



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**PROCESO DE OPTIMIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE PHB A
PARTIR DE *Pseudomonas* spp. Y SUERO DE LECHE**

**TESIS PROFESIONAL QUE
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA

MARÍA ESTHER LOZANO PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS

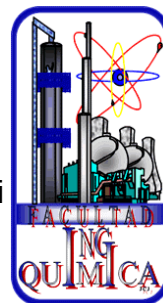
DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS

M.C. ALMA LÓPEZ GARCÍA

Puebla, Pue.

Mayo 2014





C. MARÍA ESTHER LOZANO PÉREZ
PASANTE
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE:

Oficio No. FIQ/AC/001/2014
Asunto: Registro de Tema de Tesis
Fecha: 06 de Enero de 2014

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Química cuyo título es el siguiente:

"PROCESO DE OPTIMIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE PHB A PARTIR DE *Pseudomonas spp.* Y SUERO DE LECHE"

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Co-Director de tesis: M.C. Alma López García

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO**.

ATENTAMENTE
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"

M.I.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA

SECRETARIA
ACADÉMICA

C.c.p. Director de Tesis: Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Co-Director de tesis: M.C. Alma López García
Archivo.



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

LIC. Ma. Cristina Laura Gómez Aguirre.
Directora de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
**AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS**

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Química:

MARÍA ESTHER LOZANO PÉREZ

Quién presenta como tema de tesis:

**PROCESO DE OPTIMIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE PHB
A PARTIR DE *Pseudomonas* spp. Y SUERO DE LECHE**

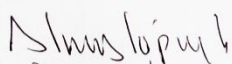
La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 19 de mayo de 2014


M.C. Alma López García
Co-asesor de tesis
Director de Tesis
Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez

CONTENIDO

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
HIPÓTESIS.....	9
CAPÍTULO 1	10
ANTECEDENTES.....	10
1.1 GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS	10
1.2 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	11
1.2.1 Morfología.....	11
1.2.2 Tinción de Gram	12
1.3 RATIFICACIÓN DE CEPAS	13
1.3.1 Pruebas bioquímicas de identificación	13
1.3.1.1 Prueba de la catalasa	13
1.3.1.2 Prueba oxidasa o citocromooxidasa.....	13
1.3.1.3 TSI (Hierro y triple azúcar)	14
1.3.1.4 MIO (movilidad indol ornitina).....	15
1.3.1.5 Prueba de Sellers	15
1.3.1.6 OF (oxidador/fermentador).....	16
1.4 CONSERVACIÓN DE CEPAS	16
1.4.1 Medios de cultivo	16
1.4.2 Técnica de sembrado.....	17
1.5 INCUBACIÓN.....	17
1.6 <i>Pseudomonas</i>	19
1.7 FUENTE DE CARBONO: SUERO DE LECHE	20
1.8 POLÍMEROS	21
1.8.1 Clasificación de polímeros	21
1.9 BIOPOLÍMEROS	23

1.9.1 Biomateriales	23
1.9.2 Bioplásticos o biopolímeros.....	24
1.9.3 Biosíntesis de biopolímeros mediante bacterias.....	24
1.10 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA): POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) ...	27
1.10.1 Aplicaciones de los PHA	29
CAPÍTULO 2	30
METODOLOGÍA	30
2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	30
2.2 RATIFICACIÓN DE CEPAS	31
2.3 ACONDICIONAMIENTO DEL SUERO DE LECHE	32
2.4 PREPARACIÓN DE PRE-CULTIVO.....	33
2.5 INCUBACIÓN.....	35
2.6 PURGA Y EXTRACCIÓN	36
2.7 PURIFICACIÓN.....	37
2.8 CARACTERIZACIÓN	38
2.8.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	38
2.8.2 Caracterización de la superficie por microscopia	39
CAPÍTULO 3	41
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	41
3.1 Bioquímicas.....	41
3.2 Curvas de crecimiento ajustadas al modelo de Monod.....	43
3.3 Purga del cultivo cosechado.....	46
3.4 Pesos finales del PHB obtenido	47
3.5 Resultados de los análisis aplicados a la película formada	48
3.5.1 Microscopias	48
3.5.2 Análisis del espectro de infrarrojo	52
3.5.3 Pruebas de solubilidad.....	54
CONCLUSIONES	56
APÉNDICE A	58
APÉNDICE B.....	61

BIBLIOGRAFÍA.....	64
-------------------	----

RESUMEN

La contaminación es un problema a nivel mundial, siendo el plástico uno de los mayores contaminantes debido a su lenta, por lo tanto se ha hecho necesaria la creación de nuevos materiales haciendo uso de la biotecnología, trabajando con microorganismos y aprovechando residuos ricos en fuente de carbono por ejemplo el suero de leche, es así como nacen los polihidroxialcanoatos (PHA), de los cuales el más conocido es el PHB.

Los PHA son materiales del tipo poliésteres alifáticos, sintetizados por algunos géneros bacterianos como *Pseudomonas* quienes son capaces de almacenar dentro de su citoplasma estos poliésteres, ante un estrés nutricional. Los PHB tienen características muy similares a los polímeros sintéticos excepto porque los primero son completamente biodegradables. Se adaptó un reactor con características de un reactor del tipo biológico para cosechar el cultivo de *Pseudomonas*. De estos microorganismos cosechados se extrae el polímero del citoplasma mediante lisis celular por medio de dispersiones de hipoclorito de sodio y cloroformo, obteniendo al final del proceso una película con formación de cuerpos cristalinos en forma de esferulitas los cuales se analizaron mediante espectroscopía de infrarrojo FT-IR, microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que la contaminación por la acumulación y lenta degradación de plásticos derivados del petróleo va en aumento, por lo tanto se ha hecho necesaria la creación de nuevos materiales, haciendo uso de la biotecnología y aprovechando algunos residuos ricos en fuente de carbono por ejemplo el suero de leche; es así como nacen los polihidroxialcanoatos (PHA) los cuales son materiales del tipo poliésteres alifáticos sintetizados por algunos géneros bacterianos ante un estrés nutricional, el más conocido es el PHB. Dentro de estos géneros bacterianos se encuentran especies de *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*, que son capaces de almacenar dentro de su citoplasma estos poliésteres cuya finalidad es comenzar a sustituir a los plásticos derivados del petróleo, pues sus características son muy similares no obstante los poliésteres del tipo PHA y PHB son completamente biodegradables. Estos materiales se han investigado a partir de su descubrimiento en 1926, posteriormente se descubrió que es debido al estrés nutricional como se acumulan estos materiales en forma de gránulos dentro del citoplasma por lo cual se han estudiado diversas metodologías para su extracción tales como las que menciona Guo-Quian Chen en su artículo *Production of novel polyhydroxyalkanoates by Pseudomonas stutzeri 1317 from glucose and soybean oil* o la planteada por Barbosa en su artículo *Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) por Ralstonia eutropha ATCC 17697* por mencionar algunas. El presente trabajo aborda una alternativa para la generación de materiales plásticos biodegradables mediante el aprovechamiento de los residuos generados a partir de la producción de derivados lácteos, dándole un valor agregado a estos nuevos materiales haciendo su proceso rentable.

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar el proceso de obtención de PHB mediante *Pseudomonas* spp. y el aprovechamiento de suero de leche.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Obtener PHB a través del escalamiento derivado de la respuesta de un sistema modelado mediante diseño de experimentos (DOE)
- ✓ Extraer, purificar y caracterizar el polímero PHB obtenido.

HIPÓTESIS

H_0 : No es posible obtener PHB a gran escala

H_a : Ha sido posible obtener PHB en micro escala por lo que es factible obtener estos materiales mediante un proceso de escalamiento (a un mayor volumen de masa reactante) a partir de las condiciones de optimización planteadas en un diseño de experimentos.

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DE LAS CÉLULAS

La célula, es la unidad fundamental de la vida. Existen dos tipos de célula, procariones y eucariones. Las células procariones son aquellas que carecen de un núcleo y solo están protegidas por una membrana que protege a toda la célula. Las células eucariones por otro lado, tienen al menos dos compartimentos, pues toda la célula está contenida dentro de una membrana plasmática circundante, y en su interior tiene un segundo compartimento que contiene el material genético [Cassimeris, 2012], ambas células se pueden apreciar en la Figura 1.

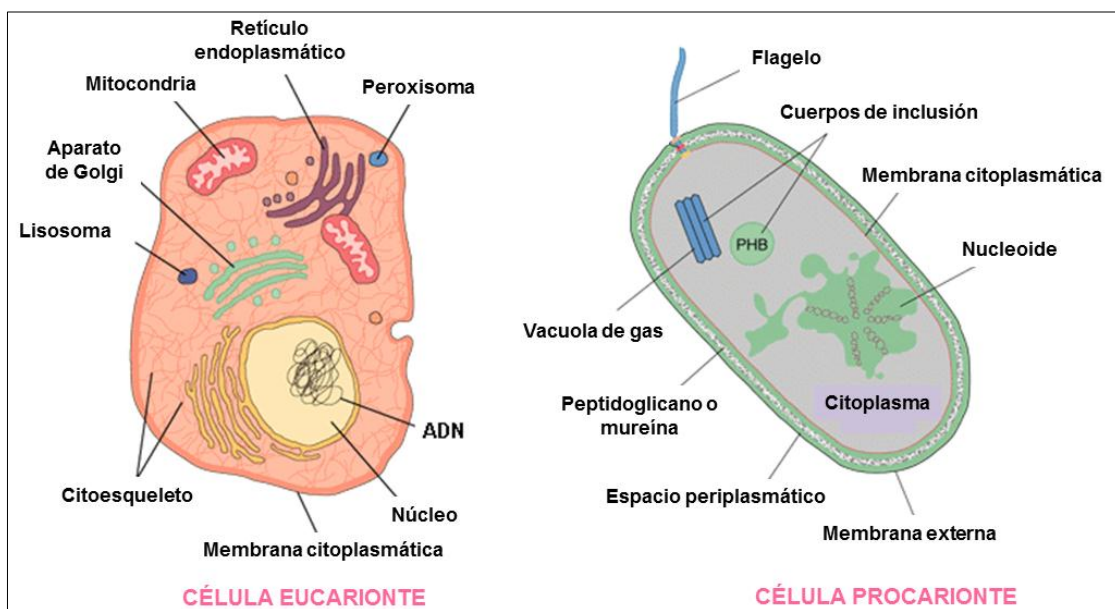


Figura 1. Tipos de células

Las bacterias son organismos microscópicos unicelulares y pertenecen al grupo de las células procariones. Al ser unicelulares pueden llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción de manera independiente de otras células. La ciencia que se encarga del estudio de los microorganismos es la microbiología, la cual ha contribuido mucho en diversas

ramas como son la medicina, la agricultura o la industria alimenticia por mencionar algunas.

Las bacterias están constituidas en su mayor parte de líquido, el 80% consta de agua, 10% de proteínas, 2% azúcares, 2% lípidos, 1.3% aminoácidos y ácidos orgánicos, 0.4% DNA, 3% RNA y 1.3% materia inorgánica [Renneberg, 2009] y en su peso seco el 50% de la célula es carbono. Por lo general, las bacterias se reproducen asexualmente por fisión binaria o bipartición, pueden ser autótrofas es decir, que son capaces de biosintetizar todo el material celular a partir del CO₂ como única fuente de carbono, o heterótrofas cuando requieren compuestos orgánicos como fuente de carbono.

1.2 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

1.2.1 Morfología

Las bacterias pueden ser identificadas por su forma, las estructuras esenciales de las células microbianas han evolucionado hasta adaptar una forma en la que pueden llevar a cabo funciones específicas de un modo eficaz. El tamaño de estas células, tiene un efecto importante en su biología mientras que su morfología ayuda a ser diferenciadas de otras células procariotas.

Una bacteria con morfología esférica u ovoide se llama *coco* y cuando tiene forma cilíndrica se denomina *bacilo*. Algunos bacilos se curvan en forma espiral y se llaman entonces *espirilos*. En ocasiones estas células procariotas se mantienen juntas después de la división celular formando grupos, por ejemplo, algunos cocos que a su vez forman largas cadenas llamadas *Streptococcus*, otros se disponen en agrupaciones cúbicas tridimensionales llamadas *Sarcina* y unos más forman conjuntos como racimos de uvas, a estos se les denomina *Staphylococcus* (Figura 2) [Madigan, 2009].

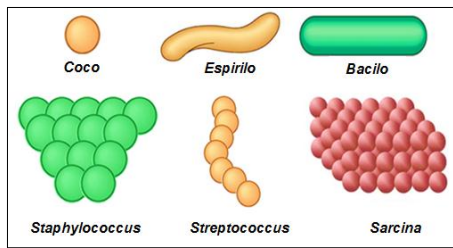


Figura 2. Morfología bacteriana

1.2.2 Tinción de Gram

Otro método de identificación de bacterias es a partir de colorantes los cuales son compuestos orgánicos ya sean naturales o sintéticos y cada uno de ellos tiene afinidad por determinados componentes celulares.

Durante la realización de este proyecto los colorantes más empleados fueron los siguientes: cristal violeta, lugol, safranina [Ellner, 2000].

Una tinción ampliamente usada es la tinción de Gram, la cual fue desarrollada por el bacteriólogo danés Christian Gram en 1884. Esta técnica es de tipo diferencial ya que ayuda a diferenciar por medio de colores diferentes tipos de células. Es muy usada para conocer la morfología de la bacteria en cuestión dando una primera aproximación del tipo de microorganismo estudiado. De acuerdo al resultado de esta tinción se puede dividir en dos grandes grupos: las grampositivas que se tiñen de color morado y las gramnegativas que se tiñen de color rosa. Esta diferencia en la respuesta a la tinción de Gram se debe a diferencias en la estructura de la pared celular [Madigan, 2009]. En la Figura 3 se esquematiza el resultado de la tinción de Gram para los dos grupos.

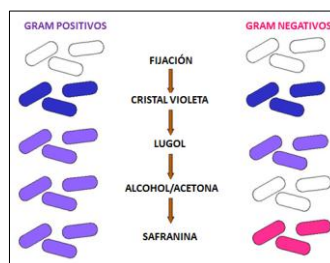


Figura 3. Técnica de tinción de Gram

1.3 RATIFICACIÓN DE CEPAS

1.3.1 Pruebas bioquímicas de identificación

Las pruebas bioquímicas se utilizan para conocer las actividades metabólicas y enzimáticas de los microorganismos que junto con la tinción de Gram nos ayudan a ratificar a un microorganismo. En los párrafos siguientes se menciona el fundamento de 4 pruebas bioquímicas utilizadas en este trabajo [MacFaddin, 2003].

