16.- Incremento en la turbidez del cultivo 20D en Pericarpio como resultado de estrés nutricional.

5.4.4.- Prueba de capacidad de la Cepa 21D para producir PHA empleando Residuos Agroindustriales

La cepa 21D fue capaz de producir al menos un biopolímero bajo las condiciones establecidas en este proyecto empleando los residuos agroindustriales mencionados en la Tabla 11 como fuente de carbono. En la Tabla 18 se observan los datos obtenidos en los diferentes días de experimentación, donde los valores de DO obtenidos son aceptables, sin embargo, esta DO no es determinante para la confirmación de la presencia de gránulos de PHA. Para verificar la producción de gránulos de PHA se realizaron tinciones con el colorante Azul Nilo 1%, a manera de ejemplo en la Tabla 19 se muestran los datos obtenidos de la cepa 21D con salvado comparando con *P. aeruginosa* y *B. megaterium* como controles positivos y *E. coli* K12 como control negativo.

Tabla 18.- Resultados de incremento en turbidez de cultivos seleccionados para la producción de PHA cuantificado por absorción a 620 nm, incluyendo su desviación estándar.

CEPA	Fuentes de carbono	DO Inicial del cultivo en MM-NP	DO del cultivo a 6 días en MM-NP	DO del cultivo a 13 días en MM-NP
21D	Acetato	0.021 ± 0.006	0.043 ± 0.012	0.030 ± 0.002
21D	Maíz molido	0.048 ± 0.012	0.088 ± 0.010	0.149 ± 0.062
21D	Pericarpio	0.017 ± 0.005	0.032 ± 0.018	0.055 ± 0.018
21D	Grano de soya	0.052 ± 0.017	0.245 ± 0.049	0.390 ± 0.072
21D	Cascara de soya	0.056 ± 0.005	0.271 ± 0.091	0.283 ± 0.154
21D	Harina de soya	0.056 ± 0.002	0.160 ± 0.022	0.250 ± 0.043
21D	Ácidos grasos	0.019 ± 0.002	0.032 ± 0.006	0.024 ± 0.001
21D	Cacahuete	0.036 ± 0.003	0.043 ± 0.007	0.047 ± 0.008
21D	Sorgo	0.052 ± 0.006	0.163 ± 0.051	0.247 ± 0.033
21D	Pulido	0.052 ± 0.005	0.115 ± 0.002	0.212 ± 0.080
21D	Salvado	0.054 ± 0.010	0.199 ± 0.222	0.385 ± 0.194
21D	Harinolina	0.041 ± 0.034	0.232 ± 0.009	0.345 ± 0.061
21D	Avena	0.033 ± 0.032	0.263 ± 0.127	0.270 ± 0.061

N= 3 ± error estándar

Tabla 19.- Cepa 20D empleando el Grano de soya como fuente de carbono frente al control negativo como *E. coli* y dos controles positivos *P. aeruginosa* y *B. megaterium*.

CEPAS	AZUL NILO
21D	+++
<i>E. coli</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	++
<i>B. megaterium</i>	+

En la Figura 17 se observa la gráfica del incremento de la turbidez de la cepa 21D frente a los controles. Las cepas 21D y *P. aeruginosa* empiezan con un valor de turbidez de 1.0 y se observa el incremento de la turbidez desde los primeros días y se mantiene durante toda la experimentación, *E. coli* y *B. megaterium* actúan de manera similar con el incremento de la turbidez los primeros días y a partir del día 6 empiezan a disminuir los valores de la turbidez.

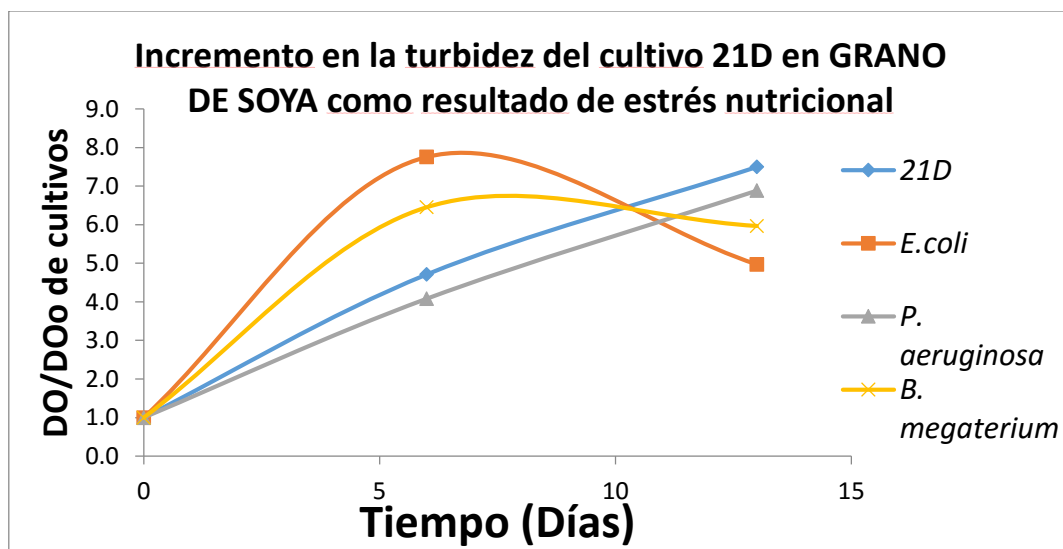


Figura 17.- Incremento en la turbidez del cultivo 21D en Grano de soya como resultado de estrés nutricional.

5.5.- Criterios de selección de la Cepa 21D como la mejor productora de PHA y del residuo agroindustrial como la mejor fuente de carbono

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un factor para seleccionar la mejor cepa como productora de PHA y el mejor residuo agroindustrial como fuente de carbono. Se efectuó el método de Fisher para presentar las diferencias significativas entre cada cepa y cada producto agroindustrial. En la Tabla 20 se presenta de manera resumida cada cepa con su respectiva fuente de carbono y las mejores condiciones de producción.

Otro factor importante para la selección del mejor residuo agroindustrial como fuente de carbono fue el costo por kilogramo de los residuos, esto debido a que uno de nuestros intereses es encontrar un biopolímero que pueda sustituir el PET y para esto se necesita disminuir el costo de producción de los PHA, es por ello que se busca un medio de cultivo de bajo costo empleando residuos agroindustriales. En la Tabla 21 se presenta el costo de los principales productos empleados en este proyecto.

Tabla 20.- Cepas seleccionadas como mejores productoras de PHA con sus respectivos mejores fuente de carbono y las condiciones de producción.

CEPA	FUENTE DE CARBONO	CONDICIONES
20C	Harinolina	13 días, 37°C, 150 rpm
32A	Salvado	6 días, 37°C, 150 rpm
20D	Pericarpio	6 días, 37°C, 150 rpm
21D	Grano de soya	13 días, 37°C, 150 rpm

Tabla 21.- Estimación de costos de los principales residuos agroindustriales (Programa de Investigación: PASTIZALES Y CULTIVOS FORRAJEROS N° de Proyecto: 3247132P, 2012).

Residuo	Costo estimado M.N.
Harinolina	2.70/Kg
Salvado	160/Kg
Pericarpio	2.20/Kg
Grano de soya	2.5/Kg

5.6.- Producción a mediana escala del biopolímero por la Cepa 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium* empleando el Grano de soya como estrés nutricional

Bajo las condiciones establecidas en el Laboratorio se logró producir el biopolímero en la Cepa 21D empleando el Grano de soya como fuente de carbono, logrando un rendimiento respecto a fuente de carbono de 68.91%, respecto a biomasa el 3.03% y respecto a inóculo 0.15%. Asimismo, los cultivo control (cultivado bajo las mismas condiciones de temperatura, oxigenación y tiempo de incubación con la diferencia de ser bacterias ya reportadas como productoras de PHA, pero con estas condiciones), *P. aeruginosa* obtuvo un rendimiento respecto a fuente de carbono el 78.28 %, respecto a biomasa el 2.91% y respecto a inóculo el 0.53%, *B. megaterium* obtuvo un rendimiento respecto a fuente de carbono de 48.03%, respecto a biomasa el 2.24% y respecto a inóculo el 0.18%.

La cepa 21D obtuvo el mayor porcentaje en comparación a los controles respecto al % de biomasa y el más bajo con respecto a inóculo. En las Tablas 5.16, 5.17, 5.18 y 5.19 se presentan los datos obtenidos de la técnica por peso seco.

