

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



OBTENCIÓN DE POLI-3-HIBROXIBUTARATO (P3HB) A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DE PECTINA DEL MUCILAGO DE CAFÉ CON *Streptomyces sp.* AISLADOS DE SUELOS DE BOYACÁ (COLOMBIA).

MARÍA PAOLA GONZÁLEZ IGUAVITA

UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
CHÍA, COLOMBIA

2014



OBTENCIÓN DE POLI-3-HIBROXIBUTARATO (P3HB) A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DE PECTINA DEL MUCILAGO DE CAFÉ CON *Streptomyces sp.* AISLADOS DE SUELOS DE BOYACÁ (COLOMBIA).

MARÍA PAOLA GONZÁLEZ IGUAVITA

Proyecto para optar para el título de: Ingeniera Química- Ingeniera de
Producción Agroindustrial

Profesor Director: Manuel Fernando Valero Valdivieso

Profesor Co-Director: Luis Eduardo Díaz Barrera

UNIVERSIDAD DE LA SABANA

FACULTAD DE INGENIERÍA

CHÍA, COLOMBIA

2014



CARTA ACEPTACIÓN

Chía, 18 de Junio 2014.

Me dirijo a usted con el objeto de avalar el proyecto de grado “Obtención de P3HB (poli-3-hidroxidutarato) a partir de la extracción de pectina del mucilago de café con *Streptomyces sp.* aislados de suelos de Boyacá (Colombia)”, realizado por María Paola González para optar por el título de grado Ingeniería Química y de Ingeniería de Producción Agroindustrial de la Universidad de la Sabana. De igual manera, ratifico que trabaje en calidad de director del proyecto y realice un seguimiento de la información recolectada para la ejecución de este proyecto.

En virtud de lo anterior, con pleno conocimiento de la responsabilidad que asumo ante usted y ratificando lo antes expuesto, firmo la presente en el día de su fecha.

Atentamente

Manuel Fernando Valero Valdivieso
Profesor-Investigador
Facultad de Ingeniería
Universidad de La Sabana



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recopila el esfuerzo de un año y medio, el cual no hubiera sido posible sin el apoyo, la compañía, los consejos de muchas personas que están y estuvieron durante el transcurso de este proceso.

Le agradezco al profesor **Jorge Eduardo Cortazar**, por su apoyo continuo durante el proceso de experimentación de este trabajo. Agradezco al profesor **Manuel Fernando Valero** por la paciencia y por la dirección de este trabajo. Al profesor **Luis Eduardo Díaz**, por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis.

Gracias también a **Andrés Felipe Salazar** por su apoyo y ayuda tanto en la experimentación como en el desarrollo del escrito.

A mis amigos y a mis papas por levantarme cada día de forma incondicional.

Gracias a todos.



RESUMEN

Los Polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros los cuales son producidos por distintas especies bacterianas en condiciones de crecimiento de estrés, las cuales se encuentran definidas por limitaciones de nutrientes como nitrógeno, fósforo o fuente carbonada. En esta tesis se estudia la producción de Polihidroxibutirato (PHB) a partir de residuos agroindustriales. El poli-3-hidroxibutirato fue producido por vía fermentativa por un género bacteriano de *Streptomyces sp.* aislado de la rizosfera del suelo de Chiquinquirá, Boyacá (Latitud: 5.617, Longitud: -73.85° 37' 1" Norte, 73° 48' 0" Oeste) en 50 puntos de muestreo entre 0-10cm de profundidad distribuidos en 10000m²; como control se tomó una cepa del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca. La fuente de carbono, medio Sabouraud (5g/L, 10g/L, 20g/L y 40g/L) usado como control y Mucilago de Café (5g/L, 10g/L, 20g/L y 40g/L) recolectado de una cosecha ubicada en el departamento de Cundinamarca (Latitud: 5.13095, Longitud: -74.1602 5° 7' 51" Norte, 74° 9' 37" Oeste). Es así como el diseño experimental planteado fue con 2 sustratos con 4 concentraciones por triplicado y con 2 microorganismos. El tiempo de fermentación se detenía cuando los microorganismos se encontraban en fase de muerte aproximadamente a los 8 días. Para la extracción del polímero se realizó una centrifugación para separar la biomasa del medio de cultivo a 6000rpm durante 30min y se procedió a liofilizar a -50°C durante 24 horas, consecutivamente, se diluyó con cloroformo con el fin que el polímero quedara soluble y se eliminaran residuos de biomasa.

Según los resultados que se obtuvieron en este ensayo, se permitió demostrar la producción de PHA bajo mecanismos de resistencia al estrés y en condiciones de baja concentración de nutrientes, donde se observó que el medio más exitoso para dicha producción fue el medio Sabouraud (10g/L) con *Streptomyces sp.* brindados por el cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca obteniéndose una producción de 0,039g de P3HB. Sin embargo, también se obtuvo 0,013g P3HB con Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa (10g/L) y con *Streptomyces sp.* brindados por el cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca, por ende, el microorganismo es un candidato adecuado para la producción de PHA usándolo con materias primas baratas, renovables y alternativas como lo es el Mucilago de Café dándole un valor agregado a este.



INDICE GENERAL

1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
2.	JUSTIFICACIÓN.....	12
3.	OBJETIVO.....	13
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	13
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
4.1	Estado del Arte.....	14
4.2	Marco Teórico.....	19
4.2.1	Organismos en la rizósfera del suelo	19
4.2.2	Actinomicetos.....	19
4.2.3	<i>Streptomyces sp.</i>	20
4.2.4	Mucilago de café	21
4.2.5	Pectina.....	21
4.2.6	Poli-3-hidroxibutirato (P3HB).....	22
4.2.7	Fermentación	23
5.	METODOLOGÍA.....	24
5.1	Extracción del Mucilago de Café	24
5.2	Aislamiento de los Microorganismos.....	24
5.3	Identificación de los Microorganismos	25
5.3.1	Caracterización Macroscópicamente – Microscópicamente	25
5.3.2	Identificación Molecular PCR	25
5.4	Conservación de las cepas de actinomicetos	25
5.5	Fermentación en medio líquido	26
5.6	Extracción del Polímero.....	26
5.7	Caracterización del Polímero.....	27
6.	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	28
6.1	Recursos Económicos.....	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
7.1	Extracción del Mucilago de Café	30



7.2	Aislamiento de los Microorganismos.....	31
7.3	Identificación de los Microorganismos	32
7.3.1	Caracterización Macroscópicamente – Microscópicamente	32
A partir de las 50 muestras seleccionadas de los suelos de Boyacá, Colombia, se logró aislar dos cepas (Ver ilustración 4) donde se seleccionaron las colonias que presentaban características macroscópicas de los actinomicetos como textura polvorienta, olor a suelo húmedo, coloración negra, forma redonda, tamaño de colonias grandes, bordes irregulares, consistencia dura, y al transcurrir aproximadamente 3 semanas se comportara como hongo (Correa, 2008).....		
7.3.2	Identificación Molecular PCR	32
7.4	Conservación de las cepas de actinomicetos	35
7.5	Fermentación en medio líquido	35
7.5.1	Obtención de rendimientos teóricos	35
7.5.2	Crecimiento de Actinomiceto en medio Sabouraud y Mucilago de Café. 38	
7.5.3	Medición de Azucares Reductores (DNS)	42
7.6	Extracción del Polímero.....	45
7.7	Caracterización del Polímero.....	48
7.7.1	Infrarrojo con transformada de Fourier.....	48
7.7.2	Termogravimetría.....	49
7.8	Análisis Económico.....	50
CONCLUSIONES.....		51
RECOMENDACIONES.....		52
ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE MEDIOS		53
ANEXO 2. MORFOLOGIA DE <i>Streptomyces sp.</i> AISLADOS Y BRINDADOS POR EL CEPARIO DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE CUNDINAMARCA.		54
ANEXO 3. ANÁLISIS DE SECUENCIA CEPA <i>Streptomyces sp.</i>		56
ANEXO 4. PRODUCCIÓN DE PHA Y CANTIDADES NECESITADAS PARA EL PROCESO DE EXTRACCION DEL POLIMERO.		59
Bibliografía		62



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materias primas y rendimientos para la producción de PHA. (Salehizadeh, 2003)..	16
Tabla 2. Productividad de PHA con microorganismos, usando como sustrato melazas y sacarosa. (Leda & Freire, 2009)	17
Tabla 3. Microorganismos productores de PHA a partir de almidón (Leda & Freire, 2009) ..	18
Tabla 4. Producción de PHA con <i>Escherichia coli</i> mutada genéticamente. (Rui Li, 2007).....	19
Tabla 5. Familias y Géneros de Actinomycetos (Lamenco, 1970).....	20
Tabla 6. Propiedades físicas del P3HB (Orozco, 2003)	27
Tabla 7. Materiales y Equipos con su respectiva cantidad para el desarrollo experimental.	28
Tabla 8. Reactivos con su respectiva cantidad para el desarrollo experimental.	28
Tabla 9. Recursos usados en el desarrollo de la investigación.	29
Tabla 10. Características del agua que contenía el mucilago de café.	30
Tabla 11. Balance por componentes de la reacción usando como sustrato Mucilago de Café	36
Tabla 12. Balance por componentes de la reacción usando como sustrato Sabouraud	36
Tabla 13. Cantidad de producto de acuerdo a cada sustrato y la estequiometria de las reacciones.....	37
Tabla 14. Medio Sabouraud. Mezclar los componentes y disolver en 30g/L, ajustar el pH a $5,6 \pm 0,1$. Agitar y autoclavar (121°C). Servir asépticamente.	53
Tabla 15. Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa de Café. Mezclar los componentes y disolver en 30g/L, ajustar el pH a $5,6 \pm 0,1$. Agitar y autoclavar (121°C). Servir asépticamente.	53

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Parte de una cadena de pectina. (Verlag, 1987).....	22
Ilustración 2. Estructura general de los PHA. (Leda & Freire., 2009)	22
Ilustración 3. Recolección de la muestra del Mucilago de Café.	30
Ilustración 4. Aislamiento previo de los actinomicetos según características morfológicas.	32
Ilustración 5. Actinomiceto aislado y seleccionado para la producción del biopolímero.	33
Ilustración 6. Actinomiceto seleccionado visto microscópicamente a 40X.....	33
Ilustración 7. Fragmentos amplificados en gel agarosa al 1,5%. 790 pares de bases. Carriles; A,B,C,D: amplificados de cuatro colonias diferentes provenientes de cuatro cultivos independientes. E: Marcadores de Peso Molecular. HyperLadder II. Bioline	34
Ilustración 8. Ensayo realizado para la producción de PHA, mediante Mucilago de café y Glucosa en diferentes concentraciones como sustrato y <i>Streptomyces sp.</i> Aislados del suelo de Boyacá y brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca.	39



Ilustración 9. Curvas de crecimiento de <i>Streptomyces sp</i> aislados del suelo de Boyacá como sustrato Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa en las diferentes concentraciones a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	39
Ilustración 10. Curvas de crecimiento de <i>Streptomyces sp</i> brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato Sabouraud en las diferentes concentraciones a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	40
Ilustración 11. Curvas de crecimiento de <i>Streptomyces sp</i> brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa en las diferentes concentraciones a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	40
Ilustración 12. Curva de Calibración Estándar de Azúcares reductores.	42
Ilustración 13. Curva de Azúcar reductor <i>Streptomyces sp</i> aislados del suelo de Boyacá como sustrato medio Sabouraud con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	42
Ilustración 14. Curva de Azúcar reductor <i>Streptomyces sp</i> aislados del suelo de Boyacá como sustrato el medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	43
Ilustración 15. Curva de Azúcar reductor <i>Streptomyces sp</i> brindados de la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato medio Sabouraud con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	43
Ilustración 16. Curva de Azúcar reductor <i>Streptomyces sp</i> brindados de la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato el medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con el respectivo error estándar +/- SD n=3.	43
Ilustración 17. Muestras obtenidas de la célula seca en cloroformo. Parte superior biomasa parte inferior cloroformo con el PHA disuelto.	45
Ilustración 18. Producción del polímero por medio de Medio Sabouraud con <i>Streptomyces sp</i> . Aislados del suelo de Boyacá. Cantidad Producida 0,029g. Concentración 20g/L.	46
Ilustración 19. Producción del polímero por Sabouraud con <i>Streptomyces sp</i> . Brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca. Cantidad Producida: 0,013g. Concentración 10g/L.	46
Ilustración 20. Producción del polímero por Medio Sabouraud con <i>Streptomyces sp</i> . Brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca. Cantidad Producida: 0,039g. Concentración: 10g/L.	46
Ilustración 21. Espectro obtenido por medio FTIR del polímero producido	49
Ilustración 22. Espectro obtenido por FTIR producido por <i>B.licheniformis</i> AS3-2. 1). 3425.89 , 2). 2977.4, 3). 2934.42,4). 2073.77, 5). 1639.94, 6). 1541.44, 7). 1452, 65, 8). 1402.04. 9) 1384 10). 1315 11). 1240 12). 1162 13). 1113 14). 1082 15). 611. Tomado de (Shah, 2012) 49	49
Ilustración 23. Termogramas obtenidos del polímero producido mediante <i>Streptomyces sp</i> y Medio Sabouraud.	50



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de buscar nuevos plásticos biodegradables no contaminantes y de un bajo costo, que a su vez puedan competir con los plásticos fabricados a partir de derivados del petróleo, abre uno de los campos en la industria de materiales con mayor investigación en el mundo. La producción de biopolímeros es uno de los objetivos más importantes en el desarrollo de esta industria, debido a que se considera como una solución sostenible hacia la producción de plásticos. Una alternativa para la producción de plásticos biodegradables corresponde a los Polihidroxicanoatos (PHAs), cuya elaboración implica costos que son significativos, referido principalmente al sustrato, el cual representa hasta el 50% del costo total de la producción (Solans, 2003), los cuales podrían disminuirse si se utilizan subproductos de otras industrias.

Uno de los métodos mediante el cual es posible aprovechar los recursos naturales, como lo son los subproductos de la agricultura y que a su vez genera mayor rentabilidad, corresponde a la producción fermentativa, en donde los polímeros son sintetizados por especies bacterianas en condiciones específicas de crecimiento referidas al exceso de una fuente carbonada y cantidades limitantes de nitrógeno combinado, azufre, magnesio y potasio.

Por dicha razón, resulta de gran importancia determinar si por medio del Mucilago de Café, se logra usar los componentes como sustrato para *Streptomyces sp.* Y así la producción de P3HB evaluando el efecto de cada una de las condiciones.



2. JUSTIFICACIÓN

Es conveniente evaluar fuentes de carbono más económicas para la producción del PHA, es por esta razón que el sustrato seleccionado corresponde al Mucilago de Café, donde por 1kg de café se producen 91ml de mucilago, referido específicamente al 25% de los subproductos de la industria cafetera. (Rodríguez, 2010). residuo agroindustrial que presenta altos contenidos de pectina y que está siendo arrojado a los ríos generando repercusiones negativas en el medio ambiente.

En cuanto al proceso de producción fermentativa, debido a la gran biodiversidad microbiológica que presenta Colombia, es posible aislar microorganismos productores de diferentes tipos de PHA; como lo son los *Streptomyces sp*, los cuales serán aislados de muestras de suelo de la región de Boyacá de la rizosfera para la producción de P3HB. De esta manera se estaría produciendo un polímero biodegradable que puede llegar a reemplazar algunos de los polímeros sintéticos de gran implementación actualmente en la industria, al ser biodegradable y presentar bajos costos de producción a partir de la utilización de residuos agroindustriales; valorizando el subproducto y confiriéndole a su vez un valor agregado.



3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener a escala de laboratorio P3HB a partir del aprovechamiento de subproductos agroindustriales del café, Mucilago de café como fuente sustrato para los *Streptomyces sp*, aislados de suelos de Boyacá (Colombia) en función de las condiciones de preparación, condición de reacción y purificación de las materias primas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Estado del Arte

En los inicios el hombre se encargó de extraer materiales conforme a las necesidades que cada cual tenía. En el siglo XXI, con el avance tecnológico resulta viable fabricar materiales a medida acorde a las necesidades del momento. En este desarrollo se evidencian algunos problemas ambientales generados por los distintos materiales, por dicha razón, se buscan nuevas fuentes renovables de materias primas. Los bioplásticos es un modelo de los nuevos materiales que se deben desarrollar.