1.3.1.1 Prueba de la catalasa

Esta prueba se encarga de detectar la presencia de la enzima catalasa. La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno que se usa es en concentración al 30%, este se forma como uno de los productos finales del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule resulta letal para la célula bacteriana. Un resultado positivo es aquel en el que se produce una reacción entre las células y el peróxido de hidrógeno al 30% (Figura 4).

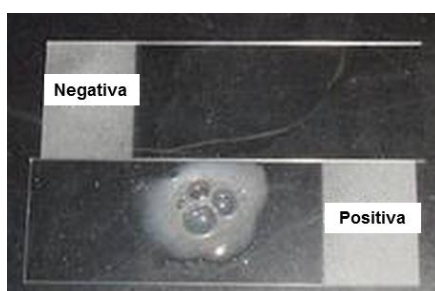


Figura 4. Prueba catalasa

1.3.1.2 Prueba oxidasa o citocromooxidasa

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia transfiriendo electrones al oxígeno con formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios

o anaerobios facultativos de modo que la prueba de oxidasa es importante para identificar aquellos organismos que carecen de esta enzima (anaerobios obligados). La prueba es muy útil para diferencia enterobacterias (todas oxidasa negativas) de otras especies como *Pseudomonas* o *Neisserias* oxidasa positiva. Esta prueba se puede hacer en sensi-disco como se aprecia en la Figura 5 en donde se obtuvo un resultados positivo dando un cambio de coloración.



Figura 5. Prueba oxidasa en sensi-disco con resultado positivo

1.3.1.3 TSI (Hierro y triple azúcar)

Es una prueba usada para la fermentación de la glucosa, lactosa y sacarosa así como también para determinar si existe producción de H_2S por parte de la bacteria sumándole producción de gas. Si se fermentan los 3 azúcares hay cambio de color tanto en la superficie como en el fondo. La presencia de burbujas que rompen el medio y a veces tienden a expulsarlo indica presencia de gas como producto final de la fermentación. La producción de H_2S se manifiesta por la aparición de un precipitado color negro debido a la reducción de la sal de hierro presente en el medio ver Figura 6.



Figura 6. Prueba de TSI y algunos de sus diferentes resultados

1.3.1.4 MIO (movilidad indol ornitina)

La prueba MIO es un medio de cultivo semisólido altamente nutritivo debido a la presencia de extracto de levadura, peptona y tripteína. En donde la tripteína aporta grandes cantidades de triptófano, sustrato de la enzima triptofanasa, para la realización de la prueba del indol. La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina decarboxilasa, el púrpura de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color púrpura y en medio ácido es amarillo. Por su composición, es posible detectar 3 reacciones en un mismo tubo: movilidad, presencia de ornitina decarboxilasa e indol ver Figura 7.



Figura 7. Prueba MIO y sus diferentes resultados

1.3.1.5 Prueba de Sellers

La prueba de Sellers proporciona información acerca de los pigmentos (Figura 8) que produce esta bacteria así como de la presencia de fluorescencia debido a estos, la cual se comprueba bajo luz ultravioleta.



Figura 8. Prueba Sellers

1.3.1.6 OF (oxidador/fermentador)

Mediante esta prueba se determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización (Figura 9). Las bacterias ocupan diferentes vías metabólicas para obtener sus nutrientes y la energía, casi todas las bacterias consumen algún tipo de carbohidrato generalmente el más utilizado por las bacterias es la glucosa ya sea mediante una vía oxidativa, fermentativa o ambas.



Figura 9. Prueba OF y sus diferentes resultados

1.4 CONSERVACIÓN DE CEPAS

1.4.1 Medios de cultivo

Existen dos tipos de medios de cultivo, los medios definidos y los medios complejos. Los primeros se preparan añadiendo cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos, mientras que los medios complejos son aquellos que se distribuyen comercialmente en forma de polvos de concentrados de productos animales o vegetales por ejemplo caseína, carne, soya, extracto de levaduras, etcétera, a estos se les agrega agua destilada y se someten a esterilización mediante autoclave. Ambos medios sirven para proporcionar nutrientes a los microorganismos sembrados con la finalidad de procurar su crecimiento y conservación durante un tiempo no muy prolongado ya sean días o semanas y bajo ciertas condiciones.

1.4.2 Técnica de sembrado

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incubaba a una temperatura adecuada para el crecimiento [Madigan, 2009].

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

1. Que se efectúen asépticamente
2. Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados
3. Se deben realizar sólo los manipuleos indispensables
4. Se debe evitar trabajar fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien flujo laminar.

Existen diferentes tipos de siembra de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar, uno de ellos es la estría cruzada como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Cultivo sembrado en estría cruzada

1.5 INCUBACIÓN

Las condiciones ambientales óptimas requeridas por los microorganismos para llevar a cabo su crecimiento, varían dependiendo del tipo de microorganismo a cultivar. Algunas de las condiciones para llevar a cabo el cultivo son las siguientes [Ellner, 2000]:

- Una composición nutritiva determinada
- Concentración adecuada de los sustratos nutritivos
- pH óptimo en el sustrato
- Temperaturas óptimas
- Actividad de agua determinada
- Presión parcial de oxígeno determinada.

Cuando se está llevando a cabo la incubación se produce un crecimiento bacteriano el cual se define como el incremento en el número de células microbianas de una población que también puede ser medida como el incremento de la masa microbiana. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o masa celular por unidad de tiempo. El tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células se denomina tiempo de generación o tiempo de duplicación, este varía de acuerdo al tipo de microorganismos.

En un sistema cerrado conocido también como cultivo monofásico o *batch*, el crecimiento exponencial de una población no puede continuar indefinidamente y se obtiene una típica curva de crecimiento la cual describe un ciclo completo de crecimiento y puede dividirse en 4 fases como lo muestra la Figura 11. Las fases de esta curva son: la fase de adaptación o latencia, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte bacteriana [Madigan, 2009].

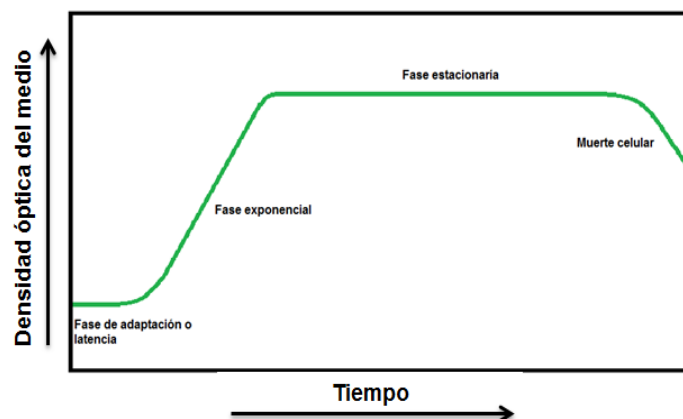


Figura 11. Curva de crecimiento bacteriano

1.6 *Pseudomonas*

Este género bacteriano está compuesto por bacilos gramnegativos móviles como se puede apreciar en la Figura 12 los cuales producen pigmentos hidrosolubles que se difunden a través del medio. Se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, el agua, las aguas negras y en el aire. *Pseudomonas aeruginosa* se presenta frecuentemente en pequeña proporción en la flora intestinal normal. Otras especies de *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas putida* se encuentran en suelos pero rara vez producen enfermedad. *P. aeruginosa* crece con facilidad en los medios de cultivo, no fermenta la lactosa y forma colonias redondas, lisas, de color verdoso fluorescente y de olor dulzón, muy parecido al olor del nixtamal. De sus colonias se difunde un pigmento verde-azul hacia el medio. Algunas cepas tienen actividad hemolítica en el caso de *P. aeruginosa*. Entre los pigmentos producidos por *P. aeruginosa* están la piocianina, una sustancia azulosa soluble en agua y en cloroformo y que posee cierta actividad antimicrobiana y la fluoresceína, una sustancia verdosa fluorescente, hidrosoluble e insoluble en cloroformo. *P. aeruginosa* puede producir también una exotoxina termolábil.

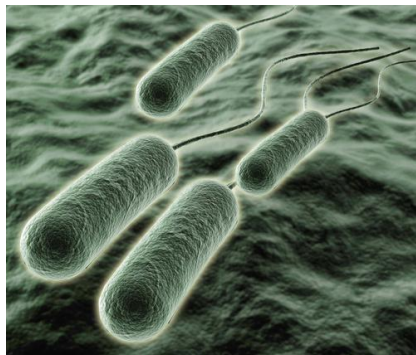


Figura 12. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es patógena solamente cuando es introducida en áreas que carecen de las defensas normales por ejemplo en pacientes inmunodeprimidos, pacientes con quemaduras graves, lactantes, prematuros o cuando participa en infecciones mixtas. La gentamicina, carbenicilina, polimixinas y cloranfenicol son

los antimicrobianos más comúnmente efectivos contra *P. aeruginosa* [Jawetz, 2011].

Esta bacteria también tiene la característica de almacenar dentro de su citoplasma un material polimérico de reserva, que ocupa cuando el medio que la contiene está desbalanceado nutricionalmente pero es rico en una fuente de carbono.

1.7 FUENTE DE CARBONO: SUERO DE LECHE

Las células en general necesitan carbono y en el caso de las células procariotas requieren utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono. Tan solo en relación a su peso seco, una célula llega a tener el 50% de carbono. Las bacterias pueden asimilar varios compuestos orgánicos carbonados y usarlos para hacer nuevo material celular.

El suero de leche es el residuo que se produce después de la coagulación de la caseína, esta coagulación es el proceso en que las proteínas se vuelven insolubles y se solidifican transformando la leche en una sustancia semisólida y gelatinosa. La elaboración de quesos se enfoca a la coagulación de la caseína lo cual se puede provocar por acción de ácidos o por medio de enzimas. El cuajo es la enzima que coagula la leche y puede tener origen animal y microbiológico. El auténtico cuajo se extrae de los estómagos desecados de terneras lactantes, siendo este una enzima conocida como renina.

Durante la producción de queso, enfatizando en la etapa del desuerado, se tiene que por cada 100 Kg de leche se obtienen cerca de 11 Kg de queso con un contenido acuoso del 45%, aproximadamente 5 Kg de líquido, entonces de los 100 kg de leche le restamos los 11 kg de queso menos los 5 Kg de líquido que contiene el queso formado, queda un total de 84 Kg de líquido total del cual la mayor parte se desecha en el desuerado y el resto se desecha durante la maduración del queso [Meyer, 2007].

1.8 POLÍMEROS

1.8.1 Clasificación de polímeros

La palabra polímero se deriva de las palabras griegas *poli* y *meros* que en conjunto significan muchas partes respectivamente, sin embargo también se pueden usar otras palabras para nombrarlos tales como macromolécula o molécula grande. Un polímero es una sustancia cuyas moléculas forman cadenas largas, por lo común de varios millares de átomos de longitud [Jones, 1997]. Los polímeros pueden clasificarse de diferentes maneras, y a su vez, esas clasificaciones, pueden subdividirse en otras. De acuerdo a su origen, se dividen en polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los polímeros naturales como su nombre lo indica, son aquellos que provienen de los seres vivos es decir de la naturaleza, mientras que los sintéticos, son aquellos que se obtienen por el hombre mediante síntesis ya sea en un laboratorio o en una industria. A su vez los polímeros están conformados por monómeros, que son moléculas de poca masa molecular que unidos a otros monómeros dan lugar a la formación de polímeros; éstos pueden ser también naturales o sintéticos. Los monómeros sintéticos se obtienen mediante la modificación de los monómeros naturales. Por otro lado los aminoácidos, los nucleótidos y los monosacáridos son ejemplos de monómeros de origen natural. De acuerdo al tipo de monómeros se clasifican en: homopolímeros y copolímeros [Seymour, 2002]. Los homopolímeros son macromoléculas que están formadas por monómeros idénticos. Por otro lado a los copolímeros los conforman 2 ó más monómeros diferentes. Dentro de los copolímeros se encuentra una sub clasificación que depende de la forma en que estén ordenados los monómeros, ya sea al azar, cuando los monómeros no presentan orden alguno; alternado, cuando se observa un patrón de monómeros alternados; en bloque cuando presentan un patrón alternado pero en bloques o paquetes; injertado, cuando se ve una cadena principal formada por un solo monómero y contiene ramificaciones formadas por el otro monómero unidas a la cadena

principal. A su vez también están los polímeros lineales o ramificados ver Figura 13.

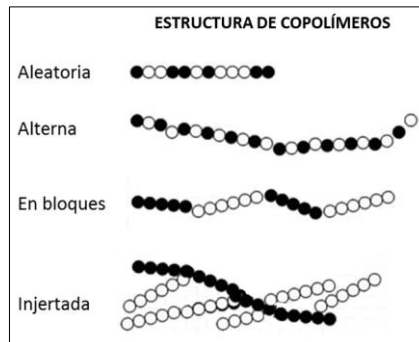


Figura 13. Estructura de copolímeros

Los monómeros al unirse pueden dar diferentes formas de polímeros, lo que influye en sus propiedades, los que son de forma lineal con cadenas unidas por interacciones o fuerzas débiles, nos darán un material blando y moldeable; mientras que una estructura ramificada nos dará un polímero rígido y frágil, entre otras características [Jones, 1997].

Dentro de la clasificación de los polímeros se encuentran los plásticos naturales o sintéticos. Los plásticos tienen la característica de poder moldearse en algún momento de su elaboración mediante la aplicación de fuerza y temperatura, ejemplos de ellos son el caucho un polímero natural, el celuloide, un polímero semisintético y al polietileno que es un polímero sintético.

Los plásticos se dividen en termoplásticos, termoestables y elastómeros, su estructura se puede apreciar en la Figura 14. Los primeros son materiales rígidos a temperatura ambiente, pero al aumentar su temperatura se ponen blandos y moldeables por lo que se pueden fundir y moldear varias veces sin cambiar sus propiedades, de esta manera se hacen reciclables. Mientras que los plásticos termoestables son aquellos materiales que están formados por polímeros unidos mediante enlaces químicos adquiriendo una estructura polimérica altamente reticulada y ésta es la responsable directa de las altas resistencias mecánicas y físicas que soportan, sin embargo también tienen baja ductilidad y una alta temperatura de transición vítrea, finalmente los elastómeros son materiales que

presentan un comportamiento elástico [Askeland, 2008], como se ve en la Figura 14.