Tabla 22.- Datos de la biomasa de las diferentes cepas

Cepas	Peso inóculo	Peso Falcon	Peso Falcon + Biomasa	Peso Biomasa final
<i>P.aeruginosa</i>	0.12	116.25	123.46	7.21
<i>B. megaterium</i>	0.12	115.86	118.99	3.13
21D	0.12	116.3	118.28	1.98

Tabla 23.- Datos del productos agroindustrial empleado en las diferentes cepas

Cepas	Fuente C. inóculo	Peso Gasa	Peso Gasa + Fuente C.	Peso Fuente C. final
<i>P.aeruginosa</i>	39.6	42.6	51.2	8.60
<i>B. megaterium</i>	39.6	36.21	56.79	20.58
21D	39.6	37.96	50.27	12.31

Tabla 24.- Datos obtenidos de la producción de PHA en las diferentes cepas

Cepas	Peso papel filtro	Peso papel filtro + PHA	Peso PHA
<i>P.aeruginosa</i>	0.78	0.99	0.21
<i>B. megaterium</i>	0.78	0.85	0.07
21D	0.78	0.84	0.06

Tabla 25.- % de rendimiento respecto a Biomasa, Fuente de Carbono e inóculo

Cepas	Respecto a Fuente de C.	Respecto a Biomasa	Respecto a inóculo
<i>P.aeruginosa</i>	0.12	116.25	123.46
<i>B. megaterium</i>	0.12	115.86	118.99
<i>21D</i>	0.12	116.3	118.28

5.7.- Caracterización del biopolímero producido por la Cepa 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

5.7.1.- Micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido

La Figura 18 (A) muestra la micrografía del polímero producido por la *P. aeruginosa*, donde se puede observar un producto compacto y amorfo pero disgregado, en la Figura 18 (B) se observa la biomasa de la cepa 21D, donde las células parecen estar embebidas en el polímero y no se encuentran aisladas y en la Figura 18 (C) se muestra la biomasa de *B. megaterium*, donde las células aparecen perfectamente visibles.

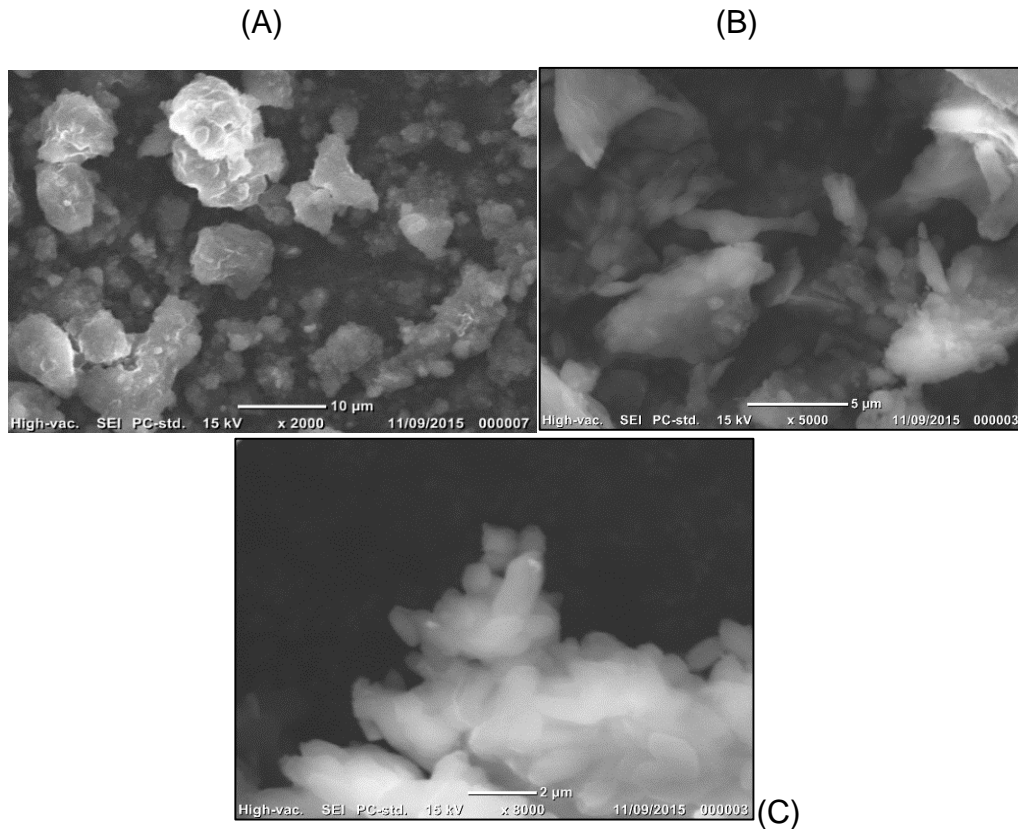


Figura 18.- Micrografías de la biomasa y polímero de *P. aeruginosa* (A), 21D (B) y *B. megaterium* (C)

5.7.2.- Espectro infrarrojo del biopolímero producido por la Cepa 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

En la Figura 19 se presenta el espectro IR obtenido de la cepa 21D. Se aprecian las bandas características del PHB a 1724 cm^{-1} (C=O), 2920 cm^{-1} (C-H) (Hon *et al.*, 1999).

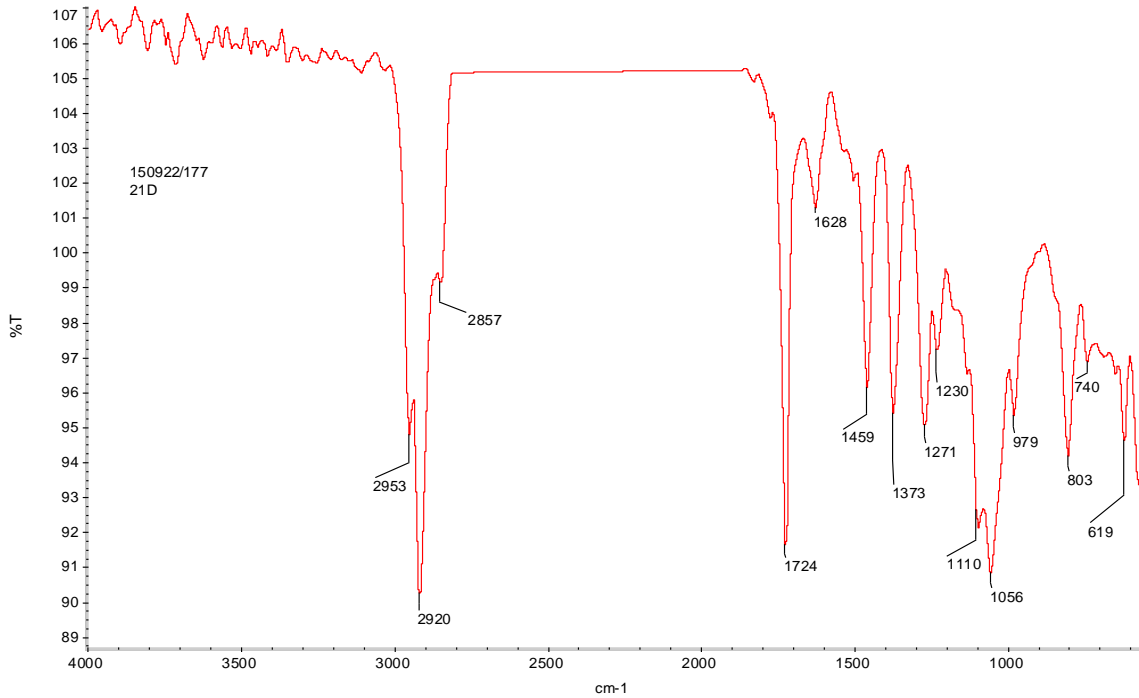


Figura 19.- Espectro de Infrarrojo del producto obtenido de la Cepa 21D

En la Figura 20 se presenta el espectro IR del producto obtenido de la cepa *B. megaterium*. Se aprecian las bandas características del PHB a 1722 cm^{-1} (C=O), 2923 cm^{-1} (C-H) (Hon *et al.*, 1999).