El uso de plásticos sintéticos se ha extendido ampliamente en el mercado, debido a sus propiedades consistentes en peso ligero, hidrofobicidad, estabilidad química, resistencia especial a químicos corrosivos y al deterioro biológico; además no son tóxicos y resultan versátiles en estructura. (Sepulveda, 1198). En cuanto a los plásticos sintéticos se conocen tres familias: poliolefinas (polímeros derivados de hidrocarburos alifáticos) como el etileno, propileno e isobutileno, en segundo lugar se encuentran los polímeros vinílicos como el cloruro de polivinilo y finalmente los productos derivados del estireno como el poliestireno. Existen tres principales requisitos que deben cumplirse para que ocurra una completa biodegradación de materiales poliméricos del tipo de las poliolefinas. Primero, el polímero debe ser convertido en productos metabolizables por medio de reacciones no biológicas; segundo, el medio al que el polímero es expuesto debe facilitar las reacciones de ruptura de la molécula y no inactivar el sistema de degradación, y tercero, un alto porcentaje de los productos finales de estas reacciones debe tener un tamaño de molécula menor de 32 átomos de carbono para que lo haga susceptible al ataque microbiano (Sepulveda, 1198). Cabe mencionar que estas tres familias las cuales son las más usadas mundialmente presentan una tasa baja de degradabilidad.

Actualmente, existen diferentes métodos para la disposición adecuada de los plásticos. Uno de ellos son los vertederos, en donde la tasa de degradación puede ser extremadamente lenta, otro de ellos es la incineración la cual resulta costosa y generan grandes cantidades de subproductos, muchos de origen contaminante y otros que resultan tóxicos. En los últimos años se han desarrollado diversos plásticos, cambiando su proceso para inducir la hidrólisis, u oxidación y así facilitar la biodegradación, algunos de ellos. Por ello, una alternativa para disminuir el impacto ambiental mundialmente es reemplazar los plásticos convencionales derivados del petróleo por polímeros de origen biológico, tales como derivados de almidón, polivinil alcohol, ácido poliláctico, polímeros celulósicos, y polihidroxialcanoatos.

Uno de los biopolímeros más producidos por la industria es el ácido poliláctico, el cual aparte de provenir de materias renovables, es económico y fácil de producir. Varios trabajos se han realizado para la producción del ácido poliláctico en donde se lleva a cabo una fermentación, principalmente por medio de *Lactobacilli sp.* y azúcares reductores, en donde se va producir el ácido láctico para luego llevar a cabo una polimerización (Madhavan, 2010). Las principales materias primas para la producción de PLA son alimentos ricos en almidón, como lo son la yuca, el maíz y el bagazo de la caña de azúcar (Madhavan, 2010; Herryman & Carracedo, 2005; Walker, Wang, & Mothé, 2004)

Otro de los polímeros más significativos son los Polihidroxicanoatos (PHA), los cuales se pueden producir por diferentes caminos como melaza y sacarosa, a base de almidón, ácidos grasos y glicerol, sustratos gaseosos, genes bacterianos para síntesis de PHA en plantas, entre otros. Los PHA son candidatos potenciales para el uso en aplicaciones como tratamiento de heridas, la ortopedia, dispositivos de sistema vascular, envases para shampoo, entre otros. Los polihidroxicanoatos (PHA) son sintetizados por especies de distintos géneros bacterianos en condiciones de crecimiento caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno o fósforo (Almeida, Ruiz, & Pettinari, 2004). El primer PHA identificado fue el poli (3-hidroxibutirato) [P (3HB)] a partir de *Bacillus megaterium* (Leda & Freire, 2009). Posteriormente, se encontraron diferentes bacterias productoras de PHA. Además de sus propiedades termoplásticas, los PHA son biodegradables, y pueden ser producidos a partir de recursos renovables, en su producción fermentativa utiliza productos derivados de la agricultura como fuente de carbono.

Entre las técnicas de caracterización de PHA Lauzier et al, 1992. trabajaron pequeñas cantidades de P (3HB) mediante la microscopía de transmisión y difracción electrónica; estos mostraron que el plástico presentaba una corteza compuesta por cristales y un núcleo blando no cristalino (Lauzier C et al, 1992) Por otro lado Tadakoro et al. estudiaron la estructura cristalina del polímero mediante Rayos X proponiendo celdas ortorrómbica con diferentes parámetros P212121-D42, con $a= 5.76 \text{ \AA}$, $b= 13,20 \text{ \AA}$ y $c= 5,96 \text{ \AA}$ (Lauzier C et al, 1992).

De acuerdo al estudio realizado por Solans et al, 2003 en el cual se aislaron 62.3% cepas de actinomicetos las cuales fueron aisladas de la rizosfera y agrupadas en géneros *Streptomyces sp*, *Actinoplanes sp*, *Pilimelia sp* y *Nocardioformas sp*. Y el 37,7% se encontró en el rizoplano correspondiente a géneros de *Streptomyces sp*, *Micromonospora sp*, *Actinomadura sp* y *Streptosporangium sp*; también se midió su actividad de degradación encontrándose un total de 68% de las cepas mostró actividad enzimática para degradar almidón, 65.6% pectina, 59% celulosa, 28.7% hemicelulosa,

3.3% queratina y 15.6% presentó una fuerte afinidad para usar preferiblemente lignina como sustrato. (Solans, 2003).

Según D. Fernández, 2005 la producción de PHA por *Pseudomonas aeruginosa*, con ácido oleico como fuente de carbono se tuvo en un 54,6%, y finalmente se le realizó caracterización al PHA. Otro de los sustratos usados fue el aceite de soja encontrándose una producción de 66,1%, el 16,8% cuando se utiliza como fuente de carbono la glucosa.

La producción de PHA se puede llevar a cabo por diferentes sustratos como se puede observar en la tabla 1. La importancia de escoger un sustrato radica en el valor final del PHA, pues como se puede apreciar en la tabla 1, encontramos que entre mayor sea el precio del sustrato, mayor es el valor del PHA, el cual se puede observar por ejemplo en sustratos como la glucosa, el ácido acético y el etanol con un precio de sustrato aproximadamente del \$0.52 por kilogramo de sustrato, generando precios del PHA mayores a 1 dólar por kilogramo de producto. Según la tabla 1, se puede observar que la materia prima que genera el menor costo para el PHA es el suero de queso con un valor de \$0.22 por kilogramo de PHA, el cual puede ser comparado con el precio del plástico derivado del petróleo como lo es el polipropileno el cual tiene un valor de \$0.185 por kilogramos de plástico (Salehizadeh, 2003) También se puede ver que entre más alta sea el rendimiento de producción de PHA el costo del mismo baja, como es el caso del etanol.

Sustrato	Precio (US \$ Kg ⁻¹)	Campo(g PHB/g Sustrato)	Costo del sustrato (US \$ Kg ⁻¹ PHB)
Glucosa	0,493	0,38	1,35
Sacarosa	0,295	0,40	0,72
Metanol	0,180	0,43	0,42
Ácido acético	0,995	0,38	1,56
Etanol	0,502	0,50	1,00
Melaza de caña	0,220	0,42	0,52
Suero de queso	0,071	0,33	0,22
Almidón de maíz hidrolizado	0,220	0,185	0,58
Hemicelulosa hidrolizada	0,069	0,20	0,34

Tabla 1. Materias primas y rendimientos para la producción de PHA. (Salehizadeh, 2003)

Otra forma de disminuir el costo de producción del PHA es escoger adecuadamente el microorganismo, para llevar a cabo la fermentación. Entre los principales microorganismos puros encontramos el *Azotobacter vinelandii* en una fermentación con melazas de remolacha con una productividad de 0.66 g/Kg/h, el cual es uno de los microorganismos que presenta mayor productividad en sustratos como melazas y sacarosa. En la tabla 2, se pueden apreciar otros microorganismos que generan altas productividades en sustratos como las melazas y la sacarosa, de los cuales el que presenta

la mayor productividad de PHA es una mezcla de *Bhurkolderia sp.* y *Cupriavidus necator*, con una producción de entre 1.4 y 2 g/Kg/h.

Cepa	Tipo de PHA	Tipo de fermentación y escala	Modo de operación	Medio de cultivo	Tiempo a PHA _{MÁX} (H)	X (g/kg)	Contenido PHA(%)	Productividad (g/kg/h)
<i>Bacillus cereus</i> MS	P(3HB)	SMF, Matracas de agitación.	Batch	Melaza de remolacha(1 % p/v)	72	0,13	73,8	0,001
				Melaza de remolacha(5 %p/v)	24	0,43	38,5	0,007
<i>Azotobacter vinelandii</i> UWD	P(3HB)	SMF, Biorreactor.	Alimentación Batch	Melaza de remolacha	35	34,9	66	0,66
	P(3HB-co-3HV)			Melaza de remolacha + valerato	39	29,2-31,0	59-71	0,51
<i>E.Coli</i> Recombinante(Genes C.necator)	P(3HB)	SMF, Matracas de agitación	Alimentación Batch	Melaza de remolacha+ sales+trazas de metales	68	11,2	80	0,13
	P(3HB)	SMF, Biorreactor.			31,5	39,5	80	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P(3HB)	SMF, Biorreactor.	Batch	Caña de azúcar+licor +glutamato+ sales	96	32	70	0,23
<i>Bhurkolderia s.p</i>	P(3HB)	SMF, Biorreactor.	Alimentación Batch	Sucrosa de caña de azúcar	45-50	120-150	65-70	1,4-2,00

Tabla 2. Productividad de PHA con microorganismos, usando como sustrato melazas y sacarosa. (Leda & Freire, 2009)

Entre otros microorganismos encontramos el *Azotobacter chroococcum* como el mayor productor de PHA usando como sustrato el almidón. La producción del microorganismo presentado anteriormente fue de 0.36 g/kg/h, siendo considerablemente menor a la productividad obtenida en los microorganismos donde se usaron sustratos como la melaza. A continuación se pueden ver otros microorganismos productores de PHA a partir de almidón.

Cepa	Tipo de PHA	Tipo de fermentación y escala	Modo de operación	Medio de cultivo	Tiempo para PHA _{max} (h)	X (g/kg)	Concentración de PHA _{max} (g/kg)	Contenido PHA (%)	Productividad (g/kg/h)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	P(3HB)	SMF, Biorreactor	Alimentación Batch	Almidón soluble	70	54	25	46	0,36

<i>Bacillus cereus</i>	P(3HB)	SMF, Matracas de agitación	Batch	Almidón soluble+extracto de levadura +sales	72	1,0	0,48	48	0,07
<i>C.necator</i>	P(3HB)	SMF, Matracas de agitación	Alimentación Batch	Trigo hidrolizado +extracto de hongos	168	73,2	51,1	70	0,32

Tabla 3. Microorganismos productores de PHA a partir de almidón (Leda & Freire, 2009)

Anteriormente se describieron algunos de los microorganismos productores de PHA, pero se sabe que existen alrededor de 300 especies de microorganismos que producen PHA, pero entre los más destacados y más estudiados se encuentran *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas* genus y *Burkholderia cepacia* (Gerhart, Gilles, & Klaus, 1998). Con la aparición de la ingeniería genética lo que se busca hacer es mutar las cepas con genes de otros microorganismos para hacerlos más resistentes a ciertas condiciones, en este caso se mutan los genes principalmente de la *Escherichia coli* con genes de bacterias productoras de PHA como las mencionadas anteriormente, para generar una mayor productividad de PHA. En la tabla 4 se observan algunas mutaciones y sus productividades, siendo la mejor la mutación que se llevó a cabo con *Escherichia coli* y *Alcaligenes latus*, con una productividad de 4.63 g/L/h (Rui Li, 2007).

Cepa	Modo de cultivo	Tipo de PHAs	Mayor sustrato	Concentración celular (gL ⁻¹)	Contenido PHA (%)	Productividad (gL ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Fed-Batch	Alimentación Batch	Glucosa	194,1	73	4,63
<i>Escherichia coli</i> HMS174	Fed-Batch	Alimentación Batch	Melazas	39,5	80	1
<i>Escherichia coli</i> GCSC4401	Células Reciclo. Fed-Batch	Reciclo celular. Alimentación Batch	Suero(lactosa)	194	87	4,6
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Fed-Batch	Alimentación Batch	Glucosa propioni. Suplemento de ácido oléico.	203,1	78,2	2,88
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Fed-Batch	Alimentación Batch	Glucosa, 4-hidroxibutarato.	12,6	36	0,07
<i>Escherichia coli</i>	Fed-Batch	Alimentación Batch	Ácido decanoico	2,6	38	0,06



RS3097			CO			
--------	--	--	----	--	--	--

Tabla 4. Producción de PHA con *Escherichia coli* mutada genéticamente. (Rui Li, 2007)

En el estudio realizado por la Pontificia Universidad Javeriana (Franco & Gomez Mendez, 2009) , fueron aisladas cepas de Actinomicetos de suelo rizosférico proveniente de cultivos de vid de la zona de la región de Boyacá, Colombia. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, encontrándose una cepa de *Streptomyces subbrutilus* sometidas a propanolisis para su polimerización de PHA con un rendimiento del 27,48% en peso seco.

4.2 Marco Teórico

4.2.1 Organismos en la rizósfera del suelo

El suelo es un fragmento que contiene diferentes nutrientes necesarios para qué plantas y animales se puedan alimentar y vivir en este ambiente, sin embargo, es de gran relevancia que muchos seres viven en el, esta variedad existente se debe a los materiales que la componen, la humedad, la textura y la profundidad. Los organismos existentes en el suelo pueden ser aerobios, anaerobios o facultativos. Algunas de las bacterias más características encontradas en el suelo son: Pseudomonas, Eubacterias, y Actinomicetos.

Los microorganismos del suelo mantienen un equilibrio inestable. Cuando se introducen plantas en el suelo, las raíces liberan células y sustancias al medio como proteínas, aminoácidos, hormonas, etc. sobre las cuales se pueden desarrollar los diferentes microorganismos.

En 1904 Hittner definió la rizósfera como la parte del suelo donde el sistema radical induce la proliferación microbiana. Esta región, comprende entre 1 – 2 mm de suelo a partir de la superficie de la raíz. En esta zona se distinguen Endorrizósfera, la cual es la zona de tejido cortical donde pueden proliferar los microorganismos, Rizoplano la superficie radical y el suelo rizosférico. (Benintende, 2010).

4.2.2 Actinomicetos

Los actinomicetos es un grupo de microorganismos filamentosos los cuales crecen en forma de red denominada micelio, la composición del ADN se encuentra entre 63% y 78% GC del genoma de un organismo, en donde G y C son guanina y citosina, respectivamente. En su generalidad los actinomicetos forman esporas y se agrupan progresivamente. Uno de los géneros de los Actinomicetes son los *Streptomyces sp.* Se caracterizan por ser aerobios, y resultan ser responsables del olor y del gusto desagradable del agua potable. (Madigan & Martinko, 2004)

Estos microorganismos abundantes en suelo son importantes saprófitos de plantas, capaces de degradar moléculas complejas y sustancias recalcitrantes como celulosa, lignocelulosa, xilano y lignina, adicionalmente juegan un importante papel en el proceso de descomposición de material orgánico, debido a sus enzimas líticas (Franco & Gomez Mendez, 2009)

Son considerados como transicionales entre bacterias y hongos. Son unicelulares produciendo un micelio muy tenue, cuyas hifas se asemejan a los filamentos fungales. Inicialmente fueron clasificados como hongos, y actualmente existe la tendencia de considerarlos dentro de las bacterias. Pertenecen a la clase de los Schizomycetos, orden de los Actinomycetales. (Lamenco, 1970) En la siguiente tabla se pueden apreciar las familias y géneros:

Familia	Género
Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>
	<i>Nocardia</i>
	<i>Micropolyspora</i>
Streptomycetaceae	<i>Micromonospora</i>
	<i>Thermoactinomyces</i>
	<i>Thermomonospora</i>
	<i>Microbispora</i>
	<i>Streptomyces</i>
Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i>
Actinopnaceae	<i>Microellobosporia</i>
	<i>Streptosporangium</i>
	<i>Spirillospora</i>
	<i>Actinoplanes</i>
	<i>Ampullariella</i>
	<i>Amosphosporangium</i>

Tabla 5. Familias y Géneros de Actinomycetos (Lamenco, 1970)

4.2.3 *Streptomyces sp*

Es un género compuesto por grandes especies, se conocen más de 500 con un GC entre 69%-73mol%. Algunos de ellos generalmente se encuentran en el suelo, sin embargo, estos también habitan en medios acuáticos. Resulta importante mencionar, que el olor característico de la tierra es debido a algunos metabolitos denominados geosminas, los cuales son sesquiterpenoides (compuestos aromáticos insaturados de carbono oxígeno e hidrógeno) (Madigan & Martinko, 2004)

Para el proceso de aislamiento, se debe tomar una suspensión de agua estéril con suelo y sembrarla en un medio selectivo (contienen sales inorgánicas, a las cuales se pueden añadir almidón, asparragina, malato

cálcico como fuente de nitrógeno), posteriormente debe ser incubado a 25°C durante 5 a 7 días al aire. A continuación se reconocen las placas para colonias características de la especie y se utilizan las esporas de colonias para el aislamiento en cultivo puro, estos microorganismos producen enzimas extracelulares las cuales admiten utilizar diversos sustratos como el almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina, tanino o incluso gomas. Sin embargo, también pueden ser aisladas sembrando directamente una solución de suelo sobre medio alcalino que contenga polímeros como caseína, o almidón, este aislamiento puede ser capaz de utilizar 50 fuentes de carbono diferentes, dicho crecimiento se ve beneficiado en presencia de aireación forzada.