Figura 14. Estructura de los plásticos

1.9 BIOPOLÍMEROS

En la realización de este trabajo se aplicó biotecnología, la cual puede definirse como el aprovechamiento de la biología para aplicarla como tecnología, haciendo uso de seres vivos, y de los recursos que nos da la naturaleza para obtener productos, de forma que resulte un beneficio para el ser humano ya sea para obtener un producto valioso o para mejorar algún procedimiento industrial [Renneberg, 2009].

Una aplicación de la biotecnología es la creación de nuevos materiales, por ejemplo los biopolímeros y los biomateriales que a pesar de que tengan un poco de similitud en el nombre, éstos son diferentes. Y esta diferencia radica en el fin para el cual son elaborados y su tiempo de degradación.

1.9.1 Biomateriales

Los biomateriales son materiales creados a partir de sustancias naturales o sustancias sintéticas, generadas y producidas artificialmente, para uso en el organismo humano. Deben tener la característica de que no deben ser rechazados por el organismo y no deben provocar daños al mismo. También pueden ser llamados materiales bioaplicables [Chavira, 2013].

Las aplicaciones de estos materiales van más al área biomédica, en donde pueden ser utilizados en prótesis, implantes artificiales de todo tipo, incluso en la

regeneración de tejidos. De esta manera los podemos encontrar en piezas dentales, hilos de sutura reabsorbibles, reconstrucciones óseas.

1.9.2 Bioplásticos o biopolímeros

Los bioplásticos o también conocidos como biopolímeros por otro lado son aquellos materiales derivados de productos naturales, que son completamente degradables [Madigan, 2009]. Algunos biopolímeros conocidos son:

- Los plásticos fotobiodegradables son polímeros cuya estructura se altera por la exposición a la radiación ultravioleta (procedente del sol) y genera polímeros modificados, susceptibles al ataque microbiano.
- Los plásticos a base de almidón utilizan el almidón (polímero de la glucosa) como conector de los fragmentos cortos de un segundo polímero biodegradable, este diseño acelera la biodegradación porque las bacterias que digieren almidón en el suelo atacan el almidón y liberan fragmentos del polímero que luego se degradan por la acción de otros microorganismos. La glucosa que se libera de la biodegradación del almidón también se puede utilizar como fuente de carbono y energía lo que ayuda al cometabolismo del polímero.
- Los plásticos microbianos: están basados en el poli- β -hidroxibutirato, un polímero de reserva de carbono, y compuestos relacionados. Estos polímeros de reserva tienen muchas de las propiedades buscadas en un plástico sintético y se pueden biosintetizar de diferentes formas. Un copolímero que tiene aproximadamente la misma cantidad de poli- β -hidroxibutirato y de poli- β -hidroxivalerato ha sido el de mayor éxito comercial hasta ahora conocido como Biopol [Madigan, 2009].

1.9.3 Biosíntesis de biopolímeros mediante bacterias

Los microorganismos al igual que los seres humanos, necesitan de energía para llevar a cabo funciones propias de cada célula. La energía liberada como

consecuencia de las reacciones de oxidación-reducción debe ser conservada para las funciones celulares. Esta energía es comúnmente transferida a una diversidad de compuestos fosforilados para formar enlaces fosfato de alta energía, estos compuestos funcionan entonces como la fuente de energía en aquellas reacciones que la requieran dentro de la célula.

El compuesto fosfatado de alta energía más importante en organismos vivos es el adenosín trifosfato (ATP), el cual es el ribonucleósido de adenosina al que se unen tres moléculas de fosfato en serie. Además de compuestos con fosfatos de alta energía, se producen otros en la célula que pueden conservar la energía producida en reacciones exotérmicas. Éstos incluyen derivados de la coenzima A (CoA). Las rutas para la oxidación de compuestos orgánicos y la conservación de la energía como ATP pueden contemplarse en dos grandes grupos: (1) fermentación y (2) respiración [Roskoski, 1997].

Para la síntesis de PHB ver Figura 15, las bacterias utilizan al menos 4 rutas diferentes. La más común es la que se presenta en *Ralstonia eutropha* y en *Azotobacter* spp; en estos microorganismos tres actividades enzimáticas llevan a cabo la biosíntesis de los PHB [Martínez, 2002]:

1. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa para dar acetoacetil-CoA.
2. El acetoacetil-CoA formado, se reduce por la acetoacetil-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA
3. Finalmente se polimeriza por la actividad de la PHB sintasa.

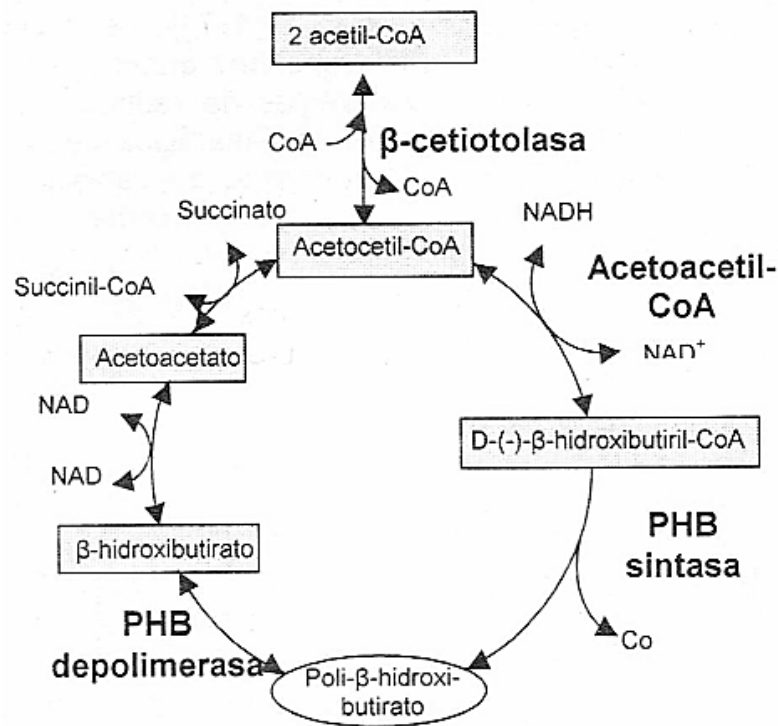


Figura 15. Ruta metabólica del PHB

El ATP está presente en concentraciones relativamente bajas en la célula, alrededor de 2 mM, en una célula en crecimiento activo, por ello el ATP juega un papel catalítico durante el crecimiento celular, el ATP está continuamente siendo utilizado para dar energía en reacciones biosintéticas y continuamente resintetizado a expensas de reacciones catabólicas. Para el almacenamiento de energía la mayoría de los microorganismos producen polímeros insolubles que pueden ser oxidados más tarde para la producción de ATP, tal es el caso de los polímeros de glucosa de almidón y glucógeno, poli-β-hidroxibutirato y otros polihidroxialcanoatos así como azufre elemental que es almacenado por muchos quimiolitótrofos sulfurados. Estos polímeros se depositan dentro de la célula formando gránulos, inclusiones o vesículas como muestra la Figura 16 que a menudo pueden verse con microscopios ópticos o electrónicos y que además se puede aumentar su contraste mediante colorantes.



Figura 16. Gránulos de PHB en la célula

En ausencia de una fuente externa de energía, la célula puede oxidar estos polímeros y obtener nuevo material celular o simplemente usarlos como nutrientes cuando no están disponibles en el medio. Los polímeros de reserva hacen posible el almacenamiento de energía accesible fácilmente y que no interfieren con otros procesos celulares. La mayoría de las inclusiones están rodeadas por una membrana fina que consta de lípidos que aíslan la inclusión del citoplasma pero que no posee la estructura típica de una membrana. En organismos procarióticos uno de los cuerpos de inclusión más frecuentes está compuesto de ácido poli- β -hidroxi-butírico (PHB) un compuesto lipídico que consta de unidades de ácido- β -hidroxibutírico. Los monómeros de este ácido están unidos por enlaces éster formando el largo polímero de PHB, y estos polímeros se agregan formando gránulos.

1.10 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA): POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Los PHA son polímeros del tipo poliésteres alifáticos (Figura 17), naturales sintetizados por algunos géneros bacterianos, que los acumulan intracelularmente como material de reserva cuando el medio de cultivo se encuentra desbalanceado con limitación de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno y con un exceso de fuente de carbono [Pettinari, 2004].

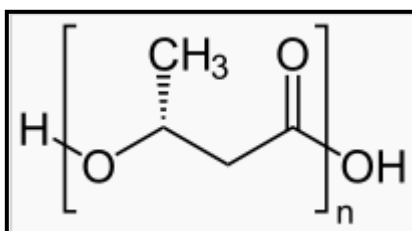


Figura 17. Estructura química del PHB

El primer PHA descubierto, fue el PHB (polihidroxibutirato), poli(3-hidroxibutirato) (poli(3HB)) que fue aislado y caracterizado en 1926 por el microbiólogo Maurice Lemoigne en el Instituto Pasteur en París [Steinbüchel, 2002], quien observó la producción de PHB por *Bacillus megaterium*. Posteriormente, en 1958 Macrae & Wildinon observaron que *Bacillus megaterium* acumulaba el polímero cuando la relación glucosa/nitrógeno en el medio de cultivo no se encontraba en equilibrio y observaron su degradación cuando existía falta o deficiencia de fuentes de carbono o energía. A partir de este hecho, se encontraron inclusiones de PHA en una extensa variedad de especies bacterianas. Los PHB son producidos por organismos procarióticos generalmente por bacterias gramnegativas, aunque existen bacterias grampositivas también productoras en menor escala; algunas de bacterias productoras son: *Alcaligenes* spp, *Bacillus* spp, *Azotobacter* spp, *Pseudomonas* spp. [Mirac., 2005].

La primera patente de PHB fue pedida en los Estados Unidos por J. N. Baptist en 1962. En 1983 ocurrieron dos acontecimientos importantes, primero fue el descubrimiento por De Smet, de una cepa de *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 29347) productora de PHB y consecutivamente se dio la primera producción del primer biopolíéster de uso comercial el cual era un copolímero formado por monómeros de cuatro y cinco carbonos denominados PHB (polihidroxibutirato) y PHV (polihidroxivalerato), respectivamente, este producto se denominó comercialmente “Biopol” y se produce utilizando *Ralstonia eutropha* (antes *Alcaligenes eutrophus*), a partir de glucosa y ácido propiónico. Este bioplástico en la actualidad ya es sintetizado a partir de fuentes de carbono en bacterias recombinantes y exhibe un alto potencial de biodegradabilidad [Steinbüchel, 2002].

1.10.1 Aplicaciones de los PHA

De acuerdo a la organización europea de bioplásticos, estos nuevos materiales se pueden aplicar en diversos campos [European bioplastics, 2009] tales como:

- ✓ Embalaje
- ✓ Industria alimenticia
- ✓ Agricultura / Horticultura
- ✓ En artículos electrónicos
- ✓ En electrodomésticos
- ✓ En la industria automotriz

De acuerdo a esta información se ha establecido que el 10% de los plásticos que actualmente se emplean en la industria electrónica pueden ser reemplazados por biopolímeros [ECOEMBES, 2007].

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño factorial de experimentos mediante la metodología del diseño de experimentos (DOE) empleando Minitab 16 Statistical Software. En el diseño se consideraron los siguientes factores: carbohidrato (glucosa y sacarosa), concentración del suero de leche, cepa 1, 2, 7 y 12 (descritas en la sección 2.2) y temperatura ver Tabla 1. Con el objetivo de obtener el mayor rendimiento del polímero pues la condición fue que se obtuviera el rendimiento del 60 al 100 por ciento, fue así como se reportaron los siguientes 14 experimentos que cumplieron con dicha condición, estos se pueden ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Experimentos óptimos

Experimento	Carbohidrato	Concentración de suero	Temperatura	Cepa	Rendimiento
1	Sacarosa	30%	37 °C	1	77.8064
2	Glucosa	30%	37 °C	1	73.0797
3	Sacarosa	50%	37 °C	1	83.5211
4	Sacarosa	70%	37 °C	1	80.0069
5	Glucosa	70%	37 °C	1	86.1732
6	Sacarosa	30%	37 °C	2	73.5571
7	Glucosa	30%	37 °C	2	77.1733
8	Sacarosa	50%	37 °C	2	77.0749
9	Sacarosa	70%	37 °C	2	69.75
10	Glucosa	70%	37 °C	2	84.2592
11	Glucosa	70%	37 °C	7	74.6739
12	Sacarosa	50%	37 °C	12	74.0091
13	Sacarosa	70%	37 °C	12	71.4882
14	Glucosa	70%	37 °C	12	72.2555

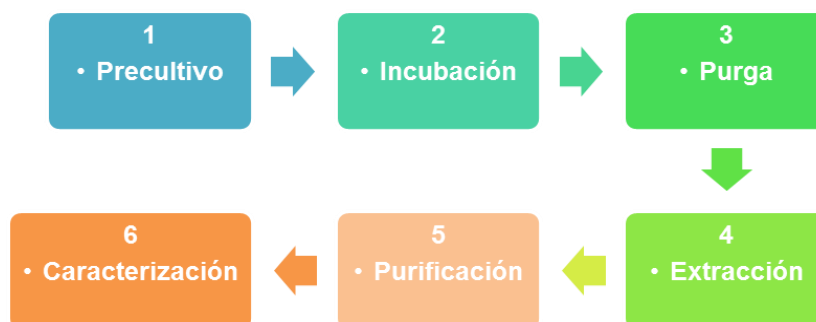
De los 14 experimentos resultantes, se eligieron 6 los cuales se realizaron utilizando Glucosa al 1% y un único experimento con sacarosa al 1%, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Experimentos realizados

Experimento	Carbohidrato	Concentración de suero	Temperatura	Cepa	Rendimiento
E1	Glucosa	30%	37 °C	1	73.0797
E2	Glucosa	70%	37 °C	1	86.1732
E3	Glucosa	70%	37 °C	2	84.2592
E4	Glucosa	70%	37 °C	7	74.6739
E5	Glucosa	70%	37 °C	12	72.2555
E6	Sacarosa	30%	37 °C	1	77.8064

En el Diagrama 1 muestran las etapas de manera general que se llevaron a cabo por cada uno de los 6 experimentos.