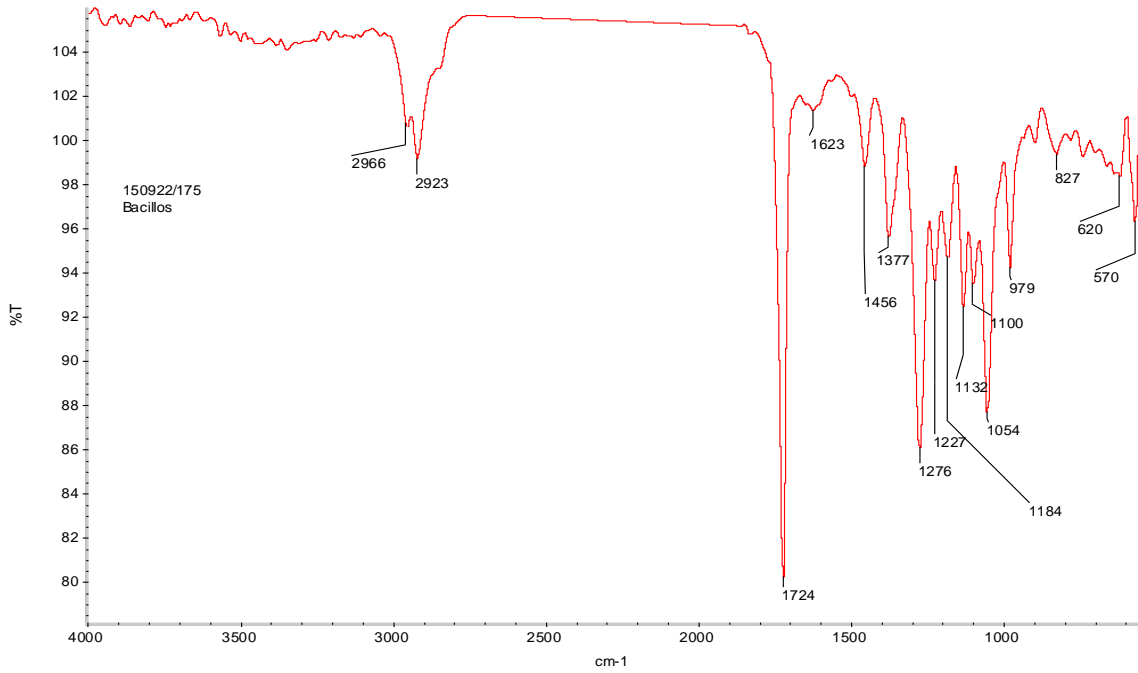


Figura 20.- Espectro Infrarrojo del producto obtenido por *B. megaterium*

En la Figura 21 se presenta el espectro IR del producto obtenido de la cepa *P. aeruginosa*. En este espectro no se alcanzan a apreciar las bandas de estiramiento de los enlaces C=O (1724 cm^{-1}) y C-H (2920 cm^{-1}), características de los PHB y PHBV.

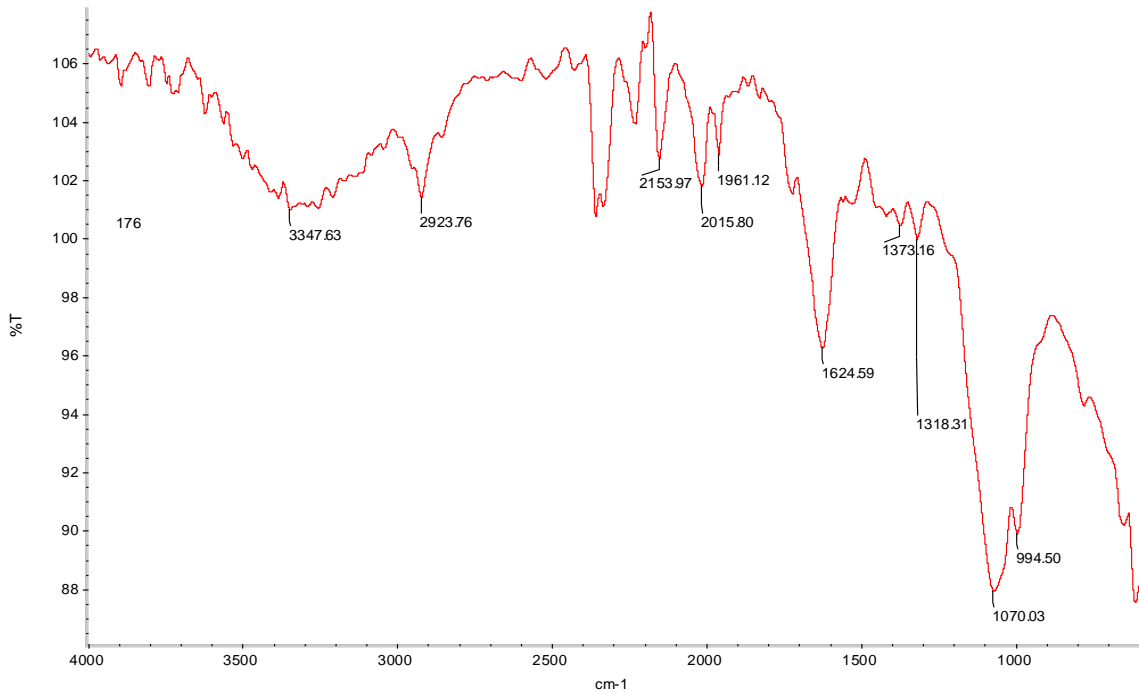


Figura 21.- Espectro Infrarrojo del producto obtenido por *P. aeruginosa*

5.7.3.- Espectro de ^1H -RMN del biopolímero producido por la Cepa 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

En la figura 22 se presenta el espectro ^1H RMN del producto obtenido de la cepa 21D, usando como disolvente cloroformo deuterado. Las señales observadas al 2.5 ppm, corresponden a los protones del grupo metileno, la señal a 5.0 ppm corresponde al protón de un grupo hidroxilo y a 7.25 aparece la señal correspondiente al solvente (D). Las señales de 7.5 a 8.0 ppm se puede atribuir a impurezas presentes. Estas señales coinciden con los grupos funcionales encontrados en el espectro IR.

Si tomamos como referencia la señal en 2.5, 2.65 y 5.28 ppm, las integrales teóricas son de 1.

Ajustando la integral experimental de 5.28 a 1, el exceso de la integral de las señales en 2.5, 2.65 y la presencia de la señal en 0.87 ppm nos indican la presencia de PHV

Para el caso de la muestra 21 D hay un exceso de .05 y 0.06 en las señales de 2.5, 2.65 ppm, respectivamente. Es decir, un protón del PHV contribuye a la integral con 0.055 unidades de integración, en promedio.

La integral de 0.87 ppm es de 0.46 de los cuales 0.165 corresponderían al PHV, si consideramos que el CH_3 asociado con los protones de PHV contribuiría con una integral de 0.055 por cada protón, lo que significa que 0.3 unidades de integración correspondientes a hidrocarburos alifáticos (ceras) se sobrelapan con PHV. Las señales en 0.87, 1.3, 1.5, 1.7 ppm complementan el resto de la estructura de las ceras

Comparando la integral de un protón del PHB contra la integral de un protón de PHV se puede calcular la proporción de cada uno de ellos en la mezcla de la muestra 21D.

De acuerdo a los valores de la integral para cada protón podemos decir que la proporción de PHB vs PHV es de 1:0.055.

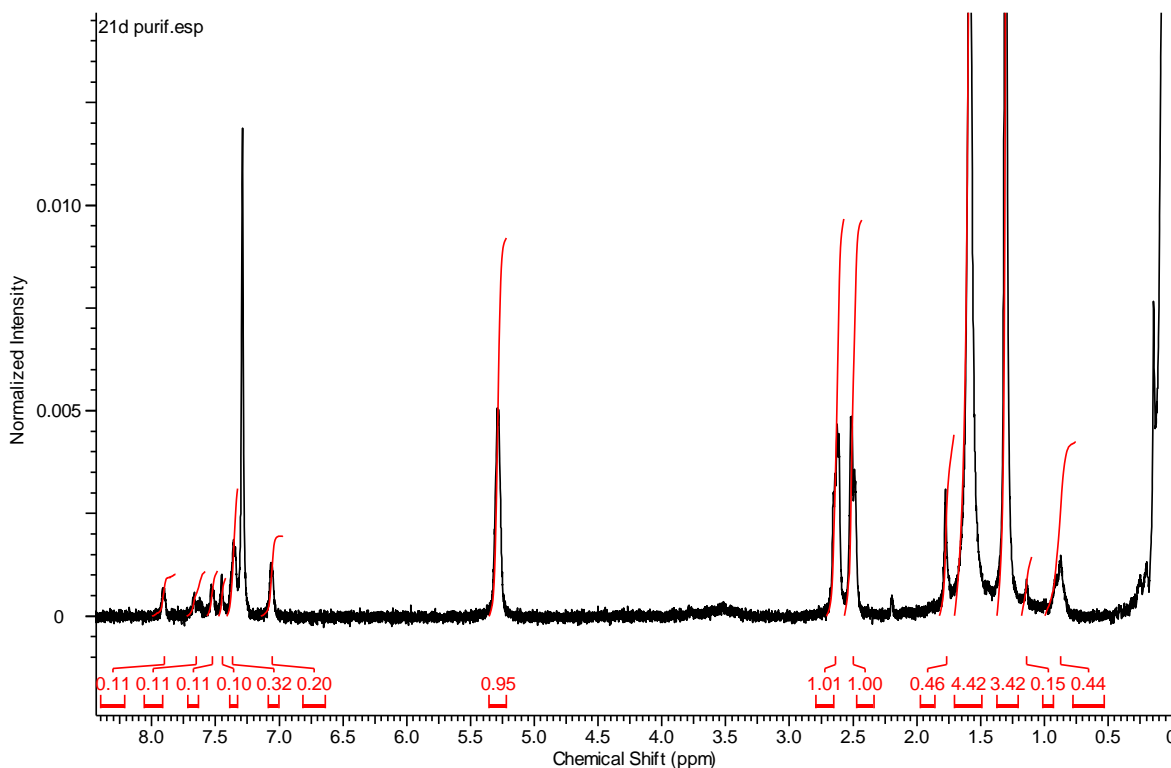


Figura 22.- Espectro de RMN del producto de la Cepa 21D.