4.2.4 Mucilago de café

El mucilago de café es uno de los subproductos de la industria cafetera, al cual se le confiere una importancia significativa como sustrato en fermentaciones para la producción de diversos metabolitos, esto se debe a la cantidad de azúcares reductores presentes en este subproducto y a su vez a la facilidad de ser utilizados por los microorganismos.

El mucílago es uno de los residuos que genera alta contaminación, dentro de su composición química, el 35,8 % son sustancias pépticas totales, el 17 % representa celulosa y cenizas y el 45,8 % son azúcares totales. Dentro de la composición del fruto, el 16 % es mucílago (mesocarpio), 42 % es pulpa (exocarpio), 18% es semilla (endospermo), el 4% es pergamino o cascarilla (endocarpio) y el 20 % es agua (Lucas & Morales, 2006).

Cabe anotar que por 1kg de café se producen 91ml de mucilago, referido específicamente al 25% de los subproductos de la industria cafetera, igualmente es muy rico en sustancias pépticas, por lo cual actualmente se está utilizando el mucilago mediante hidrólisis ácidas y alcalinas, al igual que precipitaciones con alcohol y sales de aluminio para la obtención de pectinas comerciales. (Rodríguez, 2010).

Azúcares naturales del fruto del café, procedentes principalmente del agua del despulpe reciclada: son en su mayor parte monosacáridos, glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, con un sabor distinto, que recuerda al de las ciruelas, y podrían comercializarse como una novedad para el connoisseur de café más refinado (Lucas & Morales, 2006).

4.2.5 Pectina

La pectina es un polisacárido ácido de origen natural, presente en una gran variedad de frutas. Las pectinas están presentes en la pared celular, se extraen de cascarras de cítricos a través de extracción acuosa, posteriormente una purificación y separación por medio de una precipitación con etanol, para llevar posteriormente un secado, molido y almacenado el

cual se lleva a cabo en estado sólido, a temperaturas bajas, en ausencia de microorganismos y en solución con un pH ácido entre 2,5 y 4,5 (Rios, Betancur, & Ocampo, Abril, 2008).

Las pectinas están constituidas por moléculas del ácido D-galacturónico, procedentes de la degradación del poligalacturonano, cuyos grupos carboxílicos se encuentran parcialmente esterificados con etanol (Verlag, 1987) . Cabe anotar, que es una especie de gelatina en presencia de azúcar y ácidos.

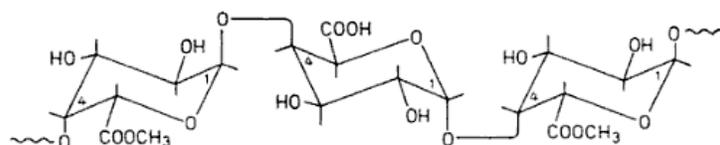


Ilustración 1. Parte de una cadena de pectina. (Verlag, 1987)

4.2.6 Poli-3-hidroxi-butirato (P3HB)

Existen variedades de PHA, una de ellas es el polihidroxi-butirato (P3HB), son polímeros de cadenas de hidroxialcanoicos que se acumula intracelularmente en organismos procariontas. La fórmula general del P3HB se muestra en la ilustración 2, el cual cuenta con n igual a 1 y R es el grupo metilo(CH₃). (Leda & Freire, 2009).

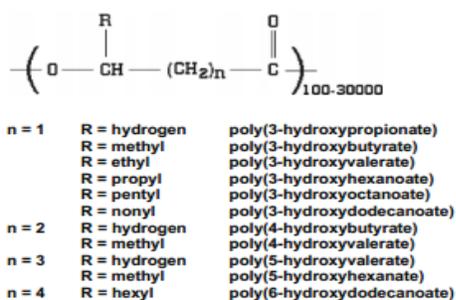


Ilustración 2. Estructura general de los PHA. (Leda & Freire, 2009)

Según Leda E. Castillo, 2009 menciona que las propiedades del PHAs varían ampliamente de acuerdo a la longitud de la cadena del monómero, en la hidrofobicidad, en el punto de fusión, en la temperatura de transición vítrea, y el grado de cristalinidad. La cadena más corta a estudiar posee una baja permeabilidad y posee buenas propiedades termoplásticas, sin embargo, resulta bastante rígido y fácil a la ruptura que por ejemplo el polipropileno.

Las bacterias empleadas para producir PHAs se dividen en dos grupos de acuerdo a condiciones de cultivo requeridas para la síntesis del polímero. El primer grupo de bacterias requiere de limitación en el medio de cultivo de

uno de los nutrientes esenciales como: N, P, Mg, K, O y S y de un exceso de la fuente de carbono para sintetizar los PHAs. El segundo grupo de bacterias no requiere de limitación de nutrientes para la síntesis de los PHAs y puede acumular el polímero durante su crecimiento como *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* y muchas otras, mientras algunas bacterias como *Alcaligenes latus*, mutantes de *Azotobacter vinelandii* y recombinantes de *E. coli* que poseen el operon para la biosíntesis de PHAs a partir de *Alcaligenes eutrophus* pertenecen al segundo grupo. (Lee, 1996)

4.2.7 Fermentación

Para la producción de P3HB se realiza por vía fermentativa, se utilizan diferentes especies como microorganismos que tienen la capacidad de producir este polímero o microorganismos que son modificados genéticamente. Existen más de 100 especies de microorganismos nativos capaces de producir PHA, pero solo unos pocos lo hacen con un rendimiento importante para aplicaciones industriales (Vasco, 2010). Resulta importante distinguir, que estos biopolímeros se producen intracelularmente en células eubacterias y arqueas.

La principal ventaja de PHA es que se degradan muy rápido se calcula que aproximadamente un 80% en siete semanas, sin embargo, este proceso de elaboración resulta demasiado costoso. Se calcula que producir por fermentación bacteriana 1Kg de PHA cuesta 15 dólares, mientras que hacer un plástico convencional cuesta solo 1 dólar (Industriales, 2010). Es por esta razón, que para minimizar los costos de producción se deben usar materias primas obtenidas a partir de residuos naturales.

Se ha observado, que la síntesis de PHA se realiza básicamente en un cultivo discontinuo, el cual se caracteriza por una fácil manipulación y es conveniente usarlo en experimentos de crecimiento y selección de microorganismos productores de PHA, así mismo, para lograr desarrollar un proceso de producción de PHAs mediante fermentación bacteriana resulta imprescindible optimizar el rendimiento, purificar el polímero y buscar un costo minoritario de los sustratos para su obtención.

5. METODOLOGÍA

En primera medida, se realizó la búsqueda preliminar de información en cuanto a la producción de Polihidroxianoatos (PHAs), considerando ventajas y desventajas en el proceso de producción, costos y a su vez viabilidad; lo cual continuo a lo largo del diseño experimental.

Posteriormente, se filtró la información más relevante, referida específicamente a la producción de PHAs mediante fermentación bacteriana, considerando posibles sustratos, determinando el microorganismo a utilizar y por ende sus condiciones de aislamiento y crecimiento. Seguido de esto, al tener definido el proceso de producción, se realizó una búsqueda de la metodología experimental más conveniente con base en estudios realizados anteriormente del Polihidroxibutarato (P3HB), la cadena más corta de PHAs, dicha metodología es mostrada más adelante.

Se aislaron los microorganismos del suelo de Boyacá y usando como sustrato el Mucilago de Café para obtener el polímero P3HB por medio de fermentación bacteriana, posteriormente el polímero obtenido se analizó por medio de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y Termogravimetría (TGA).

5.1 Extracción del Mucilago de Café

Existen diversos métodos para extraer pectinas y en cada uno de ellos es posible obtener este polisacárido con diversa calidad, esto se debe a la complejidad estructural y la variación natural que presenta la pectina, las cuales a su vez dependen de la especie, condiciones de maduración y tipo de almacenamiento. (Guidi, 2010) En cuanto a la extracción de pectina del Mucilago de café, se evidencia un rendimiento de 82 gramos de pectina por cada 10 kg de Mucilago, el cual contiene 35,8% de sustancias pépticas totales, 45,8 % de azúcares medios y 17% de celulosa. (Restrepo, 2010).

En primera medida se obtuvo la materia prima, en un campo cafetero ubicado en el departamento de Cundinamarca; donde se realiza una clasificación de los componentes del café y en el proceso de lavado se obtiene el Mucilago de Café, el cual se llevó a refrigeración a 4°C con el fin de evitar el crecimiento de los microorganismos en botellas plásticas anteriormente lavadas y esterilizadas.

5.2 Aislamiento de los Microorganismos

Para aislar los microorganismos del suelo de Boyacá, Colombia, se pesaron 100g de muestra de 50 puntos distintos en un área de 10000m², las cuales

fueron cultivadas en 90ml de agua peptonada 0.1%(p/v). (Pedroza, 2006) Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} en agua peptonada a 0,1%(p/v), las diluciones de 10^{-4} a 10^{-8} se sembraron por triplicado en superficie 0,1ml en el medio PDA. Las cajas son incubadas a 22°C por 10días, al transcurrir el tiempo de incubación se realizó el recuento de todas las colonias y se seleccionaron las colonias que presentaron características macroscópicas de los actinomicetos (textura, coloración del micelio aéreo y sustrato, forma, tamaño de colonia y la producción de pigmentos) (Correa, 2008).

5.3 Identificación de los Microorganismos

5.3.1 Caracterización Macroscópicamente – Microscópicamente

Se colocan algunas de las muestras en un porta-objetos y se realizó tinción de Gram, y posteriormente al observar en el microscopio se determinó el micelio aéreo, micelio del sustrato, y los propágulos formados.

Las características observadas fueron: Diámetro de 0,5µm-2,0µm; micelio vegetativo ampliamente ramificado; micelio aéreo que forma cadenas entre 3 y muchas esporas (Correa, 2008). Colonias opacas y de color negro.

5.3.2 Identificación Molecular PCR

La bacteria que se utilizó para este estudio fue tomada de cultivo puro aislada del suelo de cultivo de papa de Boyacá, Colombia y crecida en medio líquido ((PDA) bajo condiciones normales y a una temperatura de 25°C .

Los productos amplificados fueron enviados Macrogen (Corea) y la determinación de la secuencia fue realizada mediante secuenciación automática en el equipo MegaBASE 750 (Amershan Bioscience, USA) utilizando el estuche comercial DYE namic ET Terminator (Amershan Bioscience, USA).

Los cromatogramas fueron editados manualmente con el programa Chromas versión 1.45 (Technelysium, Queensland, Australia).

5.4 Conservación de las cepas de actinomicetos

Para conservación de los microorganismos a corto plazo, se realizaron siembras de las cepas aisladas, se mantuvieron a una temperatura de 4°C, para realizar sub-cultivos cada 30 días y fueron preservadas en tanques de nitrógeno líquido a -70°C.

5.5 Fermentación en medio líquido

Para la fermentación en la producción de PHA, se seleccionó un volumen específico de 200mL; el volumen efectivo de trabajo es el 25% del volumen del reactor, es decir, se trabajó con 60mL con medio Sabouraud (Ver Anexo1) con la cepa de *Streptomyces sp*, en donde se varió la relación carbono:nitrogeno . A continuación incubó a una temperatura de 25°C y a 200rpm, transcurridos 8 días se separó la biomasa del medio, se rompen las células y se obtiene el PHA. (Zakariaa & Hidayah Ariffina, 2010)

El microorganismo a usar se colocó en 9 ml de Caldo Agar hasta llegar a un Mc Farland 4 equivalente a $1,2 \times 10^9$ ufc/ml; para iniciar el proceso de producción de PHA se tomó un inóculo de 0,5ml (6×10^8 ufc). El inóculo sembrado se manejó de dos maneras; con *Streptomyces sp*. aislados del suelo de Boyacá y *Streptomyces sp*. brindados por el cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca.

Posteriormente dicho inóculo se sembró en dos medios:

- 50ml de medio Sabouraud (Ver Anexo 1) como control ajustando el pH a $5.6 \pm 0,1$ con diferentes concentraciones de glucosa: 5, 10, 20 y 40g/L con una variación de $\pm 0,1$ g/L, dicho procedimiento se realizó triplicado en Erlenmeyer de 250ml con un volumen de trabajo de 50ml, se manejó agitación constante de 200rpm a una temperatura de 25°C, con el fin de favorecer la distribución homogénea del aire dentro de los erlenmeyers. Se registraron datos de crecimiento y de azúcares reductores cada 9 horas durante 8 días.
- 50ml de Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa (Ver Anexo 1), se tomaron las mismas condiciones descritas anteriormente; variando la concentración de glucosa por la del mucilago de café en las mismas concentraciones de 5, 10, 20 y 40g/L donde también se realizó por triplicado que provenía de tres lotes del proceso de desmucilgado de café.

5.6 Extracción del Polímero

La extracción de PHA se realizó con cloroformo al 90% el cual es un método muy usado a escala de laboratorio por su rapidez y eficiencia en la extracción del polímero P3HB. Primero se realizó una centrifugación para separar la biomasa del medio de cultivo a 6000rpm por 30min, posteriormente se realizó el método de Cloroformo; cerca de 3,0 g de células secadas se colocan con 600 ml de cloroformo durante 24 h a 30°C. Los extractos se filtraron para eliminar los residuos celulares, y el cloroformo se evaporó en cámaras de extracción. (Zakariaa & Hidayah Ariffina, 2010)

5.7 Caracterización del Polímero

Para la caracterización del polímero se empleó el método TGA (termogravimetría), en donde se pueden observar algunas de las propiedades apreciadas en la tabla 6, en la cual es posible apreciar las propiedades físicas más representativas del P3HB.

Propiedad	Valor
Temperatura de transición vítrea (T _g)	2°C
Temperatura de fusión	177 °C
Cristalinidad	70%
Extensión hasta quebrar	5%
Resistencia a la tracción	40 MPa

Tabla 6. Propiedades físicas del P3HB (Orozco, 2003)

Otra de las pruebas, para la caracterización fue Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para demostrar por el espectro que el biopolímero es P3HB.

6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Para la realización experimental del proyecto se realizó un listado de todos los reactivos, materiales y equipos necesarios, determinando a su vez las cantidades requeridas y su disponibilidad en los laboratorios de la Universidad de La Sabana, Chía. Colombia.

Materiales	Cantidad	Equipos	Cantidad
Filtro de papel	4	Plancha de calentamiento	1
Tubos de ensayo	24	Medidor de pH	1
Cajas de Petri	4	Estufa	1
Asa de siembra	2	Incubadora	1
Mechero	2	Shaker	1
Magneto	2	Centrifuga	1
Vaso precipitado 100ml	5	Vortex	1
Erlenmeyer de 250ml	24	Nevera	1
Tubos Falcon	48	Shaker	1
		Centrifuga	1

Tabla 7. Materiales y Equipos con su respectiva cantidad para el desarrollo experimental.

Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Mucilago	10 Kg	Glucosa	50ml
Agua destilada	10L	Indicador Lugol	-----
Suelo de Boyacá	10 gr	Etanol 96% (Indicador)	-----
Agua peptonada 0,1% p/V	90 ml	Potasio y sodio tartrato	50g
Prueba bioquímica de ureasa semi-solida	2	Ácido 3,5 dinitrosalicílico	100g
Agar-Agar 15 g/l	-----	Sodio hidróxido en lentejas	30g
Extracto de levadura 3g/l	-----		

Tabla 8. Reactivos con su respectiva cantidad para el desarrollo experimental.



6.1 Recursos Económicos

El costo de los materiales que fueron adquiridos se muestra en la tabla 9.

PRODUCTO	MARCA	CANTIDAD	VALOR UNITARIO
POTASIO Y SODIO TARTRATO	PANREAC	500 GR	75.000
ÁCIDO 3,5 DINITROSALICILICO	PANREAC	100 GR	370.000
SODIO HIDROXIDO EN LENTEJAS	PANREAC	1 KG	60.000
TUBOS FALCON CON TAPA ESTERILES CPACIDAD 50 ML	NEST	PQTEX50	70.000
SERVICIO DE SECUENCIACION	BIODIAGNOSTIC	2	90.000

Tabla 9. Recursos usados en el desarrollo de la investigación.

Estimativo total del proyecto: \$665.000

El proyecto estuvo financiado por GEMA, Grupo de Investigación Energía de Materiales de Ambiente de La Universidad de La Sabana.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Extracción del Mucilago de Café

La muestra de Mucilago de Café se obtuvo de tres lotes el 11 de Mayo del 2013 de la corriente de salida del proceso de desmucilgado del café, a una velocidad de 170rpm de una cosecha ubicada en el departamento de Cundinamarca (Latitud: 5.13095, Longitud: -74.1602 5° 7' 51" Norte, 74° 9' 37" Oeste). Se recolectaron 5 litros por medio de botellas plásticas (ver ilustración 3) anteriormente lavadas y esterilizadas las cuales posteriormente fueron llevadas al laboratorio de Biología de la Universidad de La Sabana y se introdujeron a 4°C con el fin que se refrigerara, se evitara descomposición y desnaturalización de las pectinas; pues esta se caracteriza por ser un agua rica en azúcar y tiene la desventaja que se fermenta con rapidez por los microorganismos que se encuentran de forma natural en el fruto (Palma, 2009).