Diagrama 1. Diagrama general de trabajo



2.2 RATIFICACIÓN DE CEPAS

Las 4 cepas con las que se trabajó (Figura 18) fueron aisladas de muestras de suelo. En la Tabla 3 se muestran las cepas que se ocuparon para el desarrollo de este trabajo así como la nomenclatura que se manejará.

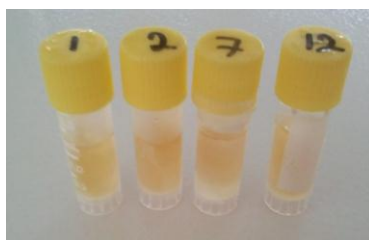


Figura 18. Cepas congeladas

Tabla 3. Cepas y su nomenclatura

Número de cepa	Nombre	Nomenclatura
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	P.a.1
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2	P.a.2
7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P.f
12	<i>Pseudomonas putida</i>	P.p

Las cepas se conservaron mediante la resiembra cada dos semanas de cada una de las cepas como lo muestra la Figura 19 en estría cruzada en un medio sólido de agar soya tripticaseína (AST), y por medio de pruebas bioquímicas y de tinción de gram se ratificaron dichas cepas. En el siguiente capítulo se muestran los resultados.

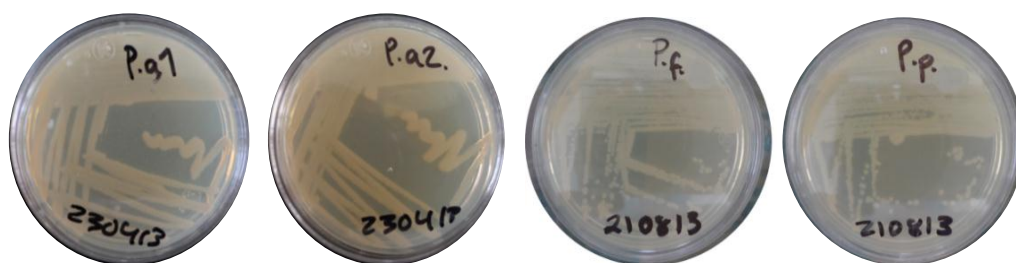


Figura 19. Cepas sembradas en estría cruzada

2.3 ACONDICIONAMIENTO DEL SUERO DE LECHE

La fuente de carbono utilizada para el desarrollo de este trabajo de tesis fue el suero de leche el cual se consiguió de Zacatelco, Tlaxcala, mismo que fue recolectado por personal encargado de la producción de quesos. El proceso para el acondicionamiento del suero de leche es el siguiente:

1. Se consiguió aproximadamente 3 L de suero de leche fresco obtenido después de la elaboración del queso.
2. Se filtró dos veces con vacío.
3. Se trasvasó a recipientes de vidrio y se midió su pH.
4. Se agregó el 1% de carbohidrato en relación a la cantidad de suero que se ocupó por experimento.

5. Se neutralizó con un volumen de aproximadamente 5 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N, con ayuda de un potenciómetro Mettler Toledo SevenMulti.
6. Se homogenizó el suero acondicionado sin calor.
7. Se esterilizó en autoclave 10 lbf/plg² durante 10 minutos.
8. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
9. Para su conservación se refrigeró a 4 °C. No se abrió hasta ocupar.

En la Figura 20 se puede apreciar el suero que se acondicionó y se ocupó en este proyecto.

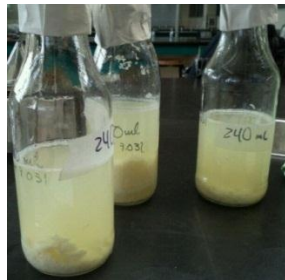
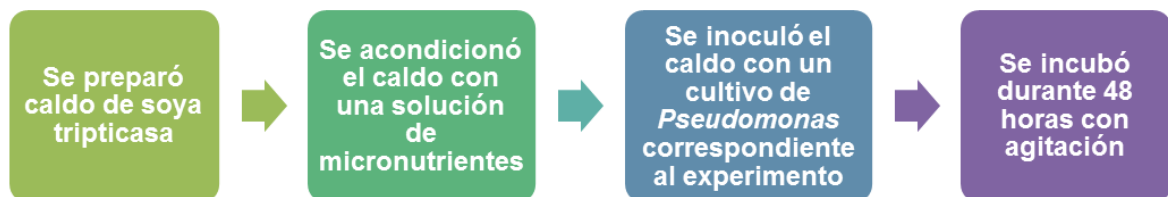


Figura 20. Suero de leche acondicionado

2.4 PREPARACIÓN DE PRE-CULTIVO

Se realizó un pre-cultivo de acuerdo a lo descrito por Moreno y col., [2006] utilizando para este proyecto caldo de soya tripticasa el cual es de fácil acceso. En el Diagrama 2 se puede ver el proceso de elaboración del pre-cultivo que se llevó a cabo.

Diagrama 2. Proceso de elaboración del pre-cultivo



La solución de micronutrientes o también conocida como micro elementos se preparó en base a lo planteado por He y col., [1998], la cual viene desglosada en

la Tabla 4. De esta solución se utilizó 1 mL por cada experimento, este se agregó en el pre-cultivo, en la Figura 21 se puede ver los materiales que se utilizaron para agregar esta solución al pre-cultivo.



Figura 21. Acondicionamiento del pre-cultivo con micronutrientes

Tabla 4. Solución de micro elementos

Reactivo	Cantidad en g
$\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{CaCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	10
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
Todo en 1 L de solución 0.5N de HCl	

También se preparó un suplemento del medio, el cual se preparó en base a lo que reporta He y col., [1998] y viene descrito en la Tabla 5.

Tabla 5. Suplemento del medio

Reactivo	Cantidad de reactivo para:	
	310 mL	120 mL
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.155 g	0.06 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.124 g	0.048 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2.9915 g	1.158 g
KH_2PO_4	0.8215 g	0.318 g
H_2O destilada	310 mL	120 mL

2.5 INCUBACIÓN

Para la etapa de incubación se debe tener listo el suero de leche acondicionado y esterilizado, el pre-cultivo con 48 horas de incubación y el suplemento del medio (Figura 22).



Figura 22. Suplemento, pre-cultivo y suero de leche

Se ocuparon volúmenes de 240 mL y 560 mL ya que son los correspondientes al 30% y 70% de concentración de suero que fueron reportados mediante el diseño factorial del DOE, estos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución de reactivo en relación al suero de leche

Reactivos	Concentración de suero	
	30%	70%
Volumen de suero	240 mL	560 mL
Suplemento del medio	310 mL	120 mL
Pre-cultivo	250 mL	120 mL
Volumen Total	800 mL	800 mL

Para la incubación se usó una adaptación de reactor biológico tipo *Batch* o por lotes mostrado en la Figura 23, con motor IKA RW 20 digital, tanque enchaquetado marca VICHÍ de capacidad 1000 mL sin embargo, con solo se ocuparon 800 mL del mismo para asegurar una mejor agitación, velocidad de agitación de 350 r.p.m., se usó como refrigerante etilenglicol el cual se hizo recircular a 37 °C mediante un recirculador HAAKE DL 30.

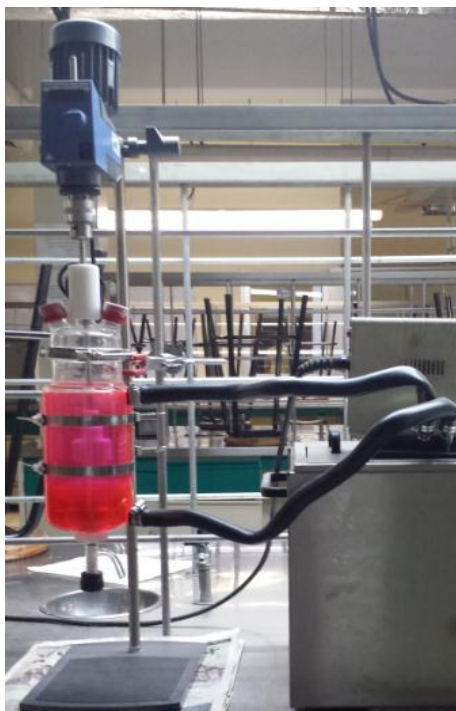


Figura 23. Reactor adaptado como reactor biológico

Se dejó incubar 48 horas y en algunos experimentos hasta 72 horas y el crecimiento fue monitoreado por método turbidimétrico [Madigan, 2009] ya que una suspensión celular tal como la que se cultivó aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión, consecuentemente cuantas más células estén presentes en el medio mayor será la luz dispersada y por tanto mayor la turbidez. Esta turbidez fue medida mediante espectrofotómetro de UV-VIS marca HACH modelo DR 5000 a una longitud de onda de 660 nm [Bello, 2008] la cual para posteriores resultados se reportará como OD_{660} (densidad óptica).

2.6 PURGA Y EXTRACCIÓN

Al terminar el tiempo de incubación se purgó el reactor y se recolectó el cultivo cosechado en un matraz de 1 L., este se dejó en refrigeración a 4 °C una noche para detener el crecimiento celular y para que ocurra la sedimentación.

Una vez recolectado y refrigerado el líquido fermentado, se centrifugó a 6000 r.p.m. en una centrifuga SORVALL RC 5C PLUS durante 30 minutos de acuerdo

con Moreno y col., [2006], se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet el cual es la biomasa cosechada.

Esta biomasa se trasvasó a tubos Eppendorf para ser congelada en refrigerador Thermo Scientific REVCO a -70 °C durante 12 horas y se liofilizó de acuerdo a lo planteado por Desrosier, [2006] en liofilizadora LABCONCO Freeze Dryer 4.5 durante aproximadamente 10 horas hasta ver completamente secas las muestras. Después de tener la biomasa liofilizada, esta se pesó en una balanza analítica OHAUS Explorer Pro, en un matraz de bola de 100 mL o de 250 mL, dependiendo la cantidad de biomasa seca obtenida, y se procedió a realizar las dispersiones de hipoclorito de sodio al 30% y cloroformo durante 1 hora y sin calor con agitación. La relación de la cantidad de dispersiones que se ocupó se tomó de Barbosa [2005], que dice que por cada gramo de biomasa liofilizada, se agregan 50 mL de solución de hipoclorito de sodio al 30% y 50 mL de cloroformo grado reactivo, en este paso se llevó a cabo el rompimiento de la célula (lisis) mediante el hipoclorito de sodio y la extracción del poliéster del citoplasma mediante disolución.

2.7 PURIFICACIÓN

Después de las dispersiones se filtró dos veces con vacío usando papel filtro Whatman 1PS, la solución resultante se concentró en mini rotavapor VICHÍ a 70 °C sin vacío. Simultáneamente, se procedió a verter etanol frío en charolas grandes de vidrio tipo Petri de 150 X 30 mm en donde una vez terminada la concentración en rotavapor es decir que el volumen final en el matraz fuera de 10 a 20 mL aproximadamente, esta solución fue añadida para su posterior precipitación a las placas con etanol, la relación del volumen de etanol que se ocupó fue de 10 veces la cantidad de cloroformo que se agregó inicialmente en las dispersiones, de acuerdo a lo descrito por Barbosa, [2005].

Hasta estos pasos se realizó esta metodología para todos los experimentos, sin embargo de acuerdo a una prueba que se realizó al contenido de una de las charolas de experimento 2, se observó que mediante una segunda concentración en rotavapor (mismas condiciones anteriores) el etanol que una noche antes

permaneció en contacto con la muestra, se podría aprovechar mediante una destilación, por lo tanto, se trasvasó nuevamente a un matraz de bola por medio de una pipeta se logró observar un cambio en el color del etanol ya que este era ámbar y se consideró que muy posiblemente comenzó a extraer algún compuesto del concentrado anterior, es por eso que para los experimentos restantes que para ese momento eran dos (experimento 5 y 6) se decidió aplicar esta metodología concentrando nuevamente. Debido a que el volumen era menor esta vez se ocuparon placas Petri más pequeñas, a fin de llevar a cabo la obtención de una película mediante la técnica de convección forzada.

2.8 CARACTERIZACIÓN

Una vez que se evaporó el etanol, se formó una película color beige a la cual se le hicieron análisis mediante técnicas espectroscópicas para determinar si existía el PHB (monómero). Los análisis que se le realizaron a cada una de las muestras de los 6 experimentos fueron: análisis del espectro en equipo de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR), y para el análisis de la superficie de la película, se realizaron microscopía óptica, microscopías electrónicas de barrido (SEM), y finalmente se realizaron pruebas de solubilidad. En los siguientes párrafos se hará una descripción general de estas técnicas de caracterización.

2.8.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Se hizo un análisis del espectro de infrarrojo realizado en equipo FT-IR marca DIGILAB modelo SCIMITAR con región del espectro electromagnético comprendido de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Primero se corrió el background con un número de escaneos igual a 32. Después se realizó una pastilla de KBr con aproximadamente 5 mg de muestra, esta se introdujo en el porta muestras dentro de la cámara del equipo y se corrió la muestra con el mismo número de escaneos anteriormente mencionados. Esta técnica se eligió primordialmente debido a que nos da un panorama general de los grupos funcionales que existen en nuestra molécula y en muchas otras, que mediante la aplicación de energía por medio de

radiación infrarroja provoca que los enlaces de la misma vibren ya sea por estiramiento o por flexión, ahora bien, sabemos que al ser un polímero el PHB está conformado por cadenas de monómeros los cuales constan de un carbonilo correspondiente al grupo éster, un metil, un metileno, y un hidroxilo, estos son los grupos en los que nos vamos a enfocar para la determinación del PHB en el análisis por FTIR. En la Tabla 7 se pueden apreciar el número de onda al cual estos grupos funcionales absorben energía.

Tabla 7. Grupos funcionales de interés

Tipo de vibración molecular	Enlace	Compuesto	Intervalo de frecuencias, cm^{-1}
Estiramiento	C-H ₃	Metil	2872 y 2962
Estiramiento	C-H ₂	Metileno	2853 y 2926
Estiramiento	O-H	Alcohol	3584-3650
Estiramiento	C=O	Carbonilo	1735-1750
Estiramiento	C-O	Éster	1000-1300

2.8.2 Caracterización de la superficie por microscopia

Después de que se evaporó todo el etanol se formó una película a la cual se decidió analizar mediante microscopia ya que se tenía la sospecha de formación de cristales.