En la figura 23 se presenta el espectro ^1H RMN del producto obtenido de la cepa *B. megaterium*, usando como disolvente cloroformo deuterado. Las señales observadas al 2.5 ppm, corresponden a los protones del grupo metileno, la señal a 5.0 ppm corresponde al protón de un grupo hidroxilo y a 7.25 aparece la señal correspondiente al solvente (D). Las señales de 7.5 a 8.0 ppm se puede atribuir a impurezas presentes. Estas señales coinciden con los grupos funcionales encontrados en el espectro IR.

Para el caso de la muestra *Bacillus megaterium* NO hay un exceso en la integral de las señales en 2.5, 2.65 ppm por lo que el exceso en las señales de 0.87, 1.3, 1.5, 1.7 ppm puede atribuirse únicamente a la presencia de hidrocarburos.

Ajustando a un CH₃ la señal de 0.87 ppm, cada protón le corresponde una integral de 0.033 aplicando este valor de integral a las señales de 0.87, 1.3, 1.5, 1.7, se obtienen 79 protones en total para estas señales, Lo cual indica que la cera es de aproximadamente 38 carbonos.

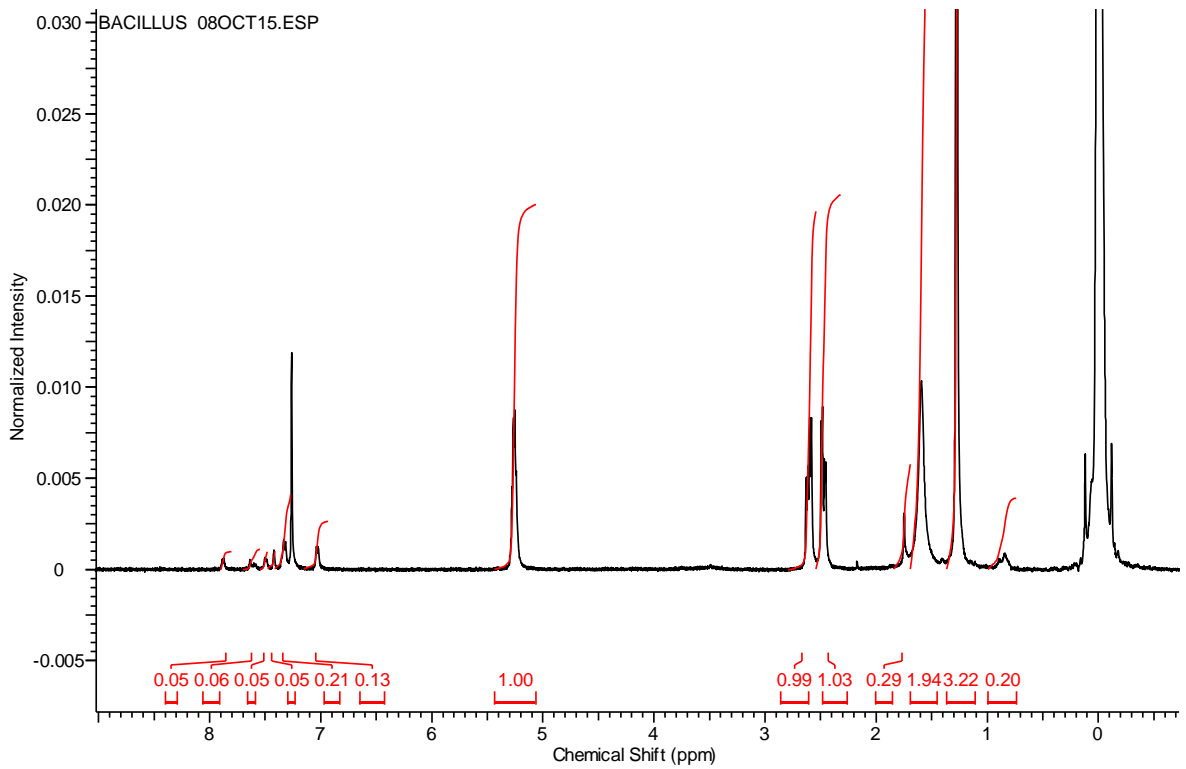


Figura 23.- Espectro de RMN del producto de *B. megaterium*

La Figura 24 corresponde al espectro ^1H -RMN del producto obtenido de la *P. aeruginosa*, donde no se observan las señales características de PHA (2.5 ppm y 5.0 ppm).

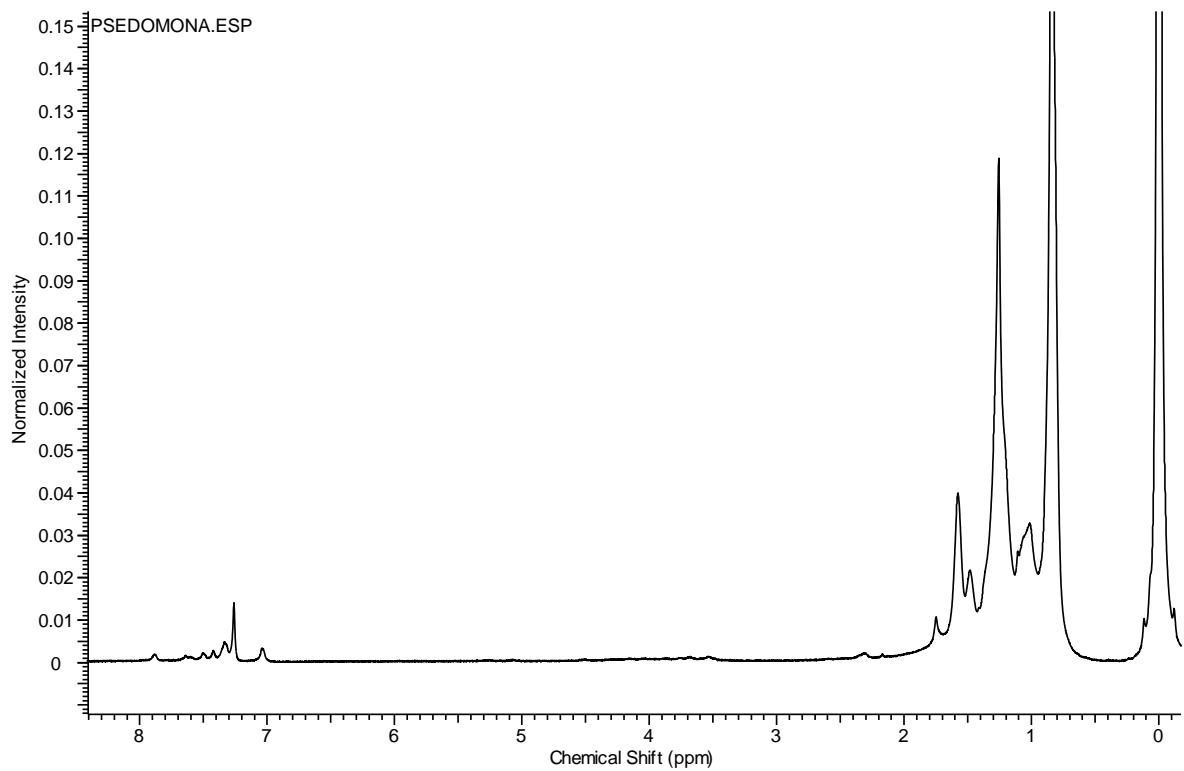


Figura 24.- Espectro de RMN del producto de *P. aeruginosa*

5.7.4.- Análisis por DSC del biopolímero de la Cepa 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*

En las Figuras 25 Y 26, se presentan los termogramas obtenidos por DSC de los productos de las cepas 21D Y *B. megaterium*, en los cuales se observa una absorción endotérmica a una temperatura aproximada de 154°C, además de tener una entalpía de 225 J/g, la cual corresponde a la temperatura de fusión del compuesto obtenido. De acuerdo a diversos autores y a la caracterización obtenida, se asume que el producto obtenido en esta extracción es el biopolímero P(P3HB-P3HV), cuya estructura se presenta en la Figura 2.2.