Consecutivamente, se caracterizó la muestra, para ello se filtró con el fin de remover en su totalidad los residuos sólidos; se realizaron dos filtraciones de tal manera que en la primera, se removiera el material solido de gran tamaño por medio de una gasa, y en la segunda se eliminara el material solido pequeño por medio de un papel filtro Whatman N° 5, luego se determinó el pH, color y olor del mucilago. (Ver tabla 10).

Característica	Valor
pH	5,01±0.01
Color	Café clara
Olor	Incoloro
Residuos	Ninguno

Tabla 10. Características del agua que contenía el mucilago de café.



Los primeros ensayos fueron realizados para tener un acercamiento al método de extracción de la pectina, y observar dificultades que ayudaran a las pruebas siguientes. Generalmente, las pectinas se extraen de residuos mediante un proceso fisicoquímico en múltiples etapas, caracterizado por una extracción con ácido y se recupera con una precipitación con alcohol (Palma, 2009). Por lo tanto, se realizó una variación al procedimiento en

donde no se realizó la extracción de pectina con el objeto de no adicionar operaciones que encarezcan el proceso y determinar si el mucilago sin tratamiento puede ser una fuente de carbono para *Streptomyces sp.* en la síntesis de PHA., por ende, se trabajó con todo el agua de Mucilago de Café para darle un valor agregado; que actualmente resulta ser un desecho agroindustrial.

Según estudios realizados por (Palma, 2009) para que el Mucilago de café sea usado como sustrato, se debe autoclavar pues esta presenta poco cambio cuando se somete a dicho proceso y se conservan las características fisicoquímicas. Se midió la cantidad de azúcares reductores antes y después de autoclavar, donde se observó que dicha cantidad no variaba presentando un valor de $13\text{g/L} \pm 0.1$.

7.2 Aislamiento de los Microorganismos

En su mayoría, el plástico proviene del petróleo y se estima que entre un 5% y un 7% de la producción mundial de este recurso, es destinado a la producción de este material. Para producir un kilo de plástico se requieren dos kilos de petróleo (ACRR, 2004). Es por ello, que es necesario encontrar nuevas alternativas de producción de polímeros que sean amigables con el ambiente. Se conoce por lo menos 75 géneros diferentes de bacterias que se sabe que acumulan poli - β - hidroxibutírico (PHB) en gránulos intracelulares como principal reserva intracelular de carbono (Colon, 2000); entre ellos se encuentran, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Methylocystis*, *Leptothrix*, *Pseudomonas*, *Beggiatoa*, *Rhizobium*. Previos ensayos mostrados en el estado del arte demostraron la producción de PHB con *Streptomyces sp.*, sin embargo, en busca de generar un polímero biodegradable a un menor costo se decide investigar la producción de este con un residuo agroindustrial conocido como el Mucilago de Café.

Para el aislamiento de los microorganismos se procedió a tomar de forma aleatoria una muestra de 100g de la superficie del suelo de cultivos de papa de Chiquinquirá, Boyacá (Latitud: 5.617, Longitud: -73.85° 37' 1" Norte, 73° 48' 0" Oeste) en 50 puntos de muestreo rizosférico (0-10cm de profundidad) distribuido en 10 000m², a una temperatura de 15°C y humedad 75%. Consecutivamente, al tomar de dicho suelo 50 muestras se procedió a realizar las diluciones y el procedimiento enunciado en el ítem 6.2.

La profundidad, el contenido de agua y el tipo de suelo, influyen sobre la presencia de estas bacterias en la superficie; por ello estas características se consideraron para tomar las muestras de suelo, ya que como lo expresa (Bautista & Cruz, 2009) el número de bacterias disminuye al aumentar la profundidad del suelo. Además de ello se debe considerar la temperatura y la aireación, puesto que estimulan el crecimiento de estas bacterias filamentosas en el suelo. Es así como, el manejo de los cultivos le confiere

una mejor aireación, actividad que incrementa el crecimiento de estas bacterias aerobias (Bautista & Cruz, 2009); en vista de ello se consideró conveniente elegir muestras de suelos agrícolas, se tomó la muestra de un cultivo de papa en Chiquinquirá, Boyacá (Latitud: 5.617, Longitud: -73.85° 37' 1" Norte, 73° 48' 0" Oeste).

7.3 Identificación de los Microorganismos

7.3.1 Caracterización Macroscópicamente – Microscópicamente

A partir de las 50 muestras seleccionadas de los suelos de Boyacá, Colombia, se logró aislar dos cepas (Ver ilustración 4) donde se seleccionaron las colonias que presentaban características macroscópicas de los actinomicetos como textura polvorienta, olor a suelo húmedo, coloración negra, forma redonda, tamaño de colonias grandes, bordes irregulares, consistencia dura, y al transcurrir aproximadamente 3 semanas se comportara como hongo (Correa, 2008).

En la ilustración 4 se observa el aislamiento en medio Agar Dextrosa Papa (PDA) de los actinomicetos según características morfológicas; pasadas tres semanas unos tomaron una coloración blanca y otro negra, en el Anexo 2 se observa el crecimiento de cada una de ellas en medio solido Agar Dextrosa Papa (PDA).



Ilustración 4. Aislamiento previo de los actinomicetos según características morfológicas.

Debido a que los actinomicetos se encuentran en el suelo y son los responsables de la coloración y olor característico (Sylvia, 2005); se seleccionaron los microorganismos que tomaron una coloración negra (Ver ilustración 5). Al seleccionar el actinomiceto con el que se quería trabajar, se tomó con un asa la muestra y se cultivó en medio PDA con el fin de tenerlo puro (ver ilustración 5).



Ilustración 5. Actinomiceto aislado y seleccionado para la producción del biopolímero.

Como parte de su caracterización microscópica, la cepa escogida se sometió a tinción de Gram, donde se esperaba que fueran bacterias Gram-positivas, formadoras de racimos de filamentos, hifas en forma de espiral según (Franco & Gomez Mendez, 2009); en la ilustración 6, se observa dicho comportamiento.



Ilustración 6. Actinomiceto seleccionado visto microscópicamente a 40X.

7.3.2 Identificación Molecular PCR

Una vez caracterizados microscópicamente y morfológicamente de los actinomicetos donde se obtuvo resultados positivos, se llevó a cabo la caracterización molecular de colonias, se tomaron las células de un cultivo en crecimiento, en su fase exponencial media y se utilizó directamente en la reacción de PCR. Mediante la estandarización de la técnica molecular PCR directa se permitió amplificar el gen 16s rRNA con las siguientes parejas de primers (Lane, 1991):

- 27 F (5`- GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3`)
- 787 R (5`CTA CCA GGG TAT CTA AT- 3`)

El DNA obtenido directamente de las células fue empleado como plantilla para la amplificación del gen de la subunidad 16S de RNA ribosomal por PCR, los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con SYBR Safe DNA gel stain (invitrogen), al finalizar fueron visualizados en el fotodocumentador (BIO-RAD), los tamaños de los fragmentos fueron de 790 pares de bases. (Ver ilustración 7).

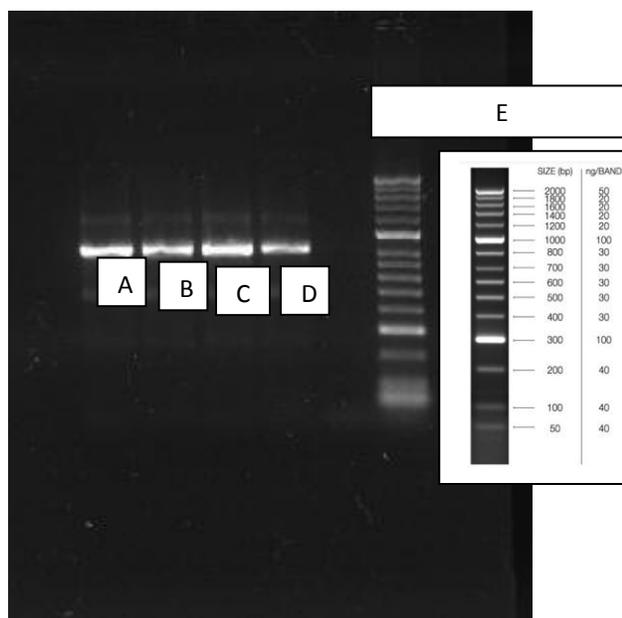


Ilustración 7. Fragmentos amplificados en gel agarosa al 1,5%. 790 pares de bases. Carriles; A,B,C,D: amplificados de cuatro colonias diferentes provenientes de cuatro cultivos independientes. E: Marcadores de Peso Molecular. HyperLadder II. Bioline

Cada mezcla de PCR (20 μ l) de reacción contiene cada primer a una concentración de 0.4 μ M, cada deoxinucleotido trifosfato a una concentración de 200 μ M, 2 μ l de 10x PCR buffer (invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 unidades de taq DNA polimerasa (invitrogen), y 1-2 μ l de células. La amplificación del DNA fue llevada a cabo en el termociclador iCycler (BIO-RAD). Y el programa que se utilizó fue: una denaturación inicial a 94° C por 2 min., 30 ciclos de 30s a 94° C, 30s a 58° C, 1 min a 72° C y una extensión final a 72° C por 2 min.

Los amplímeros fueron enviados a secuenciar a MacroGen. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando la herramienta bioinformática de identificación bacteriana (BIBI) con la secuencia de la base de datos Bacteria_SSU-rDNA-16S_stringent, alineando un número máximo de 120 secuencias (Devulder, 2003). Los datos fueron confirmados por comparación con las secuencias contenidas en las bases de datos no redundantes de GeneBank usando la herramienta BLASTN (Altschul, 1990) . Una similitud del 98.5% o mayor entre secuencias fue utilizada para asignar como perteneciente a la misma especie (Clarridge, 2004).

La secuencia compartida (Anexo 3) del aislamiento estudiado mostró una similitud del 99% con la cepa de referencia de *Streptomyces sp* contenida en la base de datos GENBANK y en la base de datos de Le BIBI y por lo tanto se asignó a este mismo género.

7.4 Conservación de las cepas de actinomicetos

Para la conservación de los microorganismos de referencia, el método debía garantizar que la cepa preservada mantuviera sus características fenotípicas, rasgos morfológicos, genotípicas, características bioquímicas relacionadas con la identidad de la cepa (Pacheco, 2013); para ello, se preservó a -70°C . Este método, se conoce como conservación por congelación; por este método se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados (Pacheco, 2013). Es conservado a -70°C con el fin de garantizar que durante el desarrollo del estudio se trabaje utilizando cultivos genéticamente homogéneos y con la misma concentración celular (Becerra, 2013).

Para su activación se colocó en medio Agar Dextrosa Papa (PDA) y cuando se encontraba en etapa exponencial (3 días) se tomaba para ser usado para la producción del biopolímero.

7.5 Fermentación en medio líquido

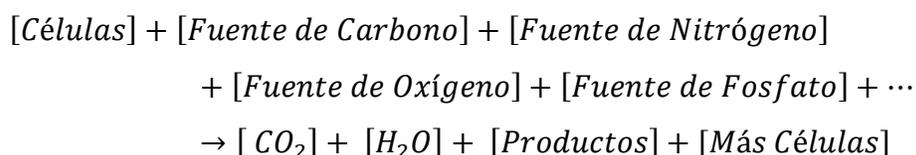
Para el diseño del experimento se estudió el efecto de dos variables que afectan el proceso de producción de P3HB:

- a. Crecimiento de los microorganismos como se observa más adelante *Streptomyces sp.* (Aislados del suelo de Boyacá – Microorganismos usados como control, procedentes del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca)
- b. Concentración de Glucosa - Pectina (Medio Sabouraud- Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa)

7.5.1 Obtención de rendimientos teóricos

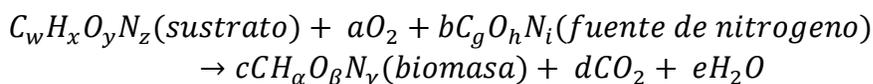
Las células, también conocidas como biomasa consumen diferentes nutrientes para crecer, así como para producir más células y productos importantes, en este caso, la producción de un biopolímero referido al P3HB.

El crecimiento de un organismo aerobio sigue la siguiente ecuación:

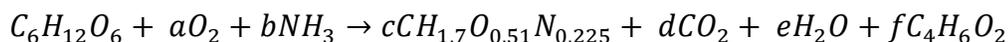
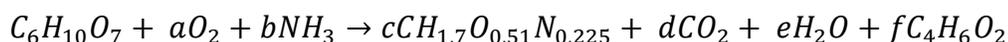


**La flecha de la reacción mostrada indica condiciones del medio de cultivo como pH, Temperatura, etc. Tomado de (Fogler, 2008)

Sin embargo, para que un trabajo resulte más abreviado, la ecuación mencionada anteriormente, se emplea como sigue:



Teniendo en cuenta la composición específica de la biomasa de la célula estudiada *Streptomyces sp* la cual es $CH_{1.77}O_{0.51}N_{0.225}$ presentada por (Gomez, 2013), utilizando la fuente de nitrógeno del medio “Peptona”, en este caso el amoniaco, cuya fórmula molecular es NH_3 . El Sustrato el cual es el variante en estas reacciones Mucilago de Café (Pectina) y Sabouraud (Glucosa). Finalmente se obtuvo la fórmula química del monómero hidroxibutirato para su polimerización y así obtener P3HB. Entonces la estequiometría de la reacción biológica queda así:



Los balances elementales de C, H, O, N y P dan como resultado las siguientes ecuaciones para cada uno de los dos sustratos:

Compuesto	Balance – Mucilago de Café
C	$6 = c + d + 4f$
H	$10 + 3b = 1,77c + 2e + 6f$
O	$7 + 2a = 0,51c + 2d + e + 2f$
N	$b = 0,225c$

Tabla 11. Balance por componentes de la reacción usando como sustrato Mucilago de Café

Compuesto	Balance – Sabouraud
C	$6 = c + d + 4f$
H	$12 + 3b = 1,77c + 2e + 6f$
O	$6 + 2a = 0,51c + 2d + e + 2f$
N	$b = 0,225c$

Tabla 12. Balance por componentes de la reacción usando como sustrato Sabouraud

Ecuaciones que constituyen un sistema de ecuaciones simultaneas, donde hay 6 variables a determinar que son a,b,c,d,e,f por lo cual se necesita de dos ecuaciones o variables adicionales con la cual se pueda resolver el sistema de ecuaciones simultaneas. El coeficiente de rendimiento Y_{xs} y Y_{ps}

obtenido en previos ensayos realizados por (Sanchez & Gomez, 2012), se utiliza para determinar los coeficientes estequiométricos de la reacción biológica.

$$\text{Rendimiento de la biomasa } Y_{xS} = 0,21 \pm 0.0301$$

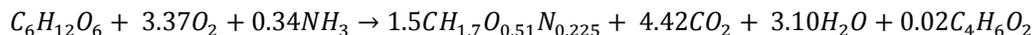
$$\text{Rendimiento de producto a partir de sustrato } Y_{xp} = 0,19 \pm 0.0034$$

Los coeficientes estequiométricos de la reacción biológica, en el medio químicamente definido “Mucilago de Café-Sabouraud”, dan como resultado los siguientes valores:

- Mucilago de Café



- Glucosa



Con las ecuaciones se pueden determinar teóricamente otros parámetros como son la cantidad de producto a partir de cada uno de los sustratos. En la tabla 13 se resume cada uno de los resultados.

MEDIO: MUCILAGO DE CAFÉ		
Concentración (g/L)	Ácido Galacturónico (g)	Producto P3HB (g)
5	3,25	0,04
10	6,5	0,08
20	13	0,15
40	26	0,31
MEDIO: SABOURAUD		
Concentración (g/L)	Glucosa (g)	Producto P3HB (g)
5	5	0,05
10	10	0,10
20	20	0,19
40	40	0,38

Tabla 13. Cantidad de producto de acuerdo a cada sustrato y la estequiometría de las reacciones

En la tabla 13, se observa la cantidad de producción de PHA teóricamente de acuerdo a cada una de las concentraciones manejadas, A mayor concentración se observa una mayor producción de PHA teóricamente, sin embargo, en la reacción no se tiene en cuenta las condiciones de estrés y por ende la variabilidad entre lo experimental y lo teórico.

A su vez, se observa una mayor producción cuando se utiliza glucosa como sustrato. Esto se debe a que la glucosa es un carbohidrato de cadena corta

lo cual permite que sea metabolizado de manera más eficiente por medio de la glucólisis. Mientras que el mucilago se compone en un 30% de pectina, que es una fibra natural que se compone en su mayoría (65%) del ácido galacturónico (Cordoba, 2012) que es la fuente principal de carbono, este carbohidrato es más complejo lo cual dificulta su metabolización; de esta manera el rendimiento de la producción del PH3B está directamente relacionada con la manera en que se metabolice el sustrato (Kraght, 2011).