Se analizaron las muestras en microscopio óptico marca ZEISS modelo Axio Scope A1 con cámara marca AxioCam MRc, usando los objetivos 5X, 10X y 40X (Figura 24).

También se realizó un análisis mediante microscopia electrónica de barrido o también conocida como SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy) la cual se lleva a cabo mediante un barrido mediante un rastreo programado con un haz de electrones muy fino focalizado o con una sonda adecuada. Este rastreo programado barre la superficie en línea recta (dirección en x) y vuelve a la posición inicial para después se desplace hacia abajo (dirección en y), este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido

barrida. Durante este proceso de barrido se recibe una señal por encima de la superficie (dirección z) y se almacena en un sistema computarizado donde posteriormente se convierte en una imagen [Skoog, 2001]. El equipo usado para este estudio fue el JEOL modelo JSM-6610LV de x37 a x2000 ampliaciones (Figura 24), mediante SEI (Secondary Electron Image) [Sawyer, 1996].



Figura 24. Microscopios, A: óptico, B: electrónico de barrido (SEM)

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Bioquímicas

Mediante los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y tinción de Gram se logró confirmar que las cepas aisladas corresponden al género *Pseudomonas*, estos resultados corresponden a los reportados por Jawetz y MacFaddin [1975, 2003] y se resumen en la Tabla 8 y se aprecian en la Figura 25.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas

PRUEBA BIOQUÍMICA	P.a.1	P.a.2	P.f	P.p
MORFOLOGÍA	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
TINCIÓN DE GRAM	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
TSI	K/SC	K/SC	K/SC	K/SC
MIO	M: Negativa I: Negativa O: Negativa	M: Negativa I: Negativa O: Negativa	M: Negativa I: Negativa O: Negativa	M: Negativa I: Negativa O: Negativa
SELLERS	Producción de pioverdina (fluoresceína) y piocianina	Producción de pioverdina (fluoresceína) y piocianina	Producción de Piocianina	Poca producción de pioverdina. Piocianina
OF	Oxidador	Oxidador	Oxidador	Oxidador
OXIDASA	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
CATALASA	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

El resultado de algunas pigmentaciones varió de acuerdo al origen de la cepa (cepario) y del tiempo de resiembra, pues debido a esto llegan a mutar las cepas

perdiendo algunas características como en este caso la producción de fluorescencia.

Dónde:

K: Alcalino

I: Indol

SC: Sin cambio

O: Ornitina

M: Movilidad

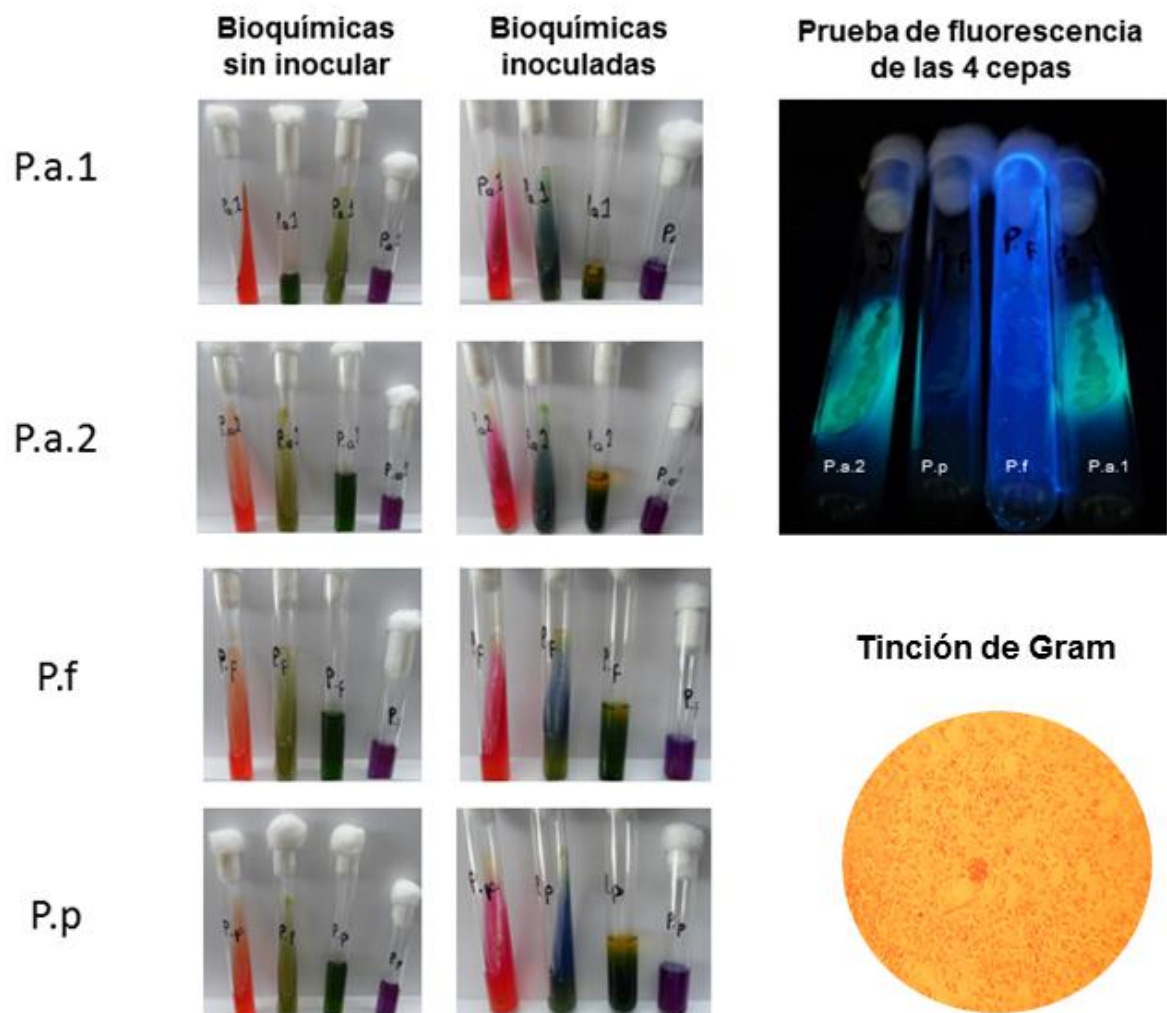


Figura 25. Resultados de pruebas bioquímicas y tinción de Gram vista al microscopio

Haciendo énfasis en los resultados de las pruebas bioquímicas se reporta un resultado negativo para la movilidad (prueba MIO) considerando que la razón pueda deberse al producto de la resiembra de hace dos años de estas mismas cepas las cuales hayan provocado la mutación la cual es comprobada mediante las pruebas bioquímicas afectando únicamente está característica, es decir que no tengan flagelo que permita su movimiento, pues en las pruebas restantes los resultados coincide con lo reportado en la bibliografía.

3.2 Curvas de crecimiento ajustadas al modelo de Monod

El modelo de Monod, es una ecuación que relaciona la velocidad de crecimiento de los microorganismos en un medio con la concentración de sustrato presente en el mismo [Dunn, 2003], la ecuación que lleva este nombre se muestra a continuación

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right)$$

Ecuación 1. Ecuación de Monod

De donde:

μ = Es la velocidad de crecimiento en un sustrato dado (s^{-1})

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidad máxima de crecimiento (s^{-1})

S = Sustrato (g/dm^3)

K_s = Constante de Monod (g/dm^3)

Por otro lado también participa la ecuación de la velocidad de cambio de concentración de células [Dunn, 2003], dada por la siguiente Ecuación 2:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Ecuación 2. Velocidad de cambio

Dónde:

$\frac{dX}{dT}$ = velocidad de cambio (tasa de cambio) de la concentración celular respecto al tiempo (Kg/m³s)

μ = constante de crecimiento celular (s⁻¹)

X = concentración celular (Kg/m³)

Mediante la resolución de las ecuaciones anteriores, se llega a la ecuación final (Ecuación 3) que es el modelo integrado..

$$X = \frac{X_0 e^{\mu_{m\acute{a}x} t}}{1 + \frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}} (e^{\mu_{m\acute{a}x}} - 1)}$$

Ecuación 3. Ecuación de modelo integrado

De donde:

X = Concentración celular ajustada

X_0 = Concentración celular inicial

$X_{m\acute{a}x}$ = Concentración celular final (medida)

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima de crecimiento (s⁻¹)

t = tiempo de incubación

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada uno de los 6 experimentos mediante la medición de la densidad óptica (OD₆₆₀) respecto al tiempo de incubación, haciendo uso del modelamiento con la ecuación de Monod con las ecuaciones 1, 2 y 3, ya que ajustando los valores por medio de la herramienta *solver* de Excel se logró obtener los datos de la Tabla 9 por medio de los cuales se puede determinar qué tan cerca de lo ideal se ajustaron nuestro datos de absorbancia para conocer la cinética del crecimiento de nuestro cultivo, en este caso se usó la absorbancia como concentración celular.

Los resultados de los parámetros cinéticos de acuerdo al modelamiento con la ecuación de Monod fueron los siguientes (ver Tabla 9):

Tabla 9. Resultados de parámetros cinéticos

Experimento	X_0	$X_{\text{máx}}$	$\mu_{\text{máx}}$ (h)	Tiempo de duplicación
E1	0.050000088	0.739632926	0.23939903	2.895363303
E2	0.129876837	0.877198827	0.38547838	1.798148006
E3	9.78402E-10	0.279825132	0.98660716	0.702556403
E4	0.000224439	0.500103186	0.95766454	0.723789124
E5	0.000479208	0.447917894	0.56690436	1.222688041
E6	0.058340545	0.579078949	0.24167282	2.868122204

Finalmente, en el Gráfico 1 se puede apreciar mejor el comportamiento cinético de *Pseudomonas* cuando se alimentan con suero de leche ya que se puede observar el tiempo que le llevó a cada experimento adaptarse al nuevo medio haciendo uso del suero de leche como sustrato (alimento principal), pues comenzando con la fase de latencia o adaptación fue casi imperceptible en E1, E2 y E6, mientras que en E4, E5 fue un poco más notoria y finalmente en E3 fue muy marcada, esto indica que la mejor adaptación del cultivo por el medio se presentó en E1, E2 y E6 ya que se adaptó rápidamente al medio. Ahora bien, en la fase de exponencial quien logra darnos el mayor crecimiento es E2 pues alcanza la mayor absorbancia de los 6 experimentos, por otro lado nuevamente E3 resulta ser el menor productor de células por su poca absorbancia medida.

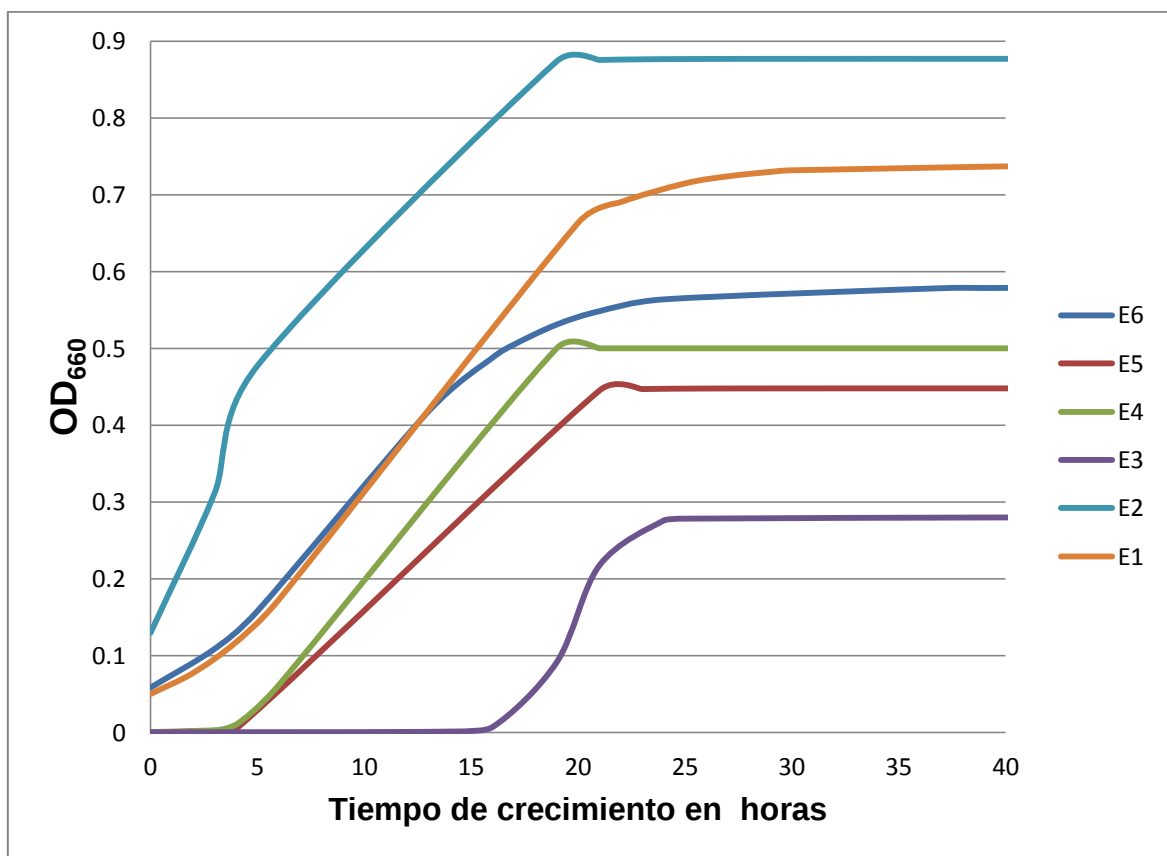


Gráfico 1. Crecimiento bacteriano

3.3 Purga del cultivo cosechado

Después de llegar a la fase estacionaria se purga el reactor para evitar llegar a la fase de muerte. Se tomaron los datos de los volúmenes obtenidos por cada experimento del cultivo cosechado. Después de la centrifugación se anotaron los pesos de la biomasa obtenida en cada experimento. Finalmente se liofilizaron las muestras de biomasa y se pesaron todos estos datos se resumen en la Tabla 10 dependiendo su resultado depende el volumen de reactivo para las dispersiones (sección 2.6).