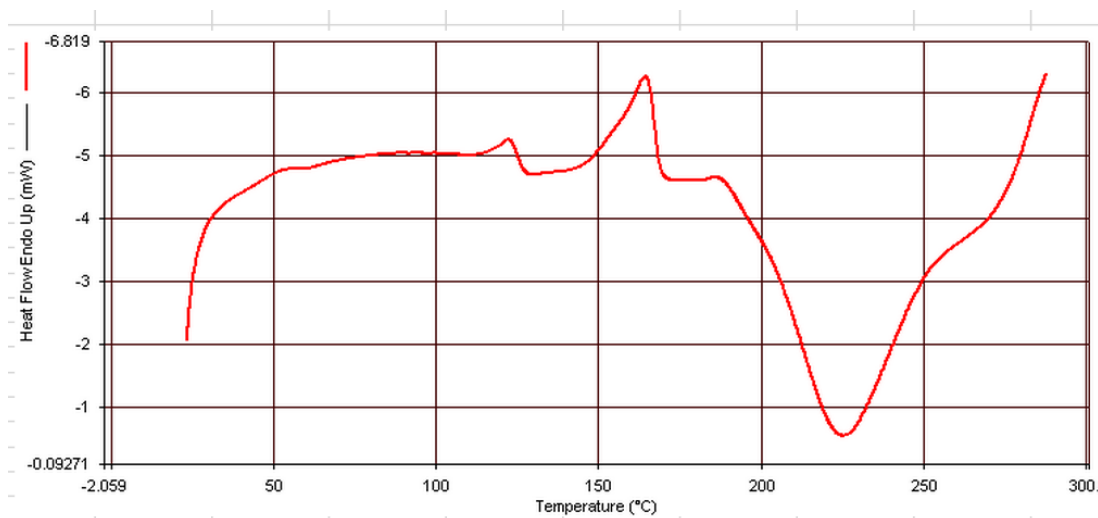


Figura 25.- Termograma de DSC del producto obtenido de la cepa 21D

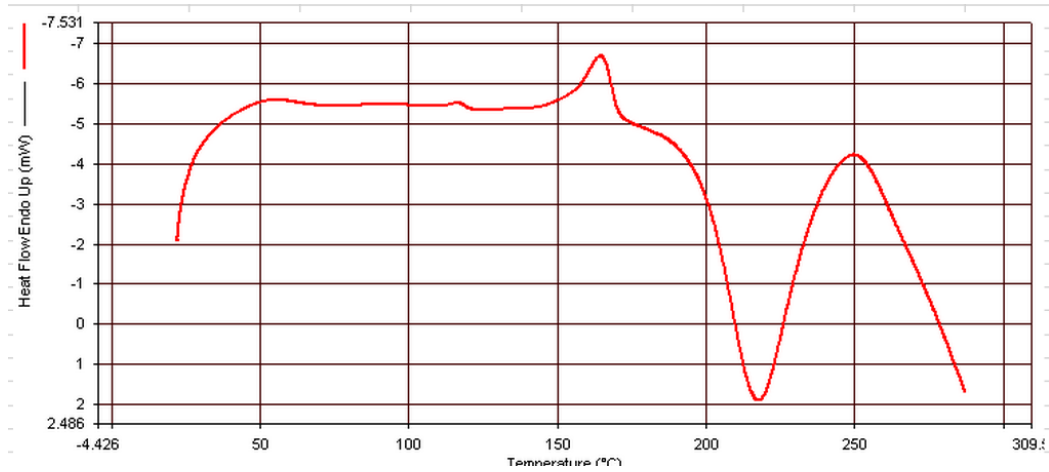


Figura 26.- Termograma de DSC del producto obtenido de *B. megaterium*

En la Figura 27, se presenta el termograma DSC del producto de la cepa de *P. aeruginosa*, en la cual no se observa una absorción endotérmica, solo presenta una entalpía de 205 J/g, la cual corresponde a la temperatura de fusión del compuesto obtenido, que no corresponde a la temperatura de fusión de los biopolímeros de la familia de los PHA, que se muestran en la Tabla 2.

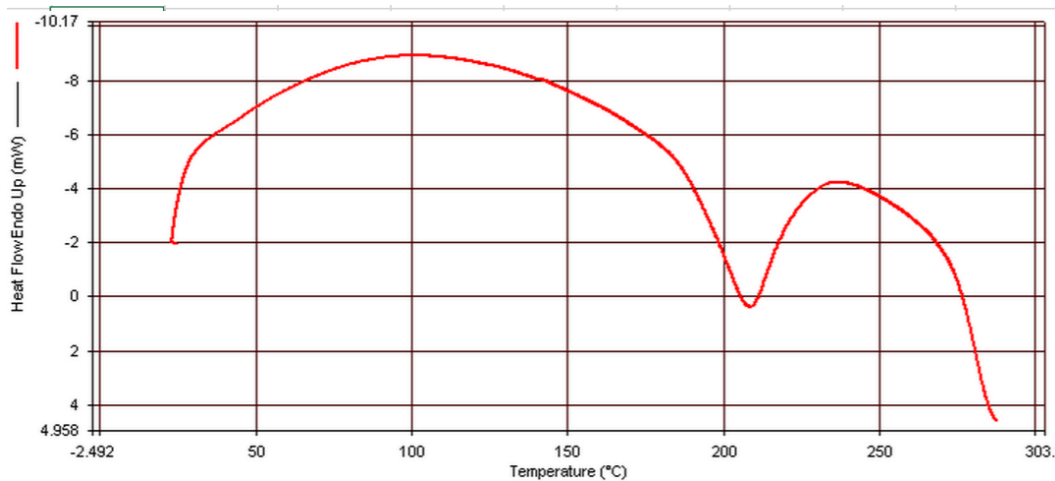


Figura 27.- Termograma de DSC del producto obtenido de *P. aeruginosa*

5.8.- Identificación de la cepa 21D

Una vez extraído el ADN de la bacteria 21D se corrió un gel de agarosa 1% TBE 1X, teñido con Bromuro de Etidio. Del cual se cargaron 100 pb Ladder Gen Script (5 μ l), de las extracciones digeridas con RNAsaH purificadas (5 μ l) aproximadamente 20 a 25 ng/ μ l (carril 1 y 2) y de las extracciones sin digerir y concentradas (5 μ l) lo que es aproximadamente 1 μ g/ μ l (carril 3 y 4). En la Figura 28 se puede observar el gel que se obtuvo.

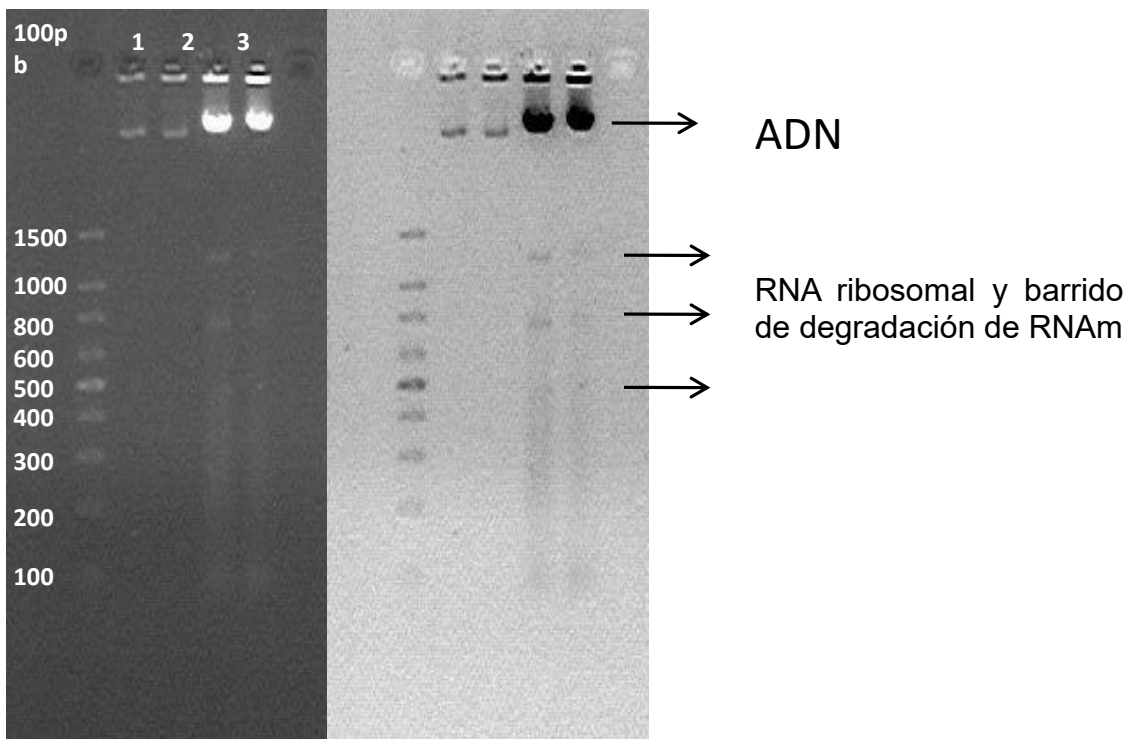


Figura 28.- Extracción de DNA de la bacteria 21D

Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% buffer TBE1X teñidos con bromuro de etidio al 0.5g/ml para ser observada mediante luz UV. Carril 1 marcadores de peso molecular (MPM), carril 2 control negativo (H₂O) y carril 5 la bacteria 21D, los carriles 3 y 4 son otras muestras de no interés para el presente proyecto. (Figura 29).