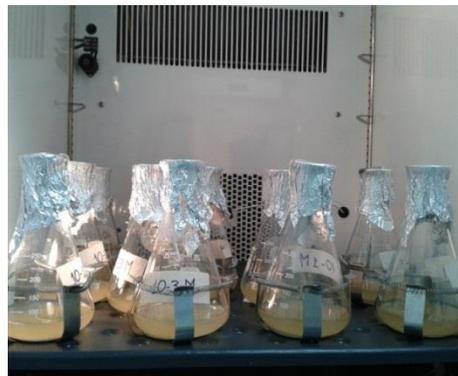
7.5.2 Crecimiento de Actinomiceto en medio Sabouraud y Mucilago de Café.

Se colocaron 48 ensayos (2 sustratos con 4 concentraciones diferentes por triplicado y 2 microorganismos) a 200rpm a 25°C durante 8 días, midiendo el crecimiento por densidad óptica a 460nm y azúcares reductores por DNS a 540nm. El ensayo montado se observa en la ilustración 8. El proceso de fermentación se detenía, en el segundo dato registrado donde entraba a la fase de muerte de microorganismos (ver ilustración 9, 10, 11 y 12).

Glucosa (12 ensayos): 4 concentraciones por triplicado.

Mucilago (12 ensayos): 4 concentraciones por triplicado.

Streptomyces sp aislados del suelo de Boyacá.



Streptomyces sp brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca

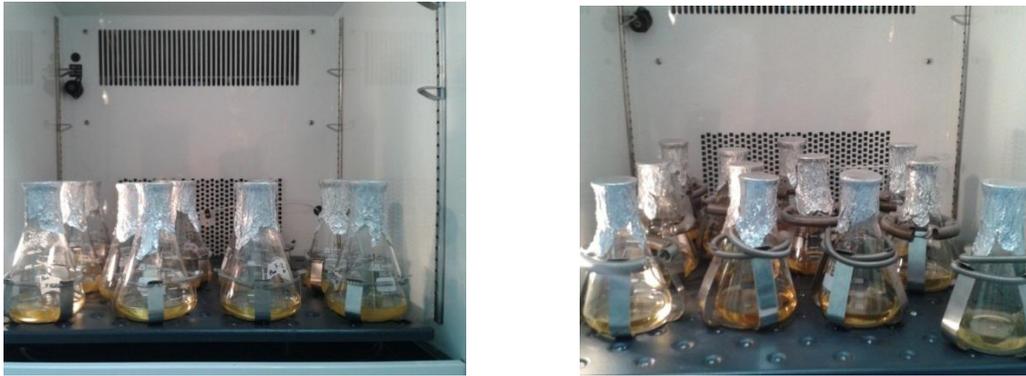


Ilustración 8. Ensayo realizado para la producción de PHA, mediante Mucilago de café y Glucosa en diferentes concentraciones como sustrato y *Streptomyces sp*. Aislados del suelo de Boyacá y brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca.

En la ilustración 9, 10, 11 y 12 se observa el crecimiento de los 4 ensayos montados.

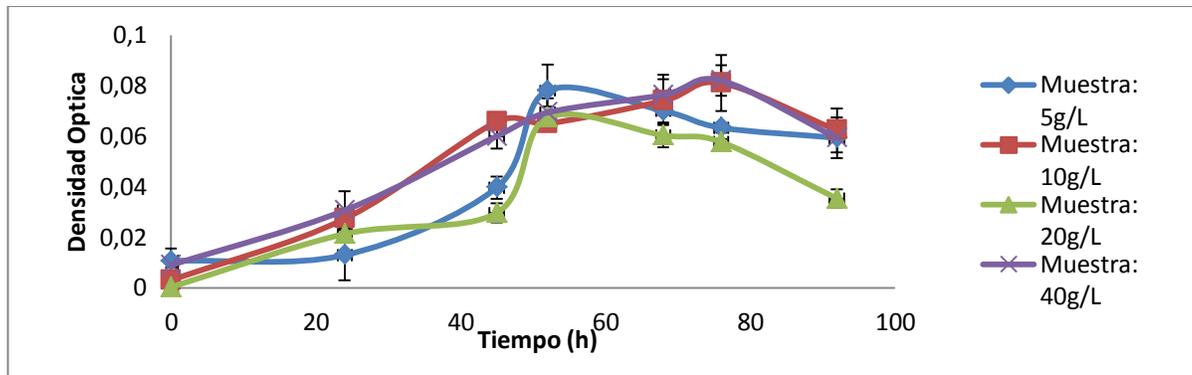


Ilustración 9. Curvas de crecimiento de *Streptomyces sp* aislados del suelo de Boyacá como sustrato medio Sabouraud a respectivas concentraciones de glucosa a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

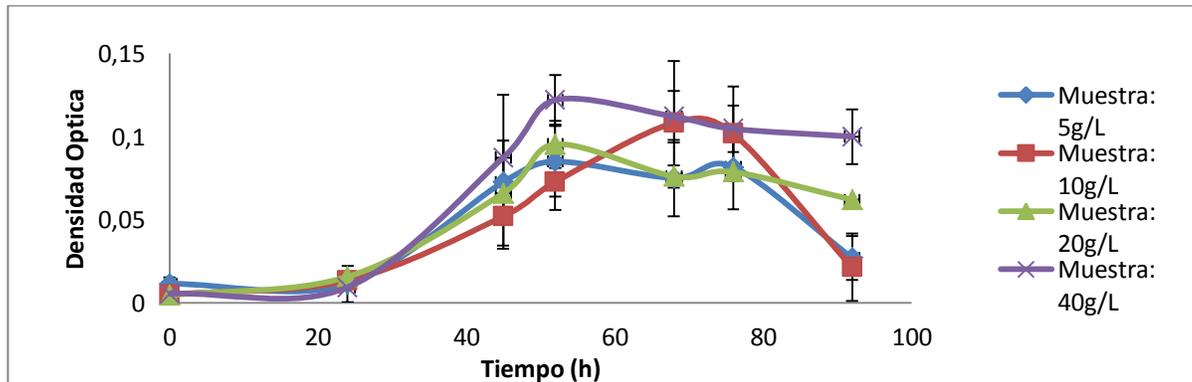


Ilustración 9. Curvas de crecimiento de *Streptomyces sp* aislados del suelo de Boyacá como sustrato Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa en las diferentes concentraciones a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

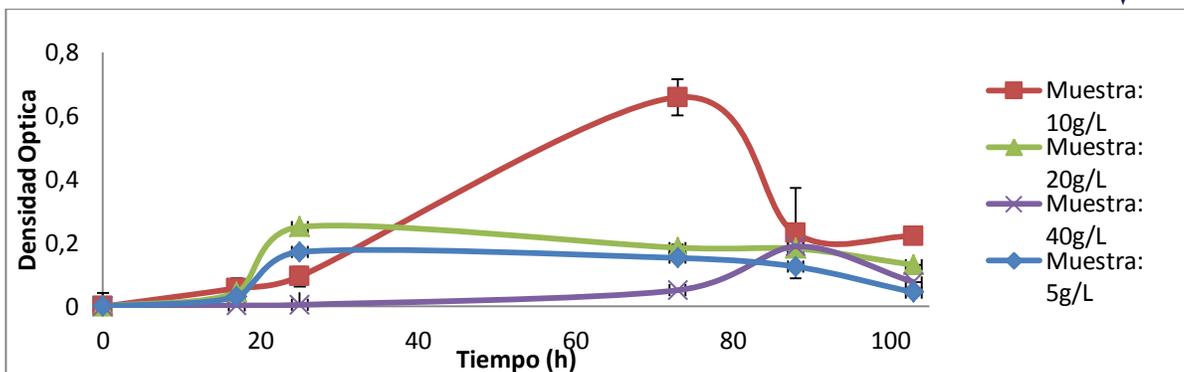


Ilustración 10. Curvas de crecimiento de *Streptomyces sp* brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato Sabouraud en las diferentes concentraciones a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

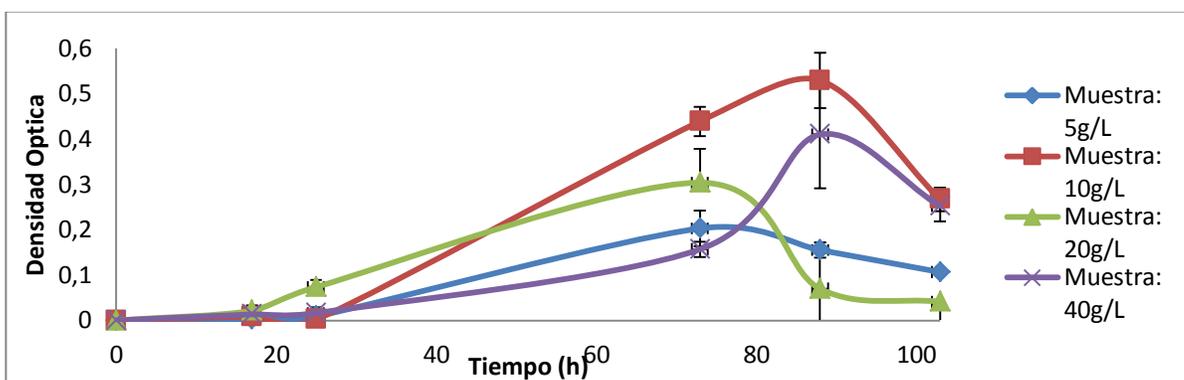


Ilustración 11. Curvas de crecimiento de *Streptomyces sp* brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa en las diferentes concentraciones a 460nm con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

En primera medida los microorganismos que se encontraban en concentraciones de 10 g/L de glucosa (medio Saboraud) poseen un menor crecimiento del 70% que los de Mucilago de Café de 10 g/L, esto se debe a las exigencias nutricionales de las cepas al crecer en condiciones de diferentes nutrientes.

Las muestras donde se usó el inóculo del microorganismo aislado del suelo de Boyacá tiene un menor crecimiento del 64% en comparación con los del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca, pues los microorganismos brindados por el cepario se encontraban inicialmente en un mejores condiciones previamente al ensayo. Estas cepas solo se les había hecho un repique y estaban en estado de dormancia a bajas temperaturas, una vez sembrado se inoculaban a cada una de las fermentaciones; mientras que los aislados fueron manipulados diferentes veces haciéndolo que perdiera la calidad de la cepa, las manipulaciones deben cumplir con las condiciones adecuadas. El cultivo periódico es un



método tradicional en el que se repica periódicamente el microorganismo a un medio de cultivo fresco (Sánchez-Leal, 2005) Consiste en proporcionar las condiciones adecuadas en cuanto al medio de cultivo, temperatura de incubación y almacenamiento para el óptimo desarrollo del microorganismo. El proceso se repite en intervalos que garanticen la obtención de un cultivo fresco antes de la pérdida del cultivo predecesor. Un complemento para este método es atenuar el metabolismo de los microorganismos adicionando aceite mineral para disminuir la velocidad de transferencia de oxígeno, adicionalmente, el almacenamiento a 4 °C favorece la estabilidad y minimiza la frecuencia de resiembra (Panizo, 2005). En su totalidad las condiciones no fueron cumplidas, lo que dificultó la eficiencia del cultivo repicado.

El crecimiento de las muestras aisladas del suelo de Boyacá no presenta gran variación según la desviación estándar entre las diferentes concentraciones, pues a 5g/L y 20g/L se presentan valores de crecimiento similares con una diferencia aproximadamente del 10% y en las concentraciones de 10g/L y 40g/L se presenta de forma equivalente 15%. Mientras que en las del cepario Universidad Mayor de Cundinamarca, existe la similitud entre concentraciones de 10g/L y 40g/L de un 25% y en las concentraciones de 5g/L y 20g/L de un 35%.

Un aspecto a considerar es la composición de los medios en cuanto a glucosa y pectina, en donde estas diferencias pueden estimular o no la acumulación de PHA ya que según la necesidad del microorganismo o acumula polímero como reserva energética o lo utiliza como fuente orgánica para su crecimiento (Franco & Gomez Mendez, 2009). Con base a esto, se observa un mayor crecimiento en condiciones de 10g/L; pues no se encontraban totalmente restringidos, mientras que en las mayores concentraciones se observa un menor crecimiento lo cual se pudo deber a que existía un exceso en el carbohidrato principal que inhibe el crecimiento, lo cual se conoce como Inhibición por saturación, debido a que los receptores se saturan pues no se alcanzan las condiciones medioambientales adecuadas de crecimiento o no alcanza a la síntesis del sustrato (Madigan & Martinko, 2004).

Las condiciones favorables para el crecimiento de *Streptomyces sp* y la acumulación de PHB se vieron afectadas por el medio utilizado. El mejor medio para la producción de PHB fue el medio de Sabouraud pues es donde se presenta una mayor producción de polímero la cual es discutida más adelante, sin embargo, el medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa también presentó producción en menor proporción.

Se encontró que el crecimiento máximo se da a las 45h en los microorganismos aislados y a 65h en los microorganismos que fueron brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca. Previos ensayos

demonstraron que en *Streptomyces sp* el máximo crecimiento se daba a las 70h (Colon, 2000).

7.5.3 Medición de Azúcares Reductores (DNS)

En la siguiente etapa de dicha investigación se midió los azúcares reductores totales mediante el método de Somogy-Nelson (Garcia & Gil, 2003). Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática. Por lo tanto, se aplicará esta técnica para la construcción de una curva patrón de glucosa (Ver ilustración 13) y medir los azúcares producidos durante cada una de las fermentaciones.

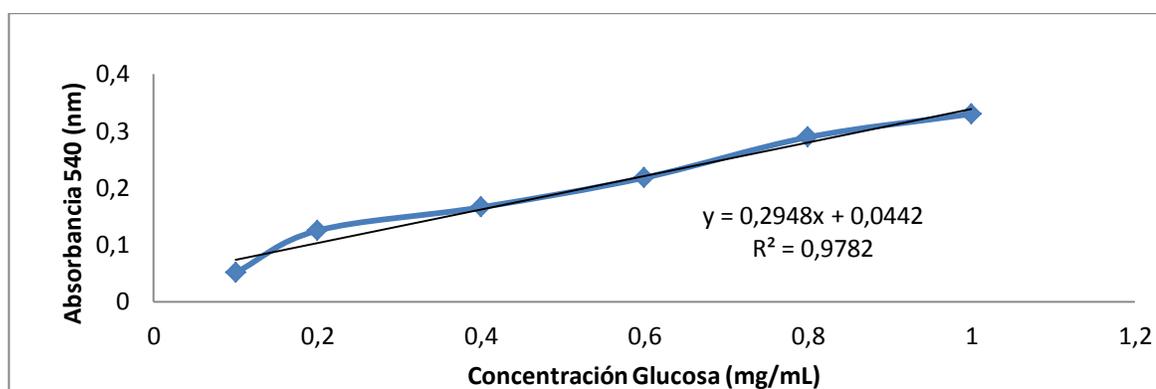


Ilustración 12. Curva de Calibración Estándar de Azúcares reductores.