Tabla 10. Volúmenes y biomاسas

Experimento	Volumen de cultivo cosechado en mL	Biomasa en g
E1	600	3.2661
E2	644	3.9313
E3	725.8	3.3055
E4	726.9	2.4242
E5	726	3.9065
E6	726.5	3.3492

3.4 Pesos finales del PHB obtenido

Finalmente después de haber realizado el proceso de purificación es necesario pesar la cantidad de PHB que se obtuvo en cada uno de los 6 experimentos, se quería hacer por diferencias de pesos pero las charolas pesaban más de 200 g y la balanza analítica no soportaba ese peso, por lo tanto se decidió raspar la mayor cantidad posible de PHB formado en las placas y pesarlo. Se tomaron fotos del material obtenido en las placas antes (ver Figura 26) y después del raspado del material.

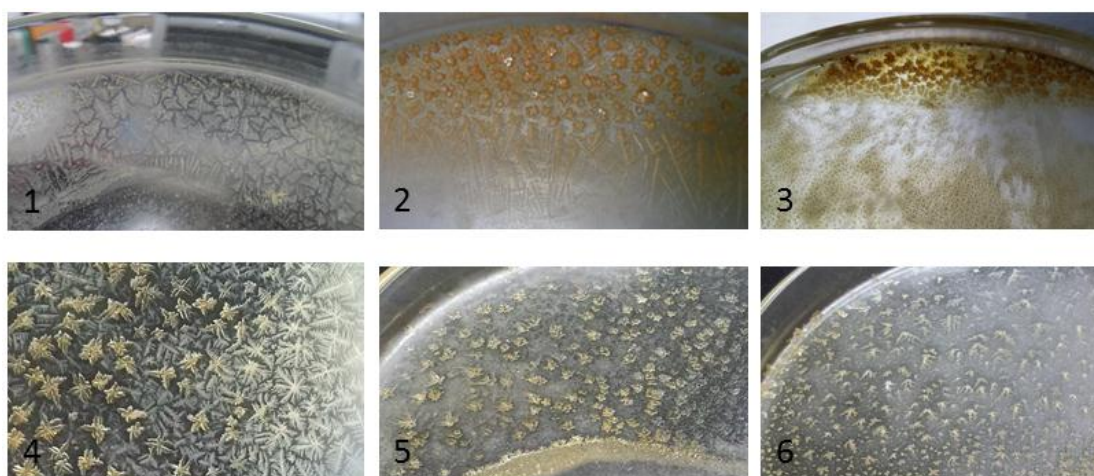


Figura 26. PHB en placa 1-E1, 2-E2, 3-E3, 4-E4, 5-E5 y 6-E6 respectivamente

Finalmente después de raspar todas las placas los resultados de los pesos obtenidos de PHB fueron los siguientes, (Tabla 11) y en todos los casos se obtuvo al final del raspado un polvo de color beige como se aprecia en la Figura 27.

Tabla 11. Pesos de PHB finales

Número de experimento	Peso final de PHB en g
E1	1.6606
E2	1.5357
E3	1.3181
E4	1.1979
E5	1.3748
E6	1.6259



Figura 27. Polvo de PHB

3.5 Resultados de los análisis aplicados a la película formada

Una vez que se obtuvo la película de PHB se logró observar la formación de cristales en todos los experimentos, a estos se les hizo un análisis de la morfología de los cristales por medio de un microscopio óptico y únicamente con el experimento 2 (E2) se aplicó la técnica de SEM. Por otra parte a todos los materiales obtenidos en los 6 experimentos se les hizo un análisis mediante FTIR y finalmente las pruebas de solubilidad. En los siguientes párrafos se hace una descripción más detallada de las técnicas de caracterización aplicadas.

3.5.1 Microscopias

Después de que se llevó a cabo el proceso de purificación en las placas Petri, se secó la película por medio de un ventilador, de esta manera se observó que en la placa se comenzaron a formar una especie de agujas que crecían en forma radial formando esferulitas, muy características de materiales poliméricos, de las cuales se puede apreciar su crecimiento mediante las micrografías tomadas primero en el microscopio óptico y después en el microscopio electrónico de barrido, cabe

mencionar que este fenómeno se presentó en todos los experimentos, y particularmente como se mencionó en el capítulo 2 sección 2.7, en experimento 2, 5 y 6 los cristales eran de un tamaño mayor. A continuación se presentan las micrografías tomadas del microscopio óptico en las que se puede apreciar una morfología en forma de esferulitas.



Figura 28. Morfología de los cristales

Se realizó el análisis mediante la técnica de SEM correspondiente al experimento 2, del cual en las siguientes figuras se muestran algunas de las microfotografías electrónicas obtenidas, en ellas se puede apreciar el origen de las esferulitas es decir el núcleo cristalino del cual parten las lamellas o fibrillas lamellares y la región amorfa. Estas fueron obtenidas con un detector de electrones secundario (SEI) para obtener imágenes de alta resolución, un detector de electrones retrodispersado (BEI) que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie [Sawyer, 1996].

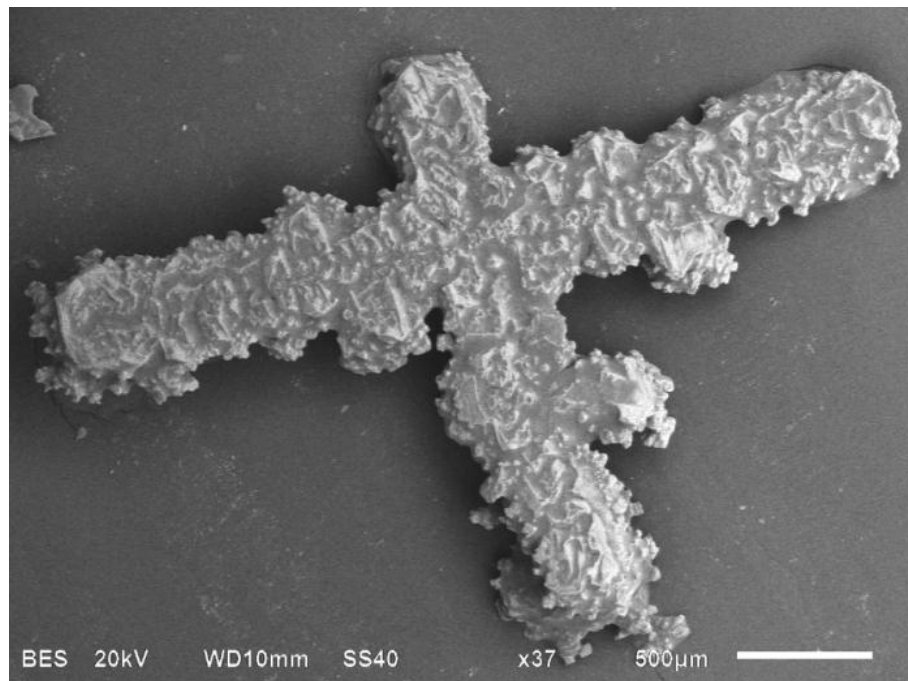


Figura 29. Microfotografía electrónica 1

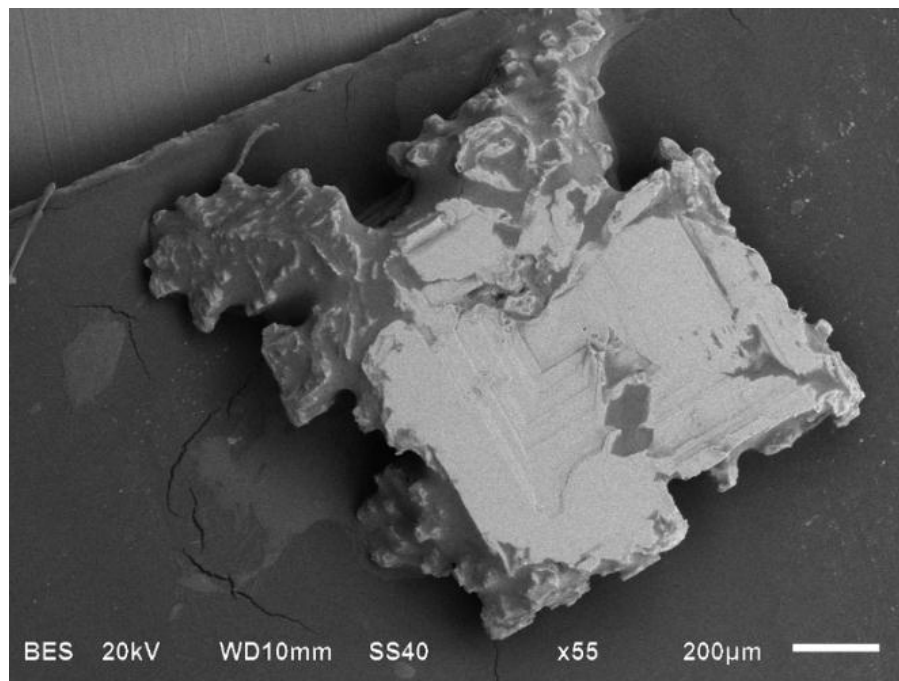


Figura 30. Microfotografía electrónica 2

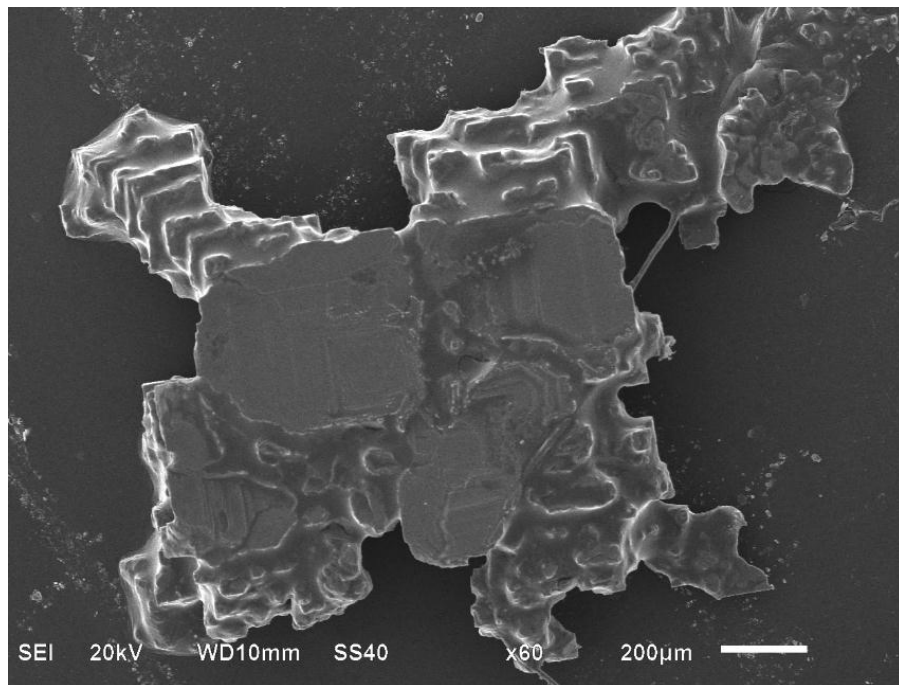


Figura 31. Microfotografía electrónica 3

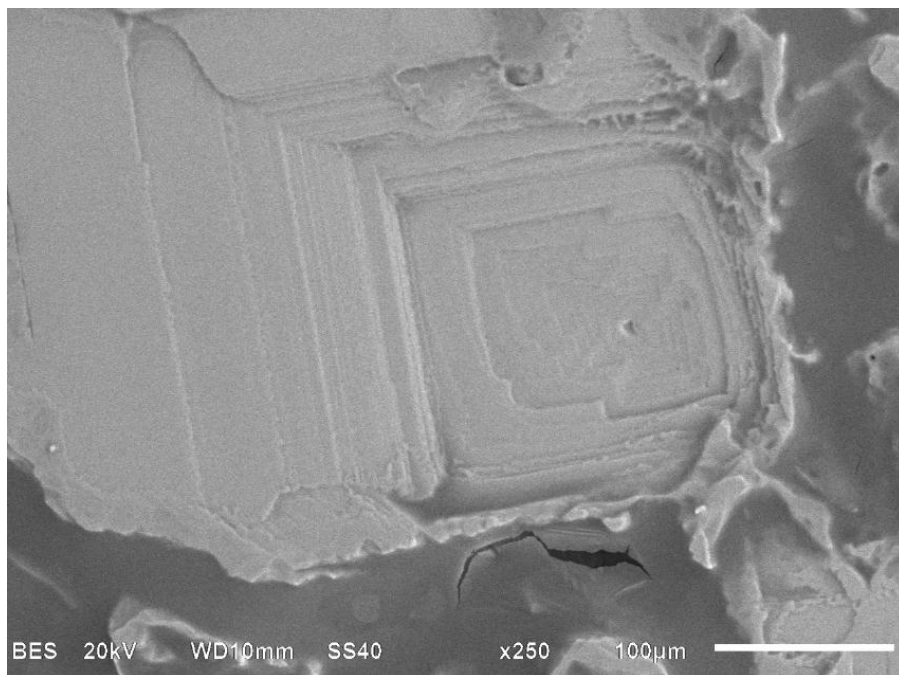


Figura 32. Microfotografía electrónica 4

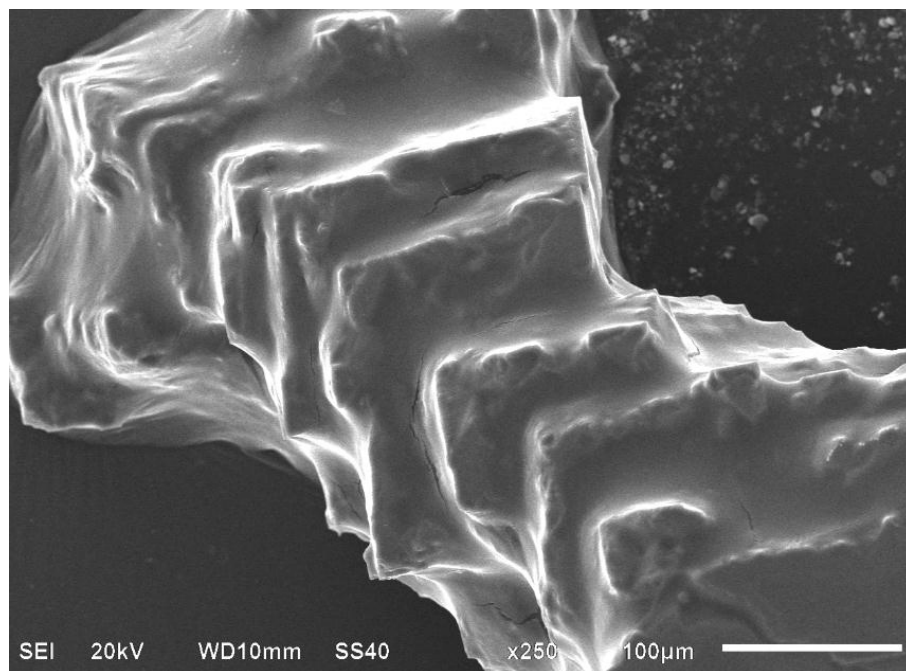


Figura 33. Microfotografía electrónica 5

3.5.2 Análisis del espectro de infrarrojo

De acuerdo al análisis del espectro de infrarrojo realizado en equipo FT-IR marca DIGILAB modelo SCIMITAR en la región del infrarrojo medio de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , se realizó una pastilla de KBr con una cantidad aproximada de 5 mg de muestra seca, se corrió el background con 32 escaneos al igual que la muestra. Para obtener el espectro primero se sometió a un proceso de secado mediante vacío por medio de un compresor, ya que en los análisis de infrarrojo preliminares aparecía una banda ancha en la región de 3200 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} que se atribuyó al exceso de humedad, sin embargo al secar la muestra y volver a correrla en el equipo no disminuyó de manera significativa por lo tanto se piensa que se debe a la presencia abundante de etanol el cual tiene en su molécula al grupo hidroxilo cuya señal se ubica en $3584\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$. Al ser un poliéster el PHB, se busca que existan cadenas carbonadas y de acuerdo a la estructura química proporcionada por Pettinari [2008] sabemos que existe un metilo cuya señal se encuentra ubicada en la región de 2872 cm^{-1} y 2962 cm^{-1} y un metileno que debe encontrarse