Figura 29.- Electroforesis en Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM corresponde a marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder

Posteriormente se cargó 50 µl del producto de PCR en cada pozo del gel de agarosa al 1% para la purificación y se le realizó la electroforesis. Las bandas de aproximadamente 1000 pb fueron cortadas con bisturí para la purificación de PCR del 16s. Se utilizaron los mismos marcadores de peso molecular (Figura 30).

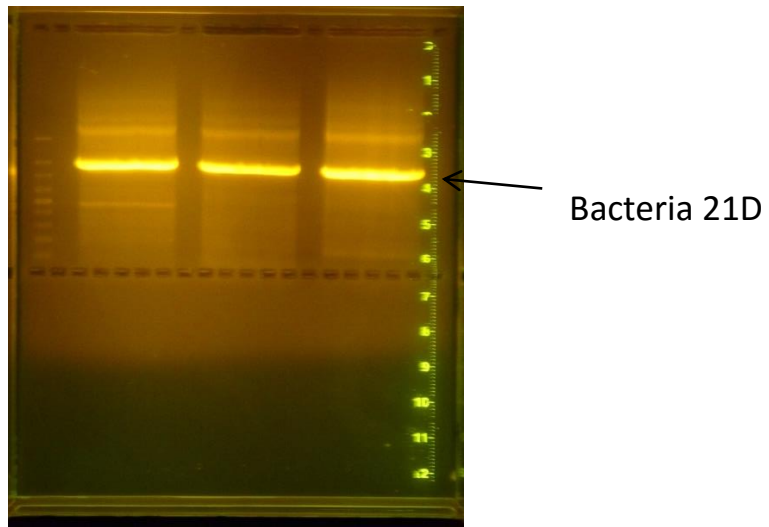


Figura 30.- Gel para cortar Bandas de PCR

MPM 11 17 21



Figura 31.- Fragmentos PCR 16S, aproximadamente 1000 pb, se cargaron 2.5ul, purificado con QiaGen

5.9.- Ensayo de toxicidad y biodegradación del biopolímero generado por la cepa 21D empleando *Eisenia foetida*

La Figura 32 muestra el tiempo en días a los cuales hay supervivencia de las lombrices donde se empleó como control negativo 2-cloroacetamida la muerte de la lombriz con esta sustancia fue al instante, como control positivo se empleó una fruta la cual fue una pera y como se puede observar a los siete días la lombriz aún permanecía con vida al igual que con los productos generados por la cepa 21D, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus megaterium*, en la Figura 33 (A) se observa una lombriz con vida y en la Figura 33 (B) se muestra una lombriz sin vida.

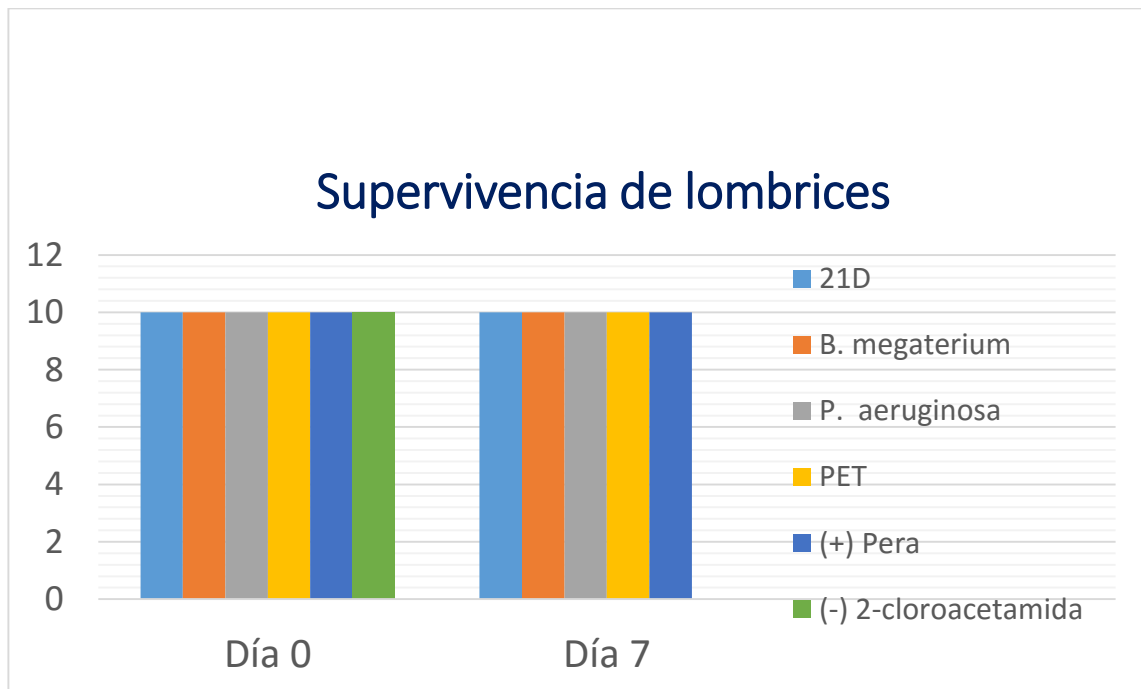


Figura 32.- Supervivencia de lombrices



Figura 33.- (A) Lombriz viva y (B) Lombriz sin vida

La Tabla 26 muestra el tiempo en días a los cuales fueron degradados los productos generados por la cepa 21D, *P. aeruginosa* y *B. megaterium*, donde se empleó como control negativo el plástico PET. Se puede observar que los tres productos fueron degradados al cuarto día mientras que el PET no fue degradado ni al término del ensayo. En la Figura 34 (A) se observa el productos generado por la cepa 21D a las 24 Hrs. En la Figura 34 (B) se observa el productos generado por la cepa 21D a las 96 Hrs. Y en la Figura 34 (C) se observa el PET a los siete días.

Tabla 26.- Biodegradación de los polímeros

Días	21D	<i>B. megaterium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	PET
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-

(-) = No degradación (+) = Degradación



(A) 24 Hrs. 21D



(B) 96 Hrs. 21D



(C) 7 días PET

Figura 34.- Biodegradación del producto generado por la cepa 21D frente al PET.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

6.1.- Conclusiones

Del análisis bioinformático se encontró que existen cuatro diferentes clases del gen *phaC* (I, II, III Y IV) y de acuerdo a las características fisicoquímicas reportadas de éstas clases se concluyó que los genes del *phaC* II son los que presentan las características de interés para la investigación del proyecto.

Las zonas muestreadas en el Estado de Nuevo León presentan una amplia gama de microorganismos, se obtuvieron 254 cepas diferentes lo cual es un potencial para el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros para el presente trabajo, se busca una cepa capaz de producir PHA de propiedades similares al PET bajo condiciones de laboratorio.

Del screening realizado con acetato de sodio se seleccionaron las mejores cepas con capacidad biológica para producir PHA y estas fueron 20C, 32A, 20D y 21D.

Del screening realizado con productos agroindustriales, se seleccionaron las mejores fuentes de carbono y estas fueron salvado de trigo, grano de soya, pericarpio y harinolina.

El biopolímero obtenido de la cepa 21D empleando el grano de soya como fuente de carbono fue caracterizado por FT-IR, HNMR, DSC y SEM. El espectro FT-IR mostró las bandas características del grupo C=O y C-H típicas de los PHA, en el HNMR se obtuvieron las señales de protones de grupos metileno y de grupos OH presentes en los biopolímeros de la familia de los PHA P(P3HB-P3HV). En el termograma DSC se obtuvo el punto de fusión correspondiente a los PHA reportados en la literatura y en la micrografía obtenida por SEM se lograron identificar los gránulos de PHA de manera intracelular en la biomasa de bacteria.