En las ilustraciones 14, 15, 16 y 17 se observa la medición de azúcares reductores con los 2 microorganismos estudiados y los dos medios, como se muestran

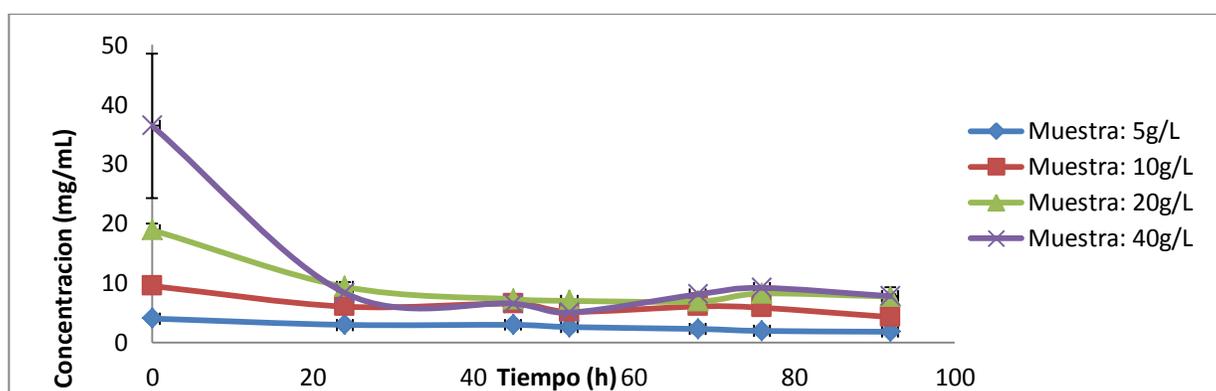


Ilustración 13. Curva de Azúcar reductor *Streptomyces sp* aislados del suelo de Boyacá como sustrato medio Sabouraud con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

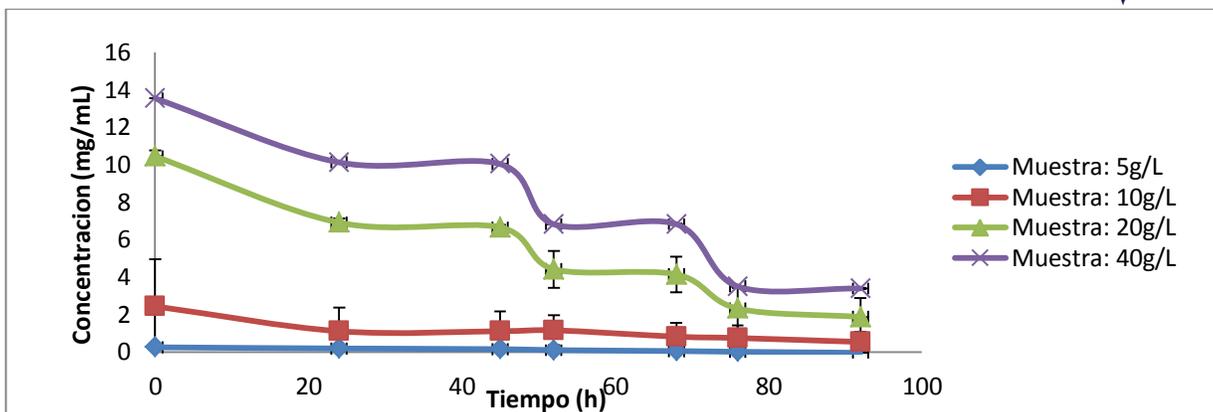


Ilustración 14. Curva de Azúcar reductor *Streptomyces sp* aislados del suelo de Boyacá como sustrato el medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

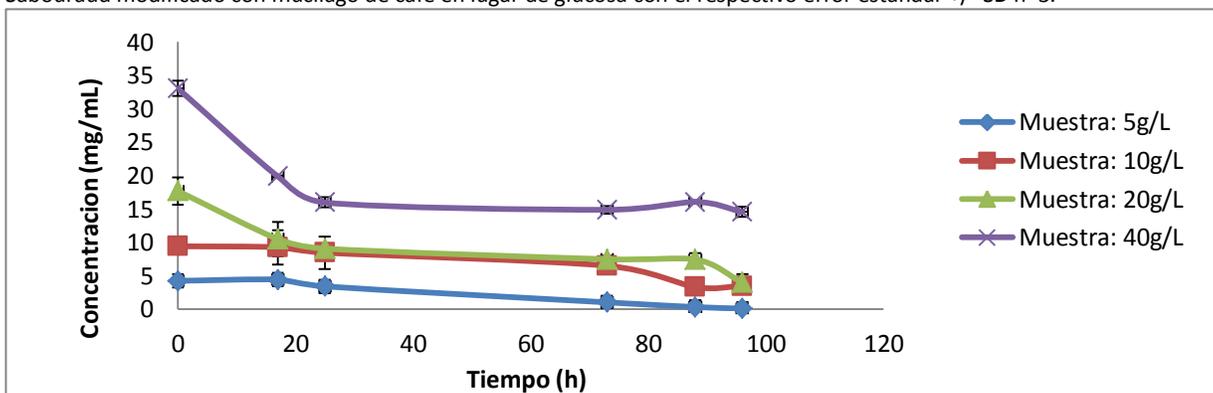


Ilustración 15. Curva de Azúcar reductor *Streptomyces sp* brindados de la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato medio Sabouraud con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

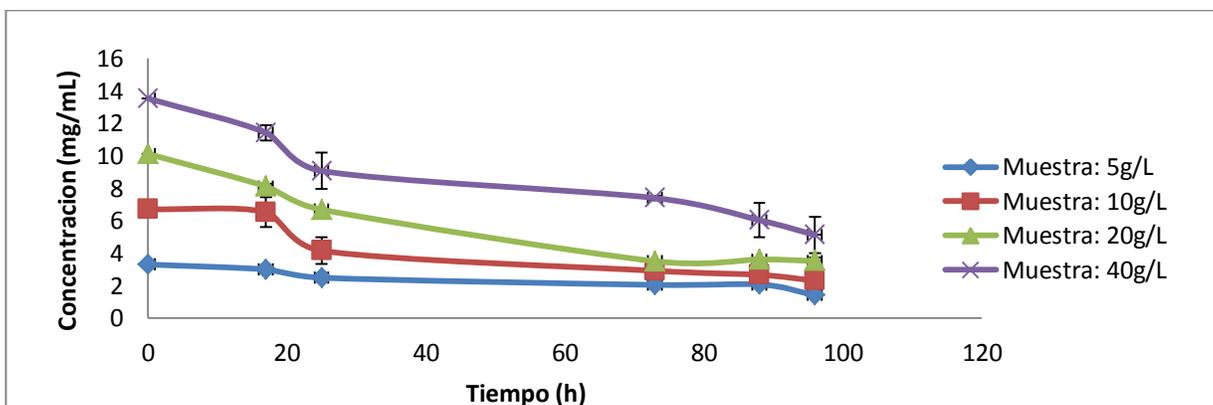


Ilustración 16. Curva de Azúcar reductor *Streptomyces sp* brindados de la Universidad Mayor de Cundinamarca como sustrato el medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con el respectivo error estándar +/- SD n=3.

Se observa que los medios Sabouraud la concentración glucosa en el tiempo cero empieza desde la concentración planteada difiriendo aproximadamente

en un 5% se registran datos de 5g/L, 10g/L, 16g/L y 35g/L; mientras que las muestras en el medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa en el momento cero, empiezan aproximadamente en la mitad de la concentración planteada equivalente a una diferencia del 53% de 3g/L, 7g/L, 10g/L y 14g/L; esto se debe a que las pectinas; el ácido galacturónico en dicho momento no se ha desdoblado en glucosa, y por ende el resultado obtenido. El ácido galacturónico es convertido a pentosa por descarboxilación y en la vía de la transcelotasa y transaldolasa produce fosfo-6-fructosa que puede ser convertida en glucosa o ser degradada en la vía de la glucólisis (Zavaleta, 2010). El mucilago de café contiene un 35.8% de pectina según (Betancourt Latorre & Moreno, 2009), lo cual se observa en la tabla 13.

El bajo crecimiento de los microorganismos en el medio sabouraud modificado con mucilago, cuya fuente principal de carbono proviene del ácido galacturónico, se debe a la adaptación de los microorganismos con respecto a su fuente de carbono. Según Kraght, 2011 el ácido galacturónico es un sustrato el cual necesita adaptación de parte de los microorganismos para poder llegar a utilizar el sustrato de manera eficiente, ya que este sustrato es muy complejo para desdoblarse por parte de los microorganismos por su tamaño. De esta manera las cepas que no tienen una previa adaptación a este sustrato no son eficientes para utilizarlo para su crecimiento ya que llegan a utilizar entre el 5% y 10 % en un tiempo de 5 horas, lo cual es muy bajo comparado con los microorganismos adaptados que a ese mismo tiempo llegan a utilizar entre el 60% y 70 % del sustrato (Kraght, 2011).

Por otro lado, se observa una disminución de azúcares reductores, el cual no presenta variación relevante según la desviación estándar. Al cabo de 100h se observa como el sustrato se agota en concentraciones de 5g/L, una vez se agota el sustrato, el microorganismo se alimenta del biopolímero como reserva de energía (Manna, 1999). En concentraciones a 10g/L el microorganismo está en condiciones de estrés de nutrientes, lo cual permite la generación del polímero, finalmente en las concentraciones de 20g/L y 40g/L el sustrato aún se encuentra disponible como lo afirma (Zhiyong Sun, 2008), ya que las concentraciones ideales para el crecimiento de PHA, es de 5g/L a 20g/L, ya que por encima hay exceso y por debajo hay escasez de sustrato.

A partir de este grupo de ensayos, se puede concluir que existe una inhibición del crecimiento al aumentar la concentración de glucosa inicial, debido a que la fuente de carbono está en exceso. Los ensayos con concentraciones superiores a 10 g/L, el crecimiento obtenido podría estar limitado por algún otro nutriente que no se encuentra en la cantidad suficiente en el medio definido. Hay que considerar que el medio formulado es un medio mínimo, por lo que para lograr mayores rendimientos al

obtenido, sería necesario complementarlo, por ejemplo con medios complejos (Banacore, 2000).

7.6 Extracción del Polímero

Primero se realizó una centrifugación para separar la biomasa del medio de cultivo a 6000rpm por 30min, y se desechó el sobrenadante. A continuación se tomó la biomasa y se congeló en eppendorf a -70°C por un periodo de 24hrs y se liofilizó a -50°C durante 24 horas.

Consecutivamente a todos los ensayos se le realizó una propanolisis con el fin de separar la biomasa y cuantificar la muestras (Franco & Gomez Mendez, 2009). Para ello se pesó cada muestra y por 3,0 g de biomasa seca se colocó en 600 ml de cloroformo con agitación constante durante 24 h a 30°C . (Zakariaa & Hidayah Ariffina, 2010). Al transcurrir las 24 horas, las muestras se dejaron a temperatura ambiente en una cabina de extracción como se observa en la ilustración 18, con el fin que el cloroformo se evaporara; en dicho proceso se recomienda que cuando se trabajen con volúmenes mayor a 40ml se rotaevapore.



Ilustración 17. Muestras obtenidas de la célula seca en cloroformo. Parte superior biomasa parte inferior cloroformo con el PHA disuelto.

Al finalizar la evaporación del Cloroformo se obtuvo un material que presentaba una coloración blanca u amarilla. El cambio de coloración existente se debió que a las muestras amarillas no se les retiró en su totalidad la biomasa, pues se observaban residuos mientras que las blancas no presentaban residuos de biomasa.

En algunas muestras, el material no logró ser cuantificable; quizás, por el volumen del inóculo inicial que fue muy bajo y a la calidad de la cepa, pues las condiciones de fermentación no resultaron ser las mejores en concentraciones superiores a 10g/L. En el Anexo 5, se observa el peso de las muestras que lograron ser cuantificadas de PHA, así como la cantidad

usada de cloroformo y la cantidad obtenida de biomasa antes y después de liofilizada.

En las ilustraciones 19,20 y 21 se observa las muestras donde se obtuvo polímero las características de medios y microorganismos usados en cada una de ellas.

Polímero Producido por :
Medio Sabouraud con *Streptomyces sp.*
Aislados del suelo de Boyacá.



Ilustración 18. Producción del polímero por medio de Medio Sabouraud con *Streptomyces sp.* Aislados del suelo de Boyacá. Cantidad Producida 0,029g. Concentración 20g/L..

Polímero Producido por :
Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con *Streptomyces sp.* Del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca.



Ilustración 19. Producción del polímero por Sabouraud con *Streptomyces sp.* Brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca. Cantidad Producida: 0,013g. Concentración 10g/L.

Polímero Producido por :
Medio Sabouraud con *Streptomyces sp.*
Del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca.



Ilustración 20. Producción del polímero por Medio Sabouraud con *Streptomyces sp.* Brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca. Cantidad Producida: 0,039g. Concentración: 10g/L.

La capacidad de *Streptomyces sp.* de acumular PHA durante el proceso de cultivo se estudió como ya se mencionó con dos tipos de fuentes de carbono



los cuales fueron utilizados para observar el crecimiento de las células, capacidad de azúcares reductores y la acumulación de PHA .

Según la estequiometría de la reacción, la producción teórica con Sabouraud a una concentración 20g/L es de 0.19g de PHA, sin embargo, se obtuvo 0.029g de PHA con la cepa aislada del suelo de Boyacá con un rendimiento de 15.3%. Para una concentración de 10g/L en medio Sabouraud con la cepa brindada por la Universidad Mayor de Cundinamarca se obtuvo 0.039g de PHA donde se identifica un rendimiento de 20,5%. A manejar diferencias entre las condiciones de estrés (relación carbono:nitrógeno) se observa que a mayor estrés mayor será la producción.

La producción teórica con Mucilago de Café a una concentración 10g/L es de 0.08g de PHA, experimentalmente se obtuvo 0.013g de PHA donde se identifica un rendimiento de 16,25%. En base a Franco & Gomez Mendez donde se usó *Streptomyces subrutilus* se determinó un rendimiento del 27.48% es así como, el mucilago de café se convierte en un buen candidato para para la producción del biopolímero al ser un residuo agroindustrial.

Se encontró que los *Streptomyces sp.* brindados del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca colocados en medio Sabouraud (10g/L) presentaron una mayor producción de PHA 0,039g, sin embargo, los *Streptomyces sp* aislados del suelo de Boyacá en medio Sabouraud (20g/L), presentaron menor producción de PHA 0,029g.

Como se observa en el Anexo 4 la producción de PHA fue mayor en las fermentaciones con *Streptomyces sp.* del cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca y con glucosa como fuente de carbono, esto debido a que la molécula de glucosa resultaba más metabolizarla, lo cual se corrobora en la medición de azúcares reductores; además de ello, anteriormente al ensayo se encontraba sembrada en un medio selectivo para actinomicetos Ashby (Cardona, Venegas, & Ruiz, 2009).

Para los estudios con fermentaciones como fuente de carbono ácido galacturónico (mucilago de café) no se observó una acumulación significativa (ilustración 20) como si se vio con glucosa (ilustración 19 y 21); sin embargo, resulta viable la producción de polímero usando mucilago de café como sustrato confiriéndole un valor agregado a este desecho que hoy en día resulta ser un residuo agroindustrial.

La mayor cantidad de acumulación de PHA se determinó en 10 g/L de glucosa, las relaciones de glucosa mayores y menores a esta producen una menor acumulación de PHA (Ver anexo 4).

Por todo lo anterior, la concentración de PHA producida por esta bacteria, bajo las condiciones estudiadas son óptimas, sin embargo presentan

oportunidades de mejora por lo que se debe seguir estudiando otras condiciones que afectan el crecimiento y acumulación de PHA o por el contrario, diseñar un biorreactor con un mayor volumen de trabajo, con un mayor inoculo inicial y de esta manera obtener una mayor cantidad de PHA.

7.7 Caracterización del Polímero

La confirmación de la estructura molecular del PHA almacenado por este microorganismo resulta de gran importancia, para evaluar la posibilidad de usar dicho sustrato para la producción del biopolímero. Las propiedades del polímero se determinaron por termogravimetría y por Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Para el análisis de TGA, se colocó 0,3230mg en TGA/DSC 1- Mettler Toledo y para la segunda exploración de la muestra por FTIR se colocó aproximadamente 1mg de muestra con un 90% de KBr en un Nicolet™ iS™ 10 FT-IR Thermo Scientific. Los espectros arrojados se analizaron individualmente corroborando que era P3HB, la cadena más corta de los PHAs.

7.7.1 Infrarrojo con transformada de Fourier

Este estudio se realizó con el fin para demostrar por el espectro cual era el tipo de biopolímero producido. El espectro obtenido se muestra en la ilustración 22.

Este debía ser comparado para corroborar o especificar qué tipo de polímero se había generado por ende se logra observar la ilustración 22, el cual genera un P3HB producido por *B.licheniformis*; dicha confrontación se observa por medio de los picos más significativos: 1).3435 , 2).2974, 3). 2931, 4). 1939, 5). 1651, 6).1556, 7).1454, 8).1379, 9)1280, 10).1185, 11). 1101, 12).1058, 13).624 cm^{-1} .

El P3HB, se caracteriza por su radical metilo (CH_3), el cual puede mostrar estiramientos del enlace en C-H entre los 2972 cm^{-1} y los 2872 cm^{-1} . Por otro lado, se observa el grupo cetona ($\text{C}=\text{O}$) en donde la vibración de estiramiento del grupo carbonilo aparece entre 1725 y 1705 cm^{-1} , para las cetonas saturadas. Cada uno de estas moléculas se observan en la ilustración 21, corroborando de esta manera que se produjo P3HB. En la ilustración 22, revalida la información dada anteriormente, pues presenta el mismo comportamiento distintivo cuando es expuesto a la radiación infrarroja.