en la región de 2853 cm^{-1} y 2926 cm^{-1} , también debe aparecer el grupo carbonilo del éster, éste debe aparecer en la región de $1735\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$, ahora bien, de acuerdo al espectro obtenido (Figura 34) se pueden apreciar efectivamente las bandas del OH , CH_3 y CH_2 sin embargo siempre aparece una banda muy marcada en la región de $1600\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ en las muestras de los 6 experimentos que, de acuerdo a la gráfica Colthup consultada de Shriner [2013], el carbonilo C=O aparece en la región de $1650\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$ y el enlace C-O debe dar una señal en la región de $900\text{ a }1300\text{ cm}^{-1}$ señales que sí aparecen el espectro obtenido, sin embargo en la misma dirección los resultados del estudio de Sha, [2012] muestran un espectro con una banda en la región de 1639 cm^{-1} específicamente que la atribuyen a la presencia de un grupo tioéster, en este proyecto se obtuvo una señal muy parecida en la región de 1654 cm^{-1} , lo cual nos hace pensar que es posible que exista un grupo tioéster, aunque debido a que el solvente que se utilizó para precipitar fue etanol este pudo formar puentes de hidrógeno haciendo que la banda esperada en 1700 cm^{-1} se haya desplazado a la región de 1654 cm^{-1} confirmando que existe la presencia del grupo éster por las señales que dio el espectro en la región de 900 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} . También observó que aparece un hombrito más pronunciado que en los demás y únicamente en el espectro de E5 (rojo) en la región de 1721 cm^{-1} que pudiera ser debido a la presencia del carbonilo aunque es muy pequeño para esta consideración y quizá debido a esta aparición sea descartado el desplazamiento por la formación de puentes de hidrógeno.

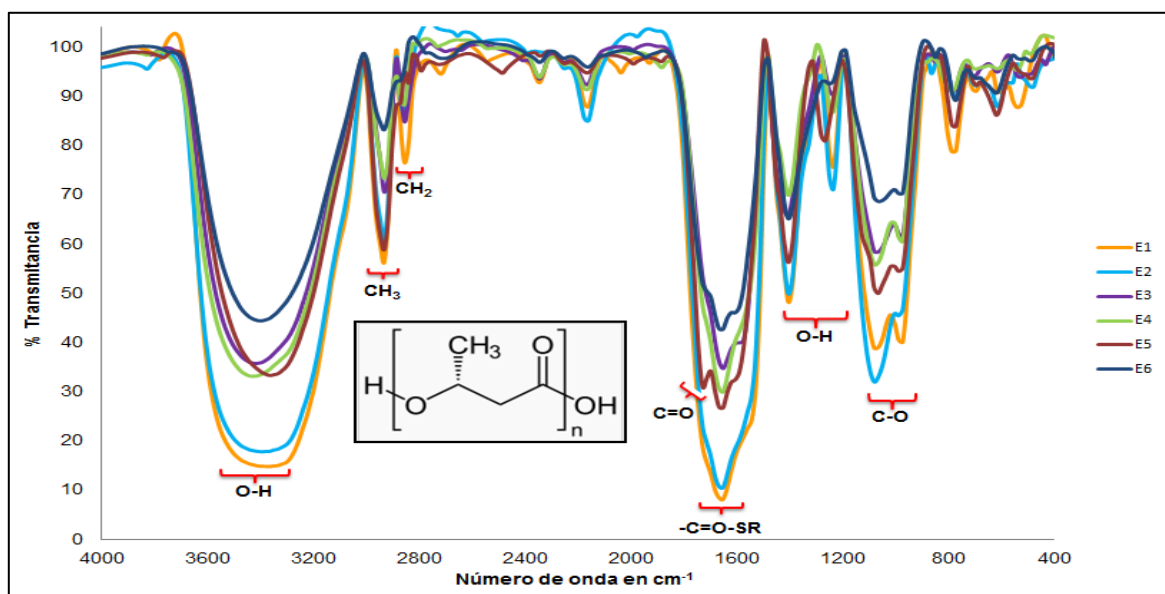


Figura 34. Espectro de infrarrojo de todos los experimentos

3.5.3 Pruebas de solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad con algunos solventes polares y no polares, utilizando aproximadamente 10 mg de muestra y un volumen de 5 mL de solvente esta prueba se realizó de mediante la técnica utilizada en otro proyecto en el que se determinó esta prueba. Se realizó la prueba en tubos de ensayo como muestra la Figura 35.

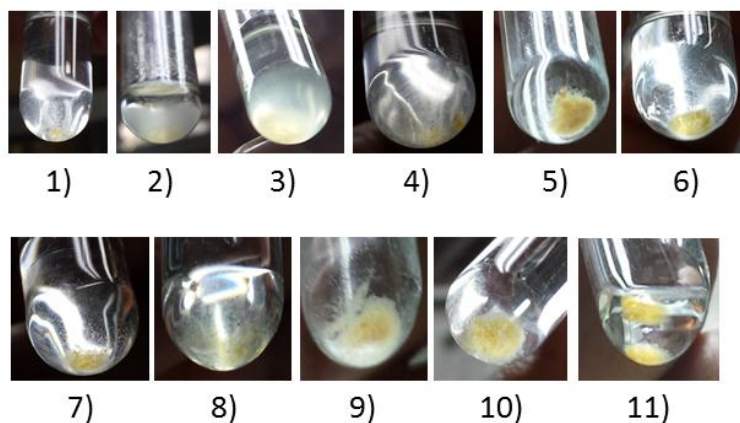


Figura 35. Pruebas de solubilidad. 1) Metanol, 2) Alcohol bencílico, 3) Agua, 4) Acetona, 5) Hexano, 6) Cloroformo, 7) Acetato de etilo, 8) Dimetilsulfóxido, 9) Diclorometano, 10) Etanol, 11) Benceno.

Se observó en Figura 35 que las muestras no fueron solubles en solventes no polares y que los resultados fueron más favorables en los solventes polares sobre todo en agua que fue en el solvente que más logró disolverse pero no completamente incluso cuando se dejó la muestra dos días en la campana de extracción. El resumen de resultados se puede ver en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de pruebas de solubilidad

Solvente usado	Resultado de la prueba
Acetona	No soluble
Benceno	No soluble
Hexano	No soluble
Cloroformo	No soluble
Acetato de etilo	No soluble
Dimetil sulfóxido	No soluble
Diclorometano	No soluble
Etanol	Parcialmente soluble
Agua	Mayormente soluble
Alcohol bencílico	Parcialmente soluble
Metanol	Parcialmente soluble
Ácido acético	No soluble
Ácido clorhídrico	No soluble
Hipoclorito de sodio	Reaccionó exotérmicamente y solubilizó completamente

Las pruebas de solubilidad nos ayudan a identificar el grado de polaridad de un compuesto y son de gran utilidad para continuar con más análisis espectrales como son resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de líquidos (HPLC), entre otros análisis espectrales. De acuerdo a lo descripto por Shriner [2013] también se pueden determinar los solventes que se pueden ocupar para cristalizar y para llevar a cabo reacciones químicas.

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo realizado en este proyecto, se puede concluir lo siguiente:

Se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza por lo tanto la hipótesis nula que se planteó en este trabajo.

Se logró optimizar el método de obtención de PHB en comparación con un método anterior.

Se logró hacer el escalamiento a un volumen de masa reactante mayor en comparación con el volumen de un trabajo anterior en el que se ocupaban 10 mL, ya que en nuestro caso el volumen de masa reactante fue de 800 mL, obteniendo buenos resultados.

Se logró hacer un ajuste de las curvas de crecimiento por medio del modelo de Monod, con el cual se comprobó que el suero de leche funciona bien como fuente de carbono utilizada por las especies *Pseudomonas aeruginosa 1*, *Pseudomonas aeruginosa 2*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* ya que se pudo obtener un buen crecimiento en la mayoría de las curvas presentadas.

Se determinó que las condiciones de E2, es decir: 70% la concentración de suero de leche con glucosa, 37 °C, 350 r.p.m. y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa 1*, resultaron ser las más favorables pues el crecimiento bacteriano fue mayor y su adaptación fue muy rápida. Mientras que las condiciones menos favorables fueron las de E4 por su poca producción de biomasa, estas condiciones fueron: 70% concentración de suero con glucosa, 37 °C, agitación 350 r.p.m., con *Pseudomonas fluorescens*.

Se logró extraer PHB mediante dispersiones de hipoclorito de sodio-cloroformo, así como también se purificó mediante simple y doble concentración en rotavapor.

Se obtuvo la formación de cristales los cuales se lograron caracterizar mediante análisis del espectro de FTIR, logrando identificar los grupos funcionales de interés identificados en el monómero.

Fue posible caracterizar los materiales cristalinos mediante las micrografías ópticas determinando que se trataba de esferulitas. Y por medio de las micrografías electrónicas se logró ver el origen de las esferulitas y sus fibrillas lamellares.

Finalmente se pueden hacer las siguientes recomendaciones:

Se recomienda realizar un escalamiento aún mayor de este proyecto, realizar un análisis más profundo con el fin de obtener más datos del material, y desde luego considerar la aplicación de estos nuevos materiales.