El análisis de la secuencia obtenida mediante blast permitió identificar que la secuencia del 16s de la bacteria 21D corresponde a *Brevibacterium halotolerans*.

Del ensayo de biodegradación y toxicidad se obtuvo que el tiempo que demora la degradación es al cuarto día ya no se observa el biopolímero y de las lombrices que se emplearon ninguna se murió lo cual indica que el biopolímero generado por la cepa 21D no es toxica y es biodegradable.

Por lo anterior se concluye que las bacterias colectadas en diferentes regiones del Estado de Nuevo León son capaces de producir PHA de propiedades fisicoquímicas similares a plásticos convencionales, empleando residuos agroindustriales como fuente de carbono, y en particular la cepa 21 D que produce un biopolimero con características similares a los plásticos convencionales.

Capítulo 7. PERSPECTIVAS

Las problemáticas actuales ocasionadas por los plásticos convencionales derivados del petróleo llaman el interés de los investigadores para continuar en busca de nuevos sustitutos de estos, una de las opciones es mejorar las condiciones de producción de los biopolímeros provenientes de los microorganismos.

En el presente proyecto se obtuvieron resultados favorables empleando la cepa *Brevibacterium halotolerans*, es por ello que se propone continuar con la búsqueda de mejores medios de cultivo y condiciones de producción de esta cepa. Se propone emplear como medio de cultivo el suero de leche, esta opción ayudará a reducir los costes de producción, Optimización de la producción de PHA empleando 21D los parámetros a probar son la temperatura, concentración de fosfatos y pH.

También es importante realizar la expresión de genes una vez teniendo las condiciones adecuadas para la mayor producción de PHA.

Capítulo 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnew DE, Pflieger BF (2013) Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. *Chem Eng Sci* 103:58–67. doi: 10.1016/j.ces.2012.12.023
- Akiyama M, Tsuge T, Doi Y (2003) Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polym Degrad Stab* 80:183–194.
- Albuquerque MGE, Concas S, Bengtsson S, Reis MAM (2010) Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: The use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresour Technol* 101:7112–7122. doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.019
- Albuquerque MGE, Eiroa M, Torres C (2007) Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J Biotechnol* 130:411–421. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.011
- Al-Sabagh AM, Yehia FZ, Eshaq G (2015) Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egypt J Pet.* 27: 205-233 doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.001
- Annuar MSM, Tan IKP, Ibrahim S, Ramachandran KB (2007) Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from crude fatty acids mixture by *Pseudomonas putida*. *Food Bioprod Process* 85:104–119. doi: 10.1205/fbp06017
- Baghaee Moghaddam T, Soltani M, Karim MR (2014) Evaluation of permanent deformation characteristics of unmodified and Polyethylene Terephthalate modified asphalt mixtures using dynamic creep test. *Mater Des* 53:317–324. doi: 10.1016/j.matdes.2013.07.015
- Baghaee Moghaddam T, Soltani M, Karim MR, Baaj H (2015) Optimization of asphalt and modifier contents for polyethylene terephthalate modified asphalt mixtures using response surface methodology. *Measurement* 74:159–169. doi: 10.1016/j.measurement.2015.07.012
- Banković-Ilić IB, Stamenković OS, Veljković VB (2012) Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renew Sustain Energy Rev* 16:3621–3647. doi: 10.1016/j.rser.2012.03.002
- Barbosa M, Espinosa Hernández A, Malagón Romero D, Moreno Sarmiento N (2005) Producción De Poli- β -Hidrobutirato (PHB) Por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Univ Sci Rev la Fac Ciencias Pontif Univ Javeriana* 10:45–54.
- Baskaran M, Hashim R, Sudesh K, (2013) Influence of steam treatment on the properties of particleboard made from oil palm trunk with addition of polyhydroxyalkanoates. *Ind Crops Prod* 51:334–341. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.09.023

- Bello D, Otero M, Ortega G, Carrera E (2009) Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxicanoatos. Rev. Cie. Ame. Lat. 43:3–13.
- Bengtsson S, Pisco AR, Johansson P (2010) Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. J Biotechnol 147:172–179. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.03.022
- Berlanga M, Montero MT, Fernández-Borrell J, Guerrero R (2006) Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. Int Microbiol 9:95–102.
- Bhubalan K, Lee WH, Loo CY (2008) Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. Polym Degrad Stab 93:17–23. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.004
- Bosco F, Chiampo F (2010) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. J Biosci Bioeng 109:418–421. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.012
- Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. J Biotechnol 65:127–161. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00126-6
- Cai L, Yuan M, Liu F, (2009) Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. Bioresour Technol 100:2265–2270. doi: 10.1016/j.biortech.2008.11.020
- Campanari S, Silva F, Bertin L, (2014) Effect of the organic loading rate on the production of polyhydroxyalkanoates in a multi-stage process aimed at the valorization of olive oil mill wastewater. Int J Biol Macromol 71:34–41. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.006
- Canadas RF, Cavalheiro JMBT, Guerreiro JDT (2014) Polyhydroxyalkanoates: Waste glycerol upgrade into electrospun fibrous scaffolds for stem cells culture. Int J Biol Macromol 71:131–140. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.008
- Carvalho G, Oehmen A, Albuquerque MGE, Reis MAM (2014) The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. N Biotechnol 31:257–263. doi: 10.1016/j.nbt.2013.08.010
- Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG (2009) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. Bioresour Technol 100:5996–6009.

- Cavalheiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, da Fonseca MMR (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem* 44:509–515. doi: 10.1016/j.procbio.2009.01.008
- Cerrone F, Davis R, Kenny ST (2015) Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation. *Bioresour Technol* 191:45–52. doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.128
- Chang F, Chang W, Chuang S, Fang L (2011) Comparison of polyhydroxyalkanoates production by activated sludges from anaerobic and oxic zones of an enhanced biological phosphorus removal system: effect of sludge retention time. *Bioresour Technol* 102:5473–5478. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.097
- Chanprateep S (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng* 110:621–632. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014
- Chen H, Meng H, Nie Z, Zhang M (2013) Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: Effect of pH and feeding regimes. *Bioresour Technol* 128:533–538. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.121
- Cheng J, Zhu X, Ni J, Borthwick A (2010) Palm oil mill effluent treatment using a two-stage microbial fuel cells system integrated with immobilized biological aerated filters. *Bioresour Technol* 101:2729–2734. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.017
- da Rosa AK, Michelin CE, Campomanes R (2011) Reciclaje de PET: Evaluación de la eficiencia de separación del contaminante PVC. *Encuentro Científico Int Peru* 8:8–14.
- Davis R, Kataria R, Cerrone F (2013) Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresour Technol* 150:202–209. doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.001
- Duque AF, Oliveira CSS, Carmo ITD (2014) Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *N Biotechnol* 31:276–288. doi: 10.1016/j.nbt.2013.10.010
- Escapa IF (2012) Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. 1–217. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Fernández D, Rodríguez E, Bassas M (2005) Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochem Eng J* 26:159–167. doi: 10.1016/j.bej.2005.04.022

- García IL, López J a., Dorado MP (2013a) Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour Technol* 130:16–22. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.088
- García YG, Carlos J, Contreras M (2013) Síntesis y Biodegradación de Polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Rev Int Contam Ambie* 29:77–115.
- Gentil EC, Gallo D, Christensen TH (2011) Environmental evaluation of municipal waste prevention. *Waste Manag* 31:2371–2379. doi: 10.1016/j.wasman.2011.07.030
- Gouda MK, Swellam E, Omar SH (2001) Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol Res* 156:201–207. doi: 10.1078/0944-5013-00104
- Gumel AM, Annuar MSM, Heidelberg T (2012) Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent. *PLoS One* 7:e45214. doi: 10.1371/journal.pone.0045214
- Gurieff N, Lant P (2007) Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresour Technol* 98:3393–3403. doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.046
- Haba E, Vidal-Mas J, Bassas M (2007) Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. *Biochem Eng J* 35:99–106. doi: 10.1016/j.bej.2006.11.021
- Hassan MA, Yee L-N, Yee PL (2013) Sustainable production of polyhydroxyalkanoates from renewable oil-palm biomass. *Biomass and Bioenergy* 50:1–9. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.10.014
- Höfer P, Vermette P, Groleau D (2011) Production and characterization of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Methylobacterium extorquens*: Combining desirable thermal properties with functionality. *Biochem Eng J* 54:26–33. doi: 10.1016/j.bej.2011.01.003
- Jacquel N, Lo C-W, Wei Y-H (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem Eng J* 39:15–27. doi: 10.1016/j.bej.2007.11.029
- Jia Q, Wang H, Wang X (2013) Dynamic synthesis of polyhydroxyalkanoates by bacterial consortium from simulated excess sludge fermentation liquid. *Bioresour Technol* 140:328–336. doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.105