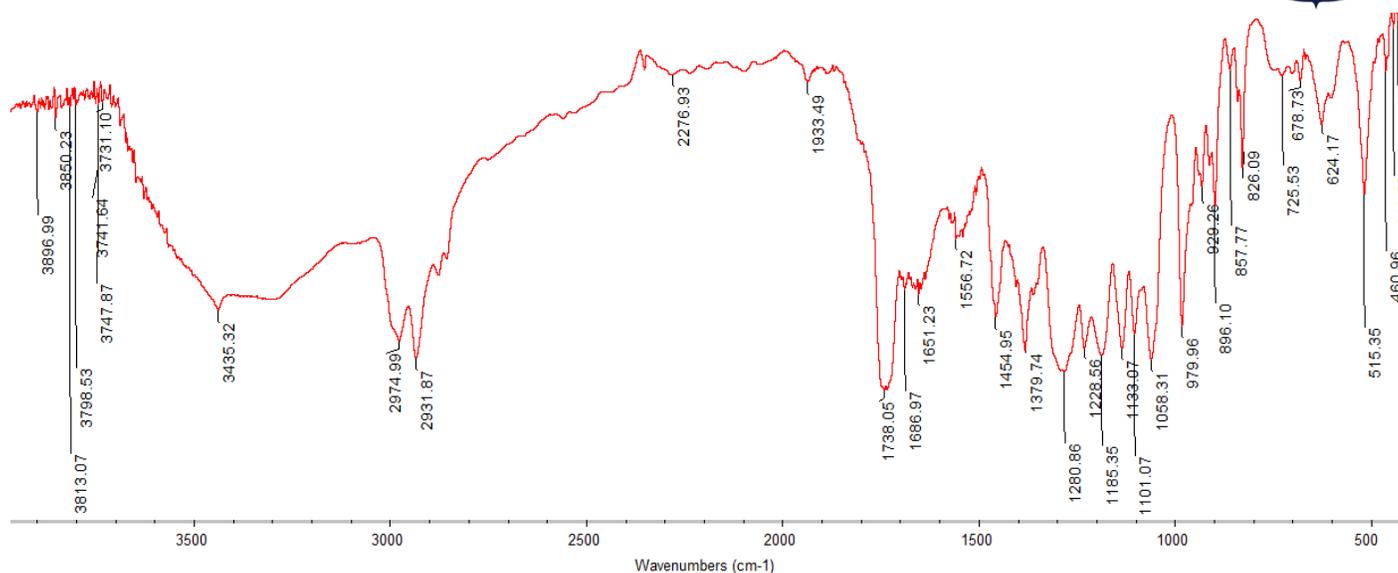


Ilustración 21. Espectro obtenido por medio FTIR del polímero producido

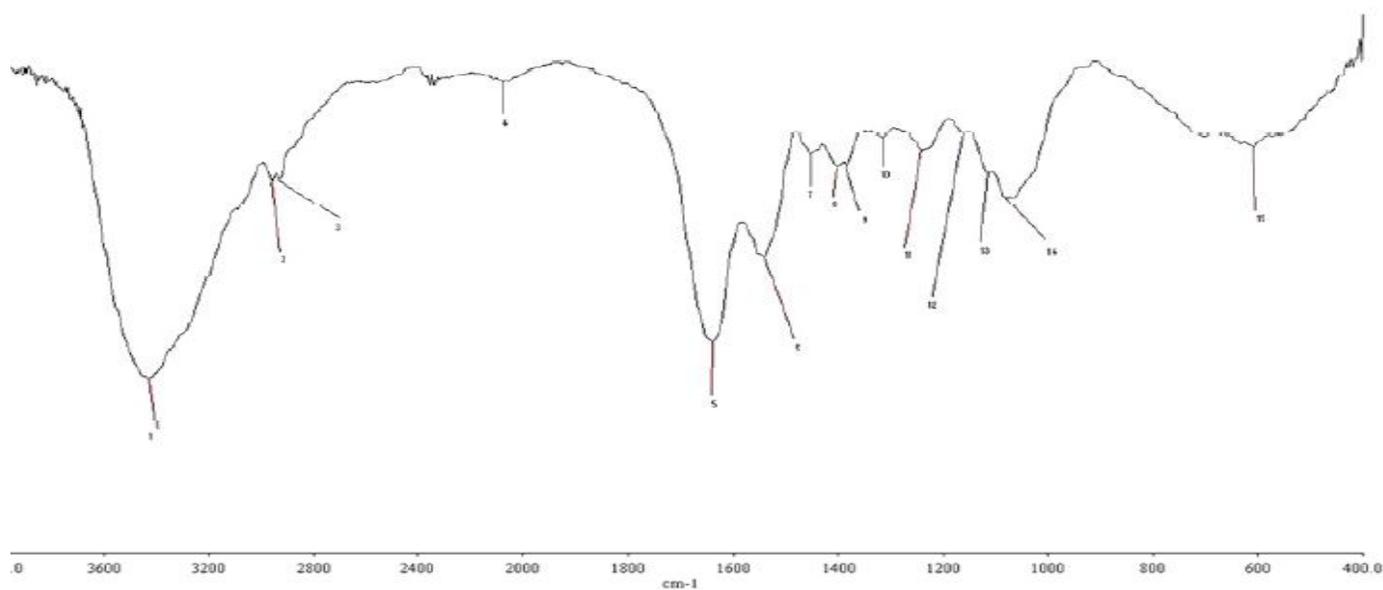


Ilustración 22. Espectro obtenido por FTIR producido por *B.licheniformis* AS3-2. 1). 3425.89 , 2). 2977.4, 3). 2934.42,4). 2073.77, 5). 1639.94, 6). 1541.44, 7). 1452, 65, 8). 1402.04. 9) 1384 10). 1315 11). 1240 12). 1162 13). 1113 14). 1082 15). 611. Tomado de (Shah, 2012)

7.7.2 Termogravimetría

El TGA es una técnica que se basa en la determinación de la pérdida de masa que experimenta una muestra al ser sometida a un programa térmico,

la medición se lleva a cabo en atmosferas perfectamente controladas, habitualmente nitrógeno (condiciones inertes) o bien aire u oxígeno (condiciones oxidativas) (Hernandez, 2006)

Se realizó un análisis termogravimétrico para observar y obtener un registro de la masa del polímero (en una atmosfera controlada) en función del tiempo con una temperatura constante. Observando la ilustración 24 en donde la cantidad de muestra introducida fue de 0,3230 mg se logra determinar que la degradación de la cadena polimérica, se da alrededor de los 21 minutos después de iniciado el proceso y termina 3 minutos después; aproximadamente luego de esta degradación se estabiliza la muestra, ya que no se puede degradar más, se sabe esto ya que el tiempo que tomo en degradarse la primera parte fue de solo 20 minutos y se mantuvo la temperatura 20 minutos más en donde se estabilizo.

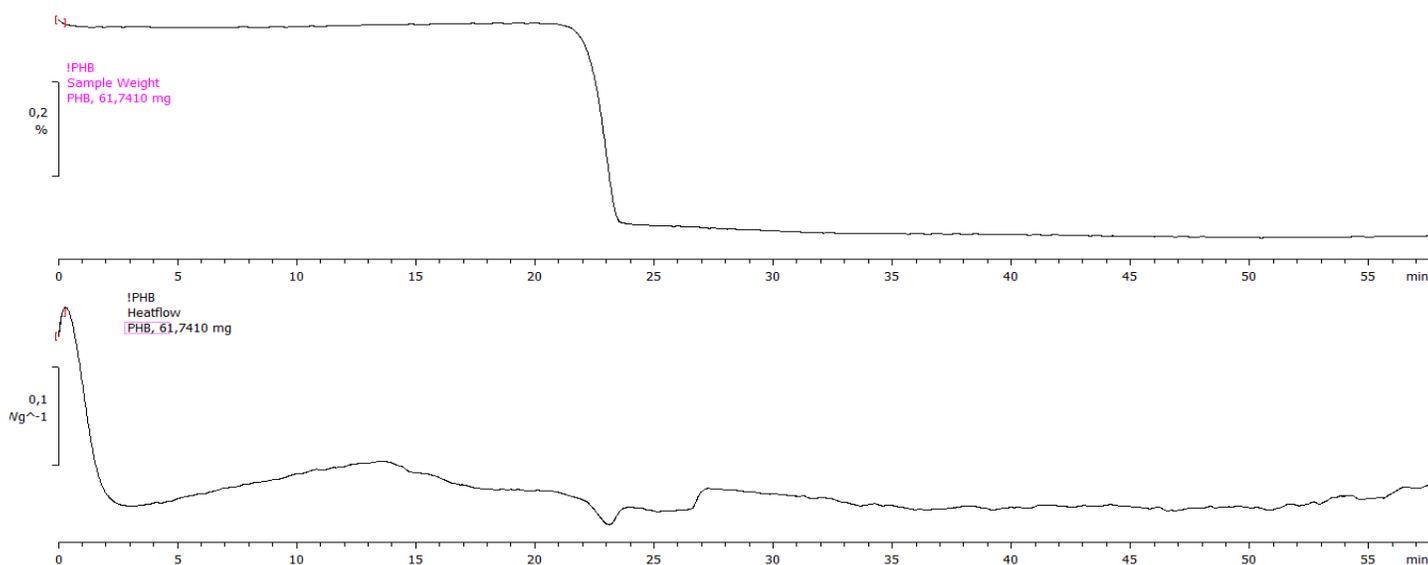


Ilustración 23. Termogramas obtenidos del polímero producido mediante *Streptomyces sp* y Medio Sabouraud.

7.8 Análisis Económico

Se puede corroborar que la utilización de mucilago como fuente principal de carbono para los *Streptomyces sp* en la producción de PHA es viable, además este sustrato es económicamente asequible, ya que es un residuo agroindustrial que no posee uso agrícola ni industrial. A diferencia de la glucosa que si tiene un costo (\$43.334 por 100g), el mucilago es una materia prima sin costo alguno, la cual se obtiene en volúmenes altos dependiendo de la producción del café. La fuente carbono fue la variante durante el proceso de producción, por lo que en términos de costos, la glucosa y el mucilago son los únicos elementos que varían en este proceso, así que el factor a tener en cuenta seria el mucilago cuyo costo es nulo.



CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que a partir de *Streptomyces sp* aislados del suelo de Boyacá la producción de Polihidroxialcanoatos resultó ser exitosa usando como sustrato mucilago de café, el cual es un residuo agroindustrial. La concentración en la cual se obtuvo una mayor producción fue a 10g/L, en el medio Sabouraud con microorganismos brindados por el cepario de la Universidad Mayor de Cundinamarca. La producción con el medio Sabouraud modificado con mucilago tuvo menores rendimientos ya que, el microorganismo necesitaba un periodo de adaptación a este medio, asimismo la metabolización del ácido galacturónico es más compleja lo que retrasa el proceso de producción de PHA. Los espectros arrojados por medio de TGA y FTIR fueron analizados y se confirmó que el polímero extraído era P3HB, la cadena más corta de los PHA's.

RECOMENDACIONES

- Tener una lectura más óptima para evitar errores en el inoculo inicial pues se realizó por McFarland y este resulta ser un método que no discrimina a las bacterias vivas de las muertas en la solución, por lo que se puede sobreestimar la población de bacterias.
- El volumen del inoculo empleado debe ser mayor, para que haya una mayor generación de estrés de nutrientes en cada una de las fermentaciones y de esta manera; lograr caracterizarlo con otros mecanismos como resistencia a la ruptura que requiere de gran producción.
- Mediante tinciones con Sudan Negro, identificar los granulos hidrofobicos y observar la acumulación intracelular del polímero en el microorganismo, y evitar pérdidas del polímero antes de su muerte.
- Emplear un liofilizador por bandejas, o asegurarse que las muestras estén completamente tapadas para evitar escapes por vacío.
- Realizar la producción en un biorreactor, con el fin que se obtenga una mayor cantidad de producto que pueda ser usada industrialmente.
- No utilizar concentraciones tan bajas de mucilago pues presenta valores bajos de azucares reductores y por ende se deben emplear mayores cantidades de Mucilago de Café.

ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE MEDIOS

Medio de Cultivo	Composición	Cantidad (g/L)
Saboraud	Peptona de Carne	5
	Peptona de Caseína	5
	Glucosa	20

Tabla 14. Medio Sabouraud. Mezclar los componentes y disolver en 30g/L, ajustar el pH a $5,6 \pm 0,1$. Agitar y autoclavar (121°C). Servir asépticamente.

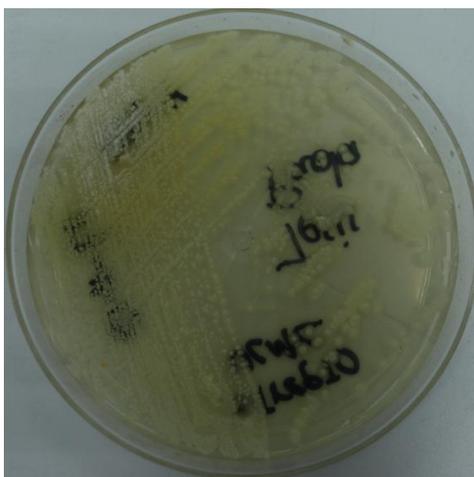
Medio de Cultivo	Composición	Cantidad (g/L)
Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa	Peptona de Carne	5
	Peptona de Caseína	5
	Mucilago de Café	20

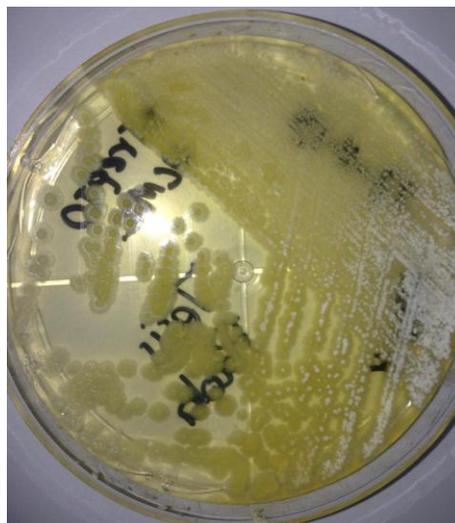
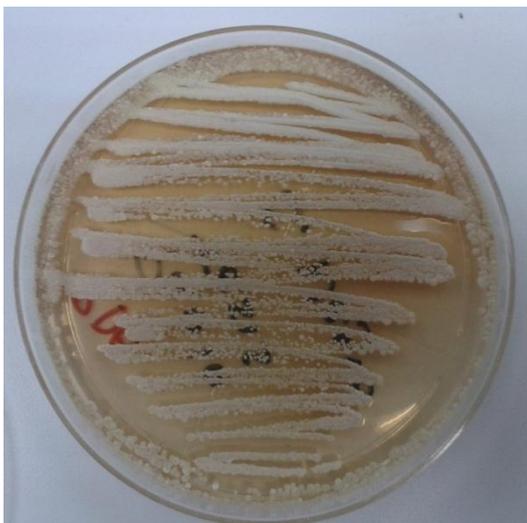
Tabla 15. Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa de Café. Mezclar los componentes y disolver en 30g/L, ajustar el pH a $5,6 \pm 0,1$. Agitar y autoclavar (121°C). Servir asépticamente.

ANEXO 2. MORFOLOGIA DE *Streptomyces* sp. AISLADOS Y BRINDADOS POR EL CEPARIO DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE CUNDINAMARCA.

Microorganismos Aislados. Actinomicetos

Microorganismos Control. *Streptomyces* sp.

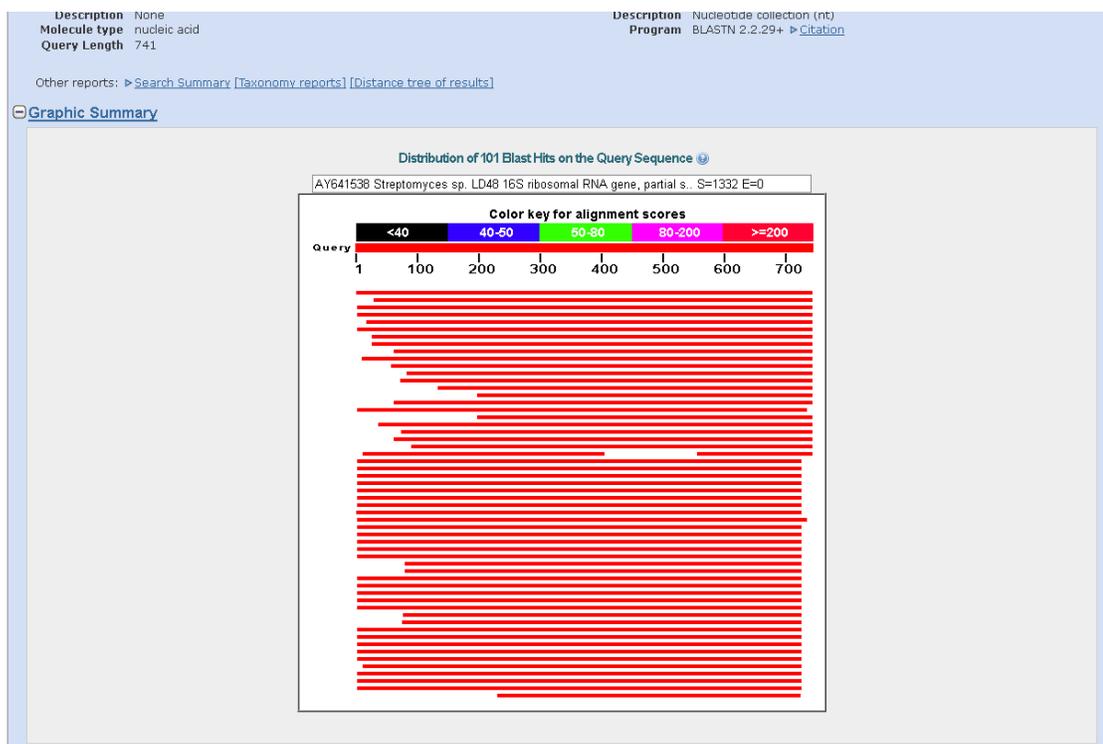




No se tiene registro, sin embargo, este tomo la misma coloración del otro estudiado. Blanco-Negro

ANEXO 3. ANÁLISIS DE SECUENCIA CEPA *Streptomyces* sp.

TCCGTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTG
 CTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAA
 CTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAAATTGAAAGGCGGC
 TTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
 CAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
 AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGC
 TGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT
 GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGA
 AAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
 ACTTTCTGGTCTGTAAC



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. LD48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1332	1332	99%	0.0	99%	AY641538.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. MAD01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1304	1304	95%	0.0	99%	GQ246755.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. TIR12 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1072	1072	99%	0.0	93%	AB899158.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. MAH25 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1072	1072	99%	0.0	93%	AB899157.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. VITTK08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1053	1053	97%	0.0	93%	GU358071.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces clavuligerus strain LCB69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1051	1051	99%	0.0	92%	FJ867927.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces indiaensis strain IF 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1038	1038	96%	0.0	93%	FJ951435.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. AS15 Ydr-FQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1026	1026	96%	0.0	93%	EU384279.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces brasiliensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain NBRC 12598	1002	1002	91%	0.0	93%	AB184106.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces clavuligerus strain MTCC 7037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1000	1000	98%	0.0	92%	EU146061.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. Hiornina101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	989	989	92%	0.0	93%	EU010382.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. KOD10 gene for 16S rRNA, partial sequence	985	985	88%	0.0	94%	AB818454.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces clavuligerus strain MML2001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	90%	0.0	93%	KF542656.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces brasiliensis strain MML2028 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	881	881	81%	0.0	93%	KF542679.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces indiaensis strain SRT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	854	854	73%	0.0	95%	JQ065726.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. CW17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	835	835	91%	0.0	89%	JX434845.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. CLS45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	830	830	98%	0.0	87%	FJ200287.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. TUT18 gene for 16S rRNA, partial sequence	808	808	73%	0.0	93%	AB818455.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured Streptomyces sp. clone Blue-GSA-KSA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	736	736	94%	0.0	86%	JQ962978.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. KP12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	734	734	89%	0.0	87%	JX434844.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. KP17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	678	678	91%	0.0	85%	JX434846.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. KP04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	643	643	87%	0.0	85%	JX434847.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces fulvoviolaceus strain 15 Ecy 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	512	512	52%	8e-144	91%	JQ962979.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. WZ1-7219 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	460	460	97%	3e-128	79%	HQ458135.1

Download ▾ GenBank Graphics ▼ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Streptomyces sp. LD48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [gb|AY641538.1](#) Length: 1574 Number of Matches: 1

Range 1: 23 to 761 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Related Information

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1332 bits(721)	0.0	733/739(99%)	1/739(0%)	Plus/Plus
Query 4	CTGAGGATGAACGCTGGCGGCTGCTAATACATGCAAGTCGACGGAATGGATTAAAGAC			63
Sbjct 23	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCTGCTAATACATGCAAGTCGACGGAATGGATTAAAGAC			82
Query 64	TTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGACGGGTGACTAACACGTGGTAACTGCCATAAGA			123
Sbjct 83	TTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGACGGGTGACTAACACGTGGTAACTGCCATAAGA			142
Query 124	CTGGGATAACTCCGGGAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCG			183
Sbjct 143	CTGGGATAACTCCGGGAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCG			202
Query 184	AAATTGAAAGGCGCTTCGGCTCTACTTATGGATGGACCGGCTGGCATTAGCTAGTTG			243
Sbjct 203	AAATTGAAAGGCGCTTCGGCTCTACTTATGGATGGACCGGCTGGCATTAGCTAGTTG			262
Query 244	GTGAGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATGCTAGCCGACTGAGAGGCTGATCGGCCAC			303
Sbjct 263	GTGAGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATGCTAGCCGACTGAGAGGCTGATCGGCCAC			322
Query 304	ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTCCGCAA			363
Sbjct 323	ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTCCGCAA			382
Query 364	TGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGGCGTGAAGTGTGAAAGCTTTCGGCTCTAAAAC			423
Sbjct 383	TGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGGCGTGAAGTGTGAAAGCTTTCGGCTCTAAAAC			442
Query 424	TCTTTGTTAGGGAAGAACAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACTAAC			483
Sbjct 443	TCTTTGTTAGGGAAGAACAGTCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACTAAC			502
Query 484	CAGAAAGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG-CGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTT			542
Sbjct 503	CAGAAAGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTT			562
Query 543	ATCCGGAAATATTGGGCTAAAGCGCGGCGAGTGTTCCTTAAGTCTGATGAAAGCC			602
Sbjct 563	ATCCGGAAATATTGGGCTAAAGCGCGGCGAGTGTTCCTTAAGTCTGATGAAAGCC			622
Query 603	CACGGCTAACCGTGGGGTCAATGGAACTGGGAGACTTGAATGACAGAGGAAAGT			662
Sbjct 623	CACGGCTAACCGTGGGGTCAATGGAACTGGGAGACTTGAATGACAGAGGAAAGT			682
Query 663	GGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCTAGAGATATGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGC			722
Sbjct 683	GGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCTAGAGATATGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGC			742
Query 723	GACTTTCTGGTCTGTAAC 741			
Sbjct 743	GACTTTCTGGTCTGTAAC 761			

ANEXO 4. PRODUCCIÓN DE PHA Y CANTIDADES NECESITADAS PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL POLÍMERO.

- Medio Sabouraud con *Streptomyces sp.* Brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca.

GLUCOSA	peso eppendorf solo(g)	peso vinipel + muestra	peso muestra liofilizada +vinipel + eppendorf	peso seco	cantidad de cloroformo	PHA
51	1,0862	1,8529	1,13	0,0438	8,76	No cuantificable
52	1,091	1,0642	1,11	0,019	3,8	0,0025
53	1,0901	3,3304	1,1	0,0099	1,98	No producción
101	1,0937	2,0312	1,15	0,0563	11,26	0,0031
102	1,0817	1,5068	1,08	0,0017	0,34	0,0012
103	1,0793	2,2015	1,2	0,1207	24,14	0,039
201	1,0821	1,6948	1,0821	0	0	No producción
202	1,0808	1,7194	1,08	-0,0008	-0,16	0,003
203	1,0839	1,551	1,11	0,0261	5,22	No producción
401	1,0896	1,8231	1,14	0,0504	10,08	0,004
402	1,0892	2,0318	1,15	0,0608	12,16	No cuantificable
403	1,0896	1,5213	1,11	0,0204	4,08	0,0002

- Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con *Streptomyces sp.* Brindados por la Universidad Mayor de Cundinamarca.

MUCILAGO	peso eppendorf solo	peso vinipel + muestra	peso muestra liofilizada +vinipel + eppendorf	peso seco	cantidad de cloroformo	PHA
51	1,0873	1,7995	1,14	0,0527	10,54	No cuantificable
52	1,0866	1,4761	1,0866	0	0	No Producción
53	1,0863	1,4627	1,09	0,0037	0,74	No Producción
101	1,0837	1,4393	1,1	0,0163	3,26	No producción
102	1,0882	2,1752	1,2	0,1118	22,36	0,013
103	1,07	1,5655	1,14	0,07	14	No cuantificable

201	1,0841	1,4687	1,0841	0	0	No Producción
202	1,0871	1,4611	1,08	0,0168	3,36	0,0187
203	1,0883	1,4658	1,15	0,0617	12,34	0,029
401	1,0908	1,4555	1,0908	0	0	No Producción
402	1,0872	1,4256	1,14	0,0528	10,56	No cuantificable
403	1,0874	1,8227	1,16	0,0726	14,52	No cuantificable

- Medio Sabouraud con *Streptomyces sp.* Aislados del suelo de Boyacá.

GLUCOSA	Eppendorf solo	ependor+muestra+vinipel	ependor+muestra seca	volumen cloroformo	PHA
51	1,09	1,51	1,11	4	0,0135
52	1,11	1,46	1,11	0	No Producción
53	1,1	1,4	1,1	0	No Producción
101	1,1	1,68	1,14	8	No cuantificable
102	1,12	1,61	1,13	2	No cuantificable
103	1,1	1,55	1,11	2	No cuantificable
201	1,1	1,56	1,11	2	0,029
202	1,11	1,6	1,11	0	No Producción
203	1,08	1,58	1,11	6	No Producción
401	1,11	1,51	1,12	2	No cuantificable
402	1,11	1,78	1,12	2	No cuantificable
403	1,08	1,5	1,1	4	No cuantificable

- Medio Sabouraud modificado con mucilago de café en lugar de glucosa con *Streptomyces sp.* Aislados del suelo de Boyacá, Colombia.

MUCILAGO	Eppendorf solo	ependor+muestra+vinipel	ependor+muestra seca	volumen cloroformo	PHA
51	1,1	1,45	1,1	0	No Producción
52	1,1	1,6	1,1	0	No Producción
53	1,09	1,5	1,09	0	No Producción
101	1,11	1,43	1,11	0	No Producción
102	PERDIDA DE MUESTRA (Error manual)				
103	1,09	1,4	1,1	2	No Producción
201	1,13	1,82	1,15	4	No cuantificable
202	1,11	1,4	1,12	2	No Producción
203	1,09	1,34	1,09	0	No Producción
401	1,15	1,53	1,16	2	No cuantificable



402	1,12	1,5	1,14	4	No Producción
403	1,12	1,49	1,13	2	No Producción



Bibliografía

- ACRR. (2004). Asociación de Ciudades y Regiones para el Reciclaje ACRR. Guía de Buenas Prácticas para el Reciclaje de los Residuos Plásticos. Una guía por y para las autoridades locales y regionales.
- Almeida, A., Ruiz, J., & Pettinari, J. (2004). Bioplásticos: Una alternativa ecológica.
- Altschul, G. W. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*
- Banacore, A. (2000). Producción de Polihidroxialcanoatos (PHA) POR *Bacillus* sp. Utilizando glicerol como fuente de carbono . Montevideo, Uruguay: Departamento de Bioingeniería – Instituto de Ingeniería Química-aiquruguay.
- Bautista, C., & Cruz, R. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar "Gran enano" y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia. Tropico Humedo.*
- Becerra, M. (2013). Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Benintende, S. (2010). Universidad Nacional de entre ríos - Facultad de Ciencias Agropecuarias. Recuperado el 23 de Mayo de 2012, de http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/parte_de_unidades_10_y_11_microorganismos_del_suelo.pdf
- Betancourt Latorre, L., & Moreno, J. (2009). EXTRACCIÓN DE PECTINAS A PARTIR DE LOS SUBPRODUCTOS DEL BENEFICIO DEL CACAO . Medellín , págs. Universidad EAFIT, Departamento Ingeniería de Procesos.
- Cardona, G., Venegas, C. P., & Ruiz, G. M. (2009). Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Revista de Biología Tropical, Rev. biol. trop vol.57 n.4 .*
- Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *En Clin Microbiol (págs. 17:840-62.).*
- Colon, I. C. (2000). Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. . *Environmental Health Perspectives.*



- Cordoba, U. N. (2012). Aditivos Alimentarios. En F. d. Quimicas. Buenos Aires, Argentina: http://www.fcq.unc.edu.ar/institucional/pdf/CAPITULO_XVIII_aditivos_alimentarios.pdf.
- Correa, M. F. (2008). Evaluacion de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de Micorrizas. (Universidad Javeriana) Recuperado el 13 de Abril de 2012, de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080072408.PDF>
- Devulder, P. G. (2003). BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. En J Clin Microbiol. (págs. 41:1785-7.).
- Fogler, H. S. (2008). Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas. (C. Edición., Ed.) México: Pearson. Prentice Hall. .
- Franco, M., & Gomez Mendez, D. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. Revista Peruana de Biología, 16(1).
- Garcia, C., & Gil, F. (2003). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Barcelona: Mundiempresa.
- Gerhart, B., Gilles, L., & Klaus, F. G. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. 65(2-3).
- Gomez, N. (2013). Estudio de la fermentacion de Streptomyces: Produccion en continuo de acido Clavulonico en un reactor agitado. Medellin. Colombia: Corporacion Academica y Ambiental. Universidad de Antioquia.
- Guidi, M. Z. (2010). Obtención de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. Bolivia.
- Hernandez, M. (2006). Sintesis y Caracterizacion de polímeros via radicales libres usando xantatos . Recuperado el 10 de Febrero de 2014, de Universidad Autonoma del estado de Hidalgo: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/289/1/Sintesis%20y%20caracterizacion%20de%20polimeros.pdf>
- Herryman, M., & Carracedo, G. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. XXXIX(1).
- Industriales, E. d. (2010). Recuperado el 6 de Mayo de 2012, de Producción de PHA en bacterias: <http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/virginia/bacterias.htm>



- Kraght, A. (2011). Fermentation of galacturonic acid and glucose by strain of *Erwinia carotovora*. NCBI. Journal of Bacteriology.
- Lamenco, M. B. (1970). Curso de microbiología de suelos. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA.
- Lane. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Obtenido de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1987160>
- Leda, C., & Freire, M. D. (5 de July de 2009). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid state-fermentation.
- Lee, S. (1996). Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends in Biotechnology. 11(11).
- Lucas, G., & Morales, J. A. (Diciembre de 2006). Producción de alcohol etílico de Mucílago de Café. Recuperado el 2012 de Mayo de 3, de <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/31-06.pdf>
- Madhavan, N. N. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. 101(22).
- Madigan, T. M., & Martinko, J. M. (2004). Biología de Los Microorganismos. España: Prentice Hall.
- Manna. (1999). Accumulation of poly(3 hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. Curr Microbiol.
- Orozco, B. A. (2003). Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química.
- Pacheco, J. M. (2013). Evaluación de dos métodos para la conservación de cepas bacterianas de trabajo utilizadas en un laboratorio de control microbiológico de medicamentos. Universidad de El Salvador.
- Palma, J. (Enero de 2009). Evaluación del rendimiento de la extracción de pectina en agua de mieles del beneficiado del café procedentes del desmucilgado mecánico. Recuperado el 6 de Febrero de 2014, de Universidad de El Salvador: Generalmente, las pectinas se extraen de residuos mediante un proceso fisicoquímico en múltiples etapas, caracterizado por una extracción con ácido y se recupera con una precipitación con alcohol. En un principio se
- Panizo, M. M. (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. En Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Volumen 25.



- Pedroza, A. M. (2006). Manual de laboratorio introduccion a la Biotecnologia. Bogota, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Restrepo, J. (2010). Caracterización física y química de los frutos del café. Recuperado el 17 de 04 de 2012, de <http://www.cedeco.or.cr/documentos/Caracterizacion%20del%20cafe.pdf>
- Rios, L., Betancur, L., & Ocampo, D. (Abril, 2008). Curso practico de quimica organica. Enfocado a biologia y alimentos. Universidad de caldas.
- Rodríguez, N. (2010). Manejo de residuos en la industria cafetera. Recuperado el 23 de 02 de 2012, de Cenicafe: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>
- Rui Li, H. Z. (2007). The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli. 88(12).
- Salehizadeh, M. V. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. 22(3).
- Sanchez, P., & Gomez, N. (2012). PRODUCCIÓN DE ACIDO CLAVULÁNICO POR FERMENTACIÓN DE *Streptomyces clavuligerus*: EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y MODELADO MATEMÁTICO. Universidad Nacional de Colombia, págs. vol. 79, núm. 175, pp. 158-165.
- Sánchez-Leal, L. C.-R.-1. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. En Nova 3 (págs. 109-113.).
- Sepulveda, T. L. (1198). Los plasticos en la actualidad y su efecto en el entorno. XXIV(139).
- Shah, K. (2012). FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by novel *Bacillus* sp. AS 3-2. J Biochem Tech, 380-383.
- Solans, M. (2003). Actinomycetes saprofíticos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. 13(1).
- Sylvia, D. M. (2005). Principles and applications of soil microbiology. USA: Pearson Prentice Hall.
- Vasco, N. (25 de Mayo de 2010). Produccion de polihidroxibutarato a partir de residuos agroindustriales. Universidad Nacional de Manizalez, Caldas, Colombia.
- Verlag, H. (1987). Manual Quimica Organica. Barcelona: Reverte.
- Walker, D., Wang, S. H., & Mothé, C. G. (2004). Síntese e caracterização do copolímero Poli (Ácido Láctico-B-Glicol Etilênico). 14(2).



Zakariaa, M. R., & Hidayah Ariffina, N. A.-A. (2010). Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172. *Polymer Degradation and Stability*, 1.

Zavaleta, E. (2010). Los acidos grasos volatiles, fuente de energia en los rumiantes. . En U. N. Mexico. Mexico.