- Jiang Y, Marang L, Tamis J (2012) Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res* 46:5517–5530. doi: 10.1016/j.watres.2012.07.028
- John PJJ, Bakore N, Bhatnagar P (2001) Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. *Environ Int* 26:231–236. doi: 10.1016/S0160-4120(00)00111-2
- Jose G y Rodriguez M (2010) Estudio de Factibilidad para reciclar envases plásticos de Polietileno Tereftalado (PET), en la ciudad de Guayaquil. 237.
- Kampire E, Kiremire BT, Nyanzi SA, Kishimba M (2011) Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets. *Chemosphere* 84:923–927. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.011
- Khanna S, Srivastava AK (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem* 40:607–619. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.053
- Kim TH, Kim JS, Sunwoo C, Lee Y. (2003) Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour Technol* 90:39–47. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00097-X
- Koller M, Salerno A, Muhr A (2012) Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers and Plastics from Renewable Resources. *Mater Technol* 46:23–30.
- Koutinas AA, Xu Y, Wang R, Webb C (2007) Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme Microb Technol* 40:1035–1044. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.002
- Krueger CL, Radetski CM, Bendia AG (2012) Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electron J Biotechnol*. doi: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-6
- Kung S-S, Chuang Y-C, Chen C-H, Chien C-C (2007) Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. *Lett Appl Microbiol* 44:364–371. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02090.x
- Laycock B, Halley P, Pratt S (2014) The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog Polym Sci* 39:397–442. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008
- Lee SY (1996) Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol* 14:431–438. doi: 10.1016/0167-7799(96)10061-5
- Lee WH, Loo CY, Nomura CT, Sudesh K (2008) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresour Technol* 99:6844–6851. doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.051
- Leong YK, Show PL, Ooi CW (2014) Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 180:52–65. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.020

- Li L, Wang Z-J, Chen X-J (2014) Optimization of polyhydroxyalkanoates fermentations with on-line capacitance measurement. *Bioresour Technol* 156:216–221. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.042
- López-Cuellar MR, Alba-Flores J, Rodríguez JNG, Pérez-Guevara F (2011) Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *Int J Biol Macromol* 48:74–80. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016
- Luzardo OP, Almeida-González M, Henríquez-Hernández L a., et al (2012) Polychlorobiphenyls and organochlorine pesticides in conventional and organic brands of milk: Occurrence and dietary intake in the population of the Canary Islands (Spain). *Chemosphere* 88:307–315. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.002
- Majid MI, Akmal DH, Few LL (1999) Production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia sp.* USMI-20. *Int J Biol Macromol* 25:95–104. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00020-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00020-3)
- Merlino G, Rizzi A, Schievano A (2013) Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Res* 47:1983–1995. doi: 10.1016/j.watres.2013.01.007
- Morgan-Sagastume F, Karlsson A, Johansson P (2010) Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *Water Res* 44:5196–5211. doi: 10.1016/j.watres.2010.06.043
- Nduko JM, Suzuki W, Matsumoto K (2012) Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance to 5-hydroxymethylfurfural. *J Biosci Bioeng* 113:70–72. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.021
- Ntaikou I, Valencia Peroni C, Kourmentza C (2014) Microbial bio-based plastics from olive-mill wastewater: Generation and properties of polyhydroxyalkanoates from mixed cultures in a two-stage pilot scale system. *J Biotechnol* 188:138–147. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.08.015
- Pantazaki AA, Papanephytous CP, Pritsa AG (2009) Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochem* 44:847–853. doi: 10.1016/j.procbio.2009.04.002
- Posada JA., Naranjo JM, López JA (2011) Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochem* 46:310–317. doi: 10.1016/j.procbio.2010.09.003
- Quintero JC, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM (2005) Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere* 61:528–536. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.02.010

- Rai R, Keshavarz T, Roether JA (2011) Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater Sci Eng R Reports* 72:29–47. doi: 10.1016/j.mser.2010.11.002
- Rao U, Sridhar R, Sehgal PK (2010) Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochem Eng J* 49:13–20. doi: 10.1016/j.bej.2009.11.005
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour Technol* 87:137–146. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- Salehizadeh H, Van Loosdrecht MCM (2004) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol Adv* 22:261–279. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.003
- Samorì C, Abbondanzi F, Galletti P (2015) Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery. *Bioresour Technol* 189:195–202. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.062
- Sawant SS, Salunke BK, Kim BS (2015) Degradation of corn stover by fungal cellulase cocktail for production of polyhydroxyalkanoates by moderate halophile *Paracoccus* sp. LL1. *Bioresour Technol* 194:247–255. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.019
- Silva LF, Taciro MK, Raicher G (2014) Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *Int J Biol Macromol* 71:2–7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.065
- Simon-Colin C, Raguénès G, Crassous P (2008) A novel mcl-PHA produced on coprah oil by *Pseudomonas guezenei* biovar. tikehau, isolated from a “kopara” mat of French Polynesia. *Int J Biol Macromol* 43:176–181. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.04.011
- Singh RP, Singh P, Araujo ASF (2011) Management of urban solid waste: Vermicomposting a sustainable option. *Resour Conserv Recycl* 55:719–729. doi: 10.1016/j.resconrec.2011.02.005
- Spiekermann P, Rehm BH a, Kalscheuer R (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171:73–80. doi: 10.1007/s002030050681
- Stülten D, Lamshöft M, Zühlke S, Spiteller M (2008) Isolation and characterization of a new human urinary metabolite of diclofenac applying LC–NMR–MS and high-resolution mass analyses. *J Pharm Biomed Anal* 47:371–376. doi: 10.1016/j.jpba.2008.01.024

- Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog Polym Sci* 25:1503–1555. doi: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- Tamisa J, Lužkov K, Jiang Y (2014) Enrichment of *Plasticicumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *J Biotechnol* 192 Pt A:161–9. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.10.022
- Tanadchangsang N, Kitagawa A, Yamamoto T, (2009) Identification, biosynthesis, and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxy-4-methylvalerate. *Biomacromolecules* 10:2866–74. doi: 10.1021/bm900696c
- Thakor N, Trivedi U, Patel KC (2005) Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. *Bioresour Technol* 96:1843–1850. doi: 10.1016/j.biortech.2005.01.030
- Tripathi L, Wu L-P, Dechuan M (2013) *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresour Technol* 142:225–31. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.027
- Trollmo C, Andr L, Blomberg A, Adler L (1989) Bicarbonate-stimulated dark fermentative growth of a phototrophic purple nonsulfur bacterium Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalk. 60:3396.
- Urtuvia V, Villegas P, González M, Seeger M (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int J Biol Macromol* 70:208–213. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001
- van Hee P, Elumbaring ACMR, van der Lans RGJM, Van der Wielen LM (2006) Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation. *J Colloid Interface Sci* 297:595–606. doi: 10.1016/j.jcis.2005.11.019
- Van Wegen RJ, Ling Y, Middelberg PJ (1998) Industrial Production of Polyhydroxyalkanoates Using *Escherichia Coli*: An Economic Analysis. *Chem Eng Res Des* 76:417–426. doi: 10.1205/026387698524848
- Verlinden RJ, Hill DJ, Kenward M (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* 102:1437–1449. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- Villano M, Valentino F, Barbeta A (2014) Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *N Biotechnol* 31:289–296. doi: 10.1016/j.nbt.2013.08.001

- Wang C-Q, Wang H, Liu Y-N (2015) Separation of polyethylene terephthalate from municipal waste plastics by froth flotation for recycling industry. *Waste Manag* 35:42–47. doi: 10.1016/j.wasman.2014.09.025
- Wang J, Yue Z-B, Sheng G-P, Yu H-Q (2010) Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. *Biochem Eng J* 49:422–428. doi: 10.1016/j.bej.2010.02.005
- Witholt B, Kessler B (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotechnol* 10:279–85. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80049-4
- Xu Y, Wang RH, Koutinas A, Webb C (2010) Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochem* 45:153–163. doi: 10.1016/j.procbio.2009.09.001
- Yadira J, Ria S (2010) Polihidroxiálcanoatos (PHA): Biopolímeros producidos por microorganismos . Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Rev Teoría y Prax Investig* 5:79–84.
- Ye J-Y, Liu T, Chen Y (2013) Effect of Al crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy* 38:15770–15776. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.03.141
- Yu J, Stahl H (2008) Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresour Technol* 99:8042–8048. doi: 10.1016/j.biortech.2008.03.071
- Zribi-Maaloul E, Trabelsi I, Elleuch L (2013) Purification and characterization of two polyhydroxyalcanoates from *Bacillus cereus*. *Int J Biol Macromol* 61:82–88.