APÉNDICE A CURVAS DE CRECIMIENTO

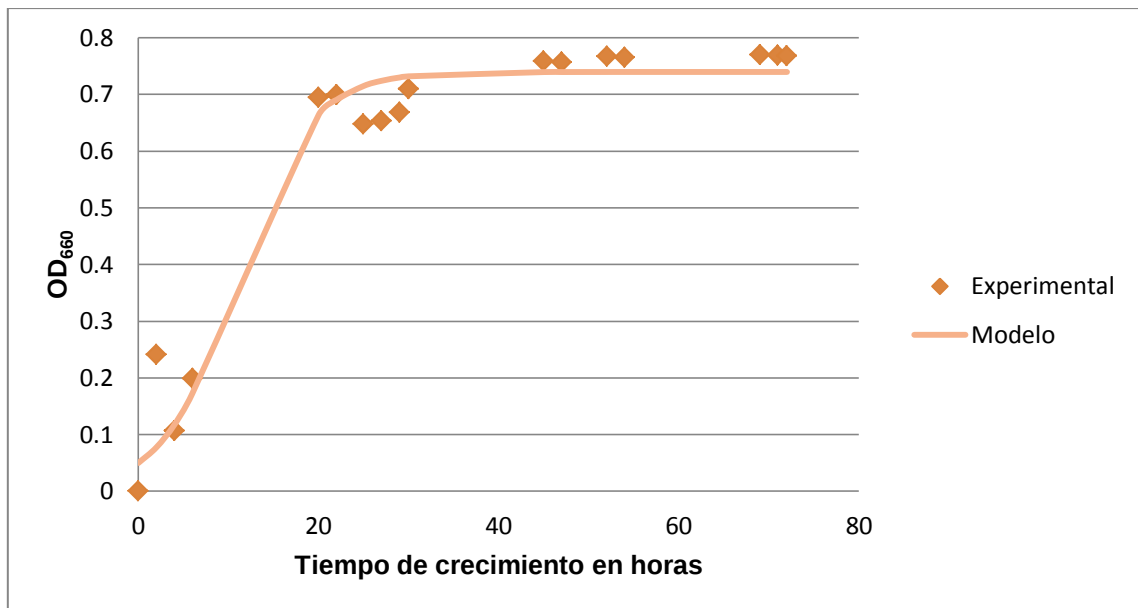


Gráfico 2. Experimento 1

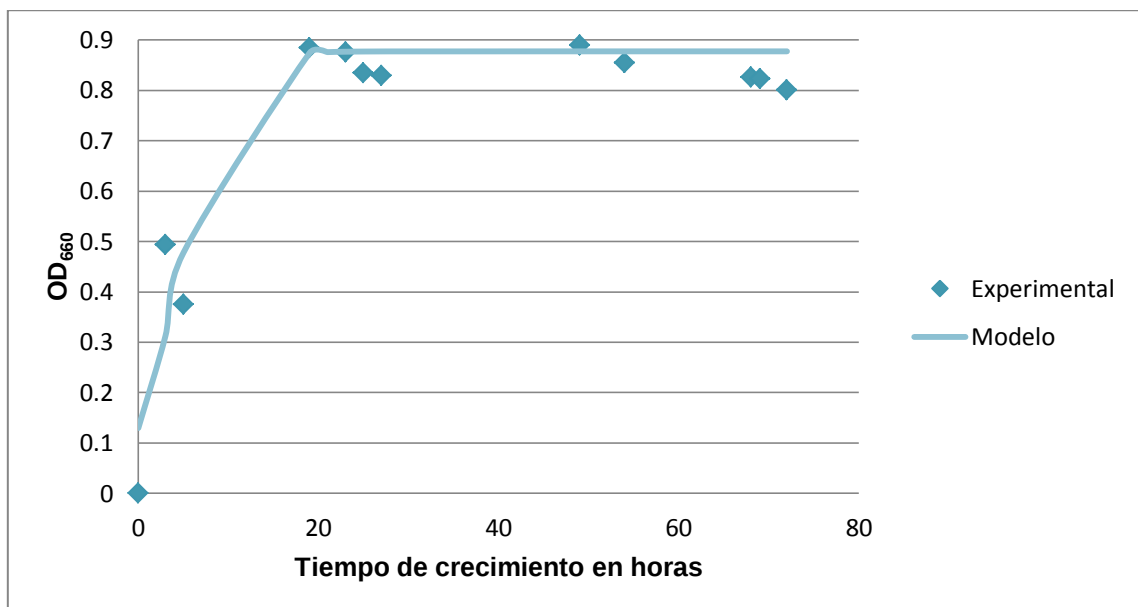


Gráfico 3. Experimento 2

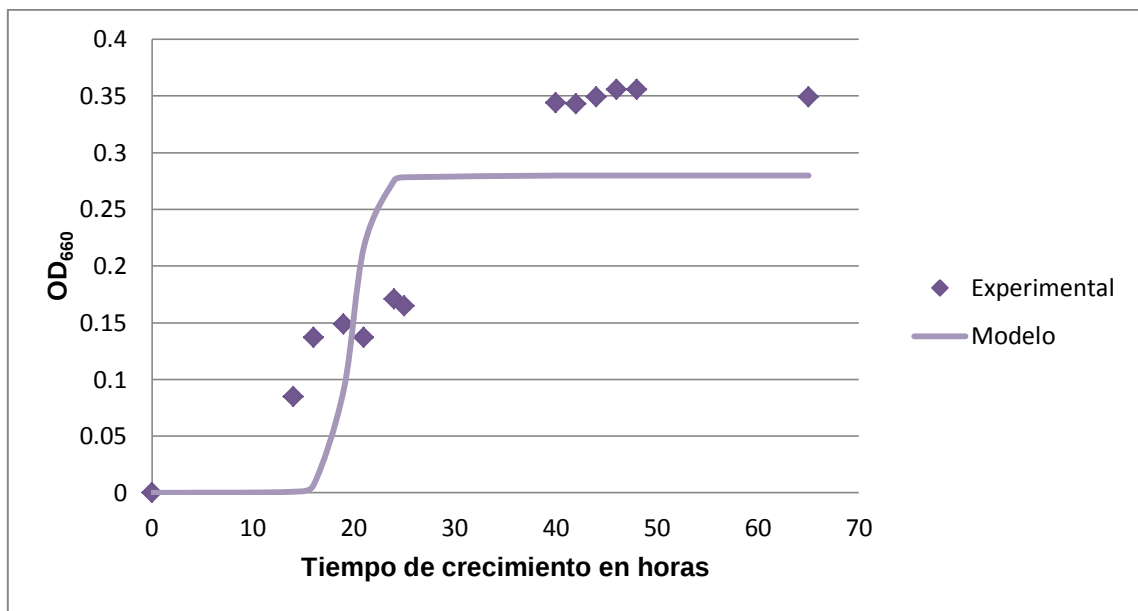


Gráfico 4. Experimento 3

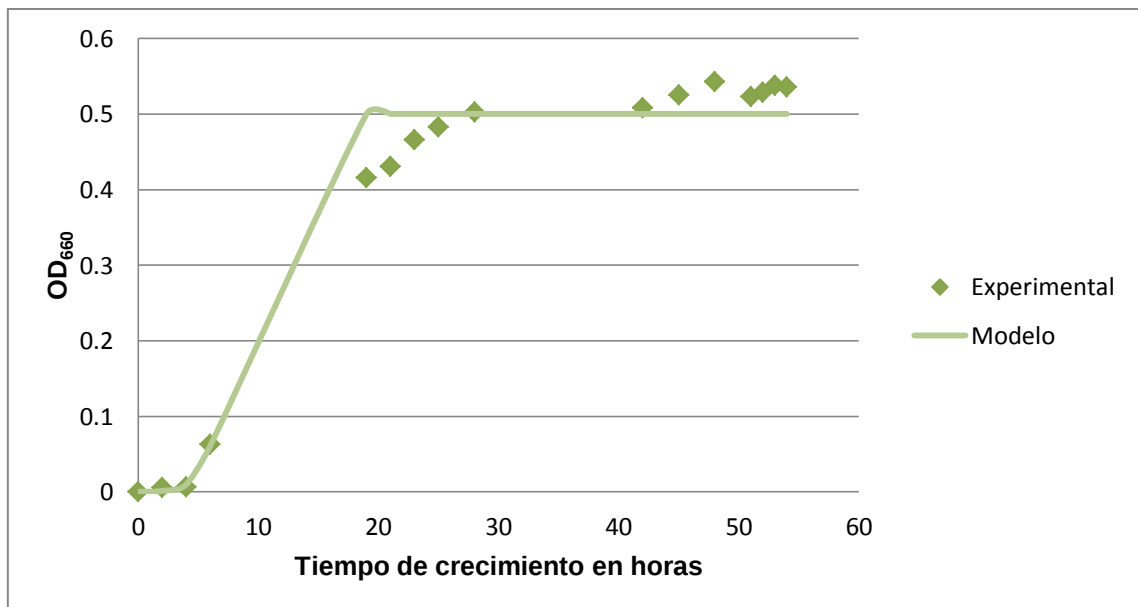


Gráfico 5. Experimento 4

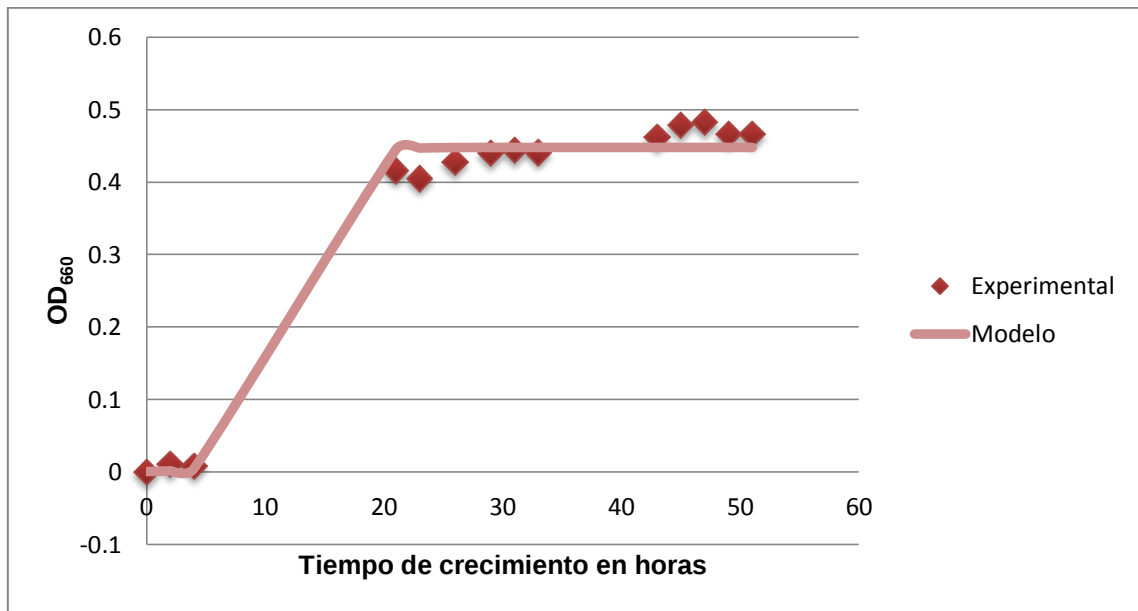


Gráfico 6. Experimento 5

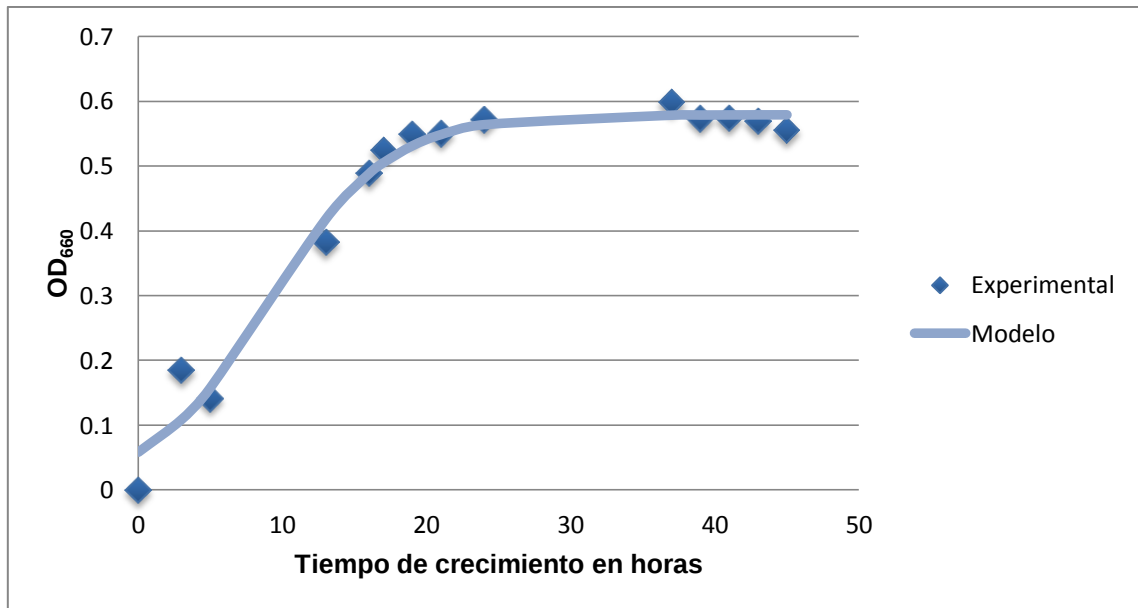


Gráfico 7. Experimento 6

APÉNDICE B ESPECTROS DE FTIR

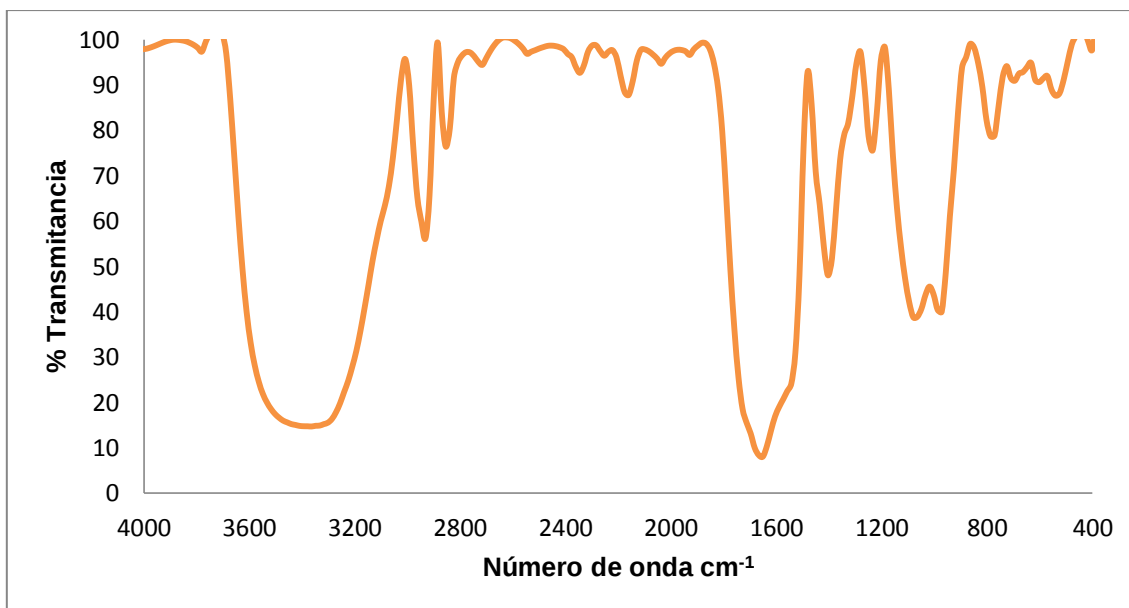


Gráfico 8. Experimento 1

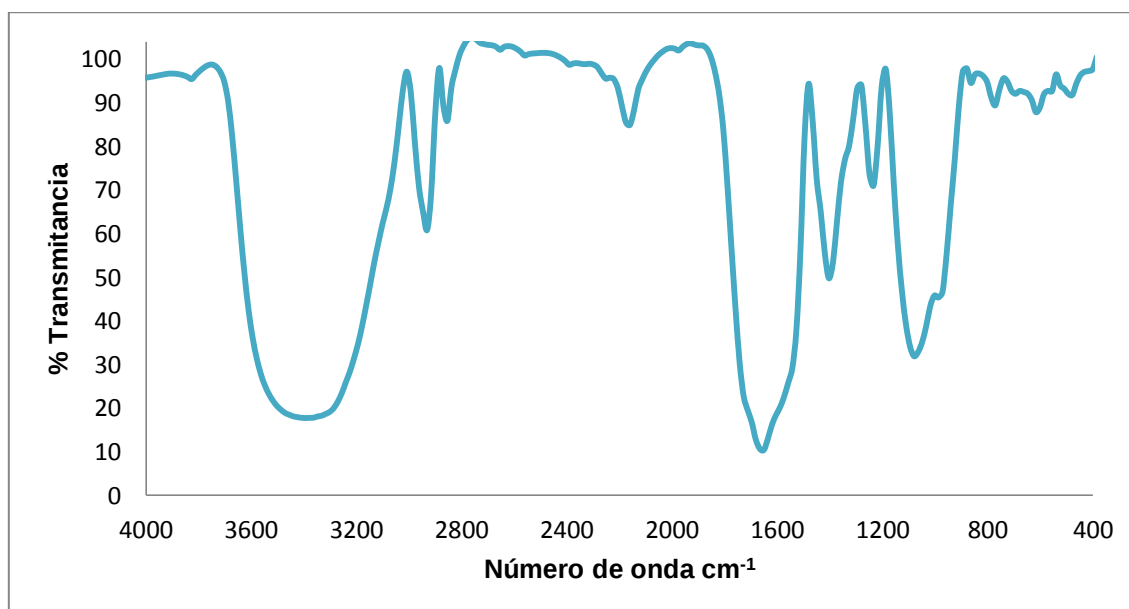


Gráfico 9. Experimento 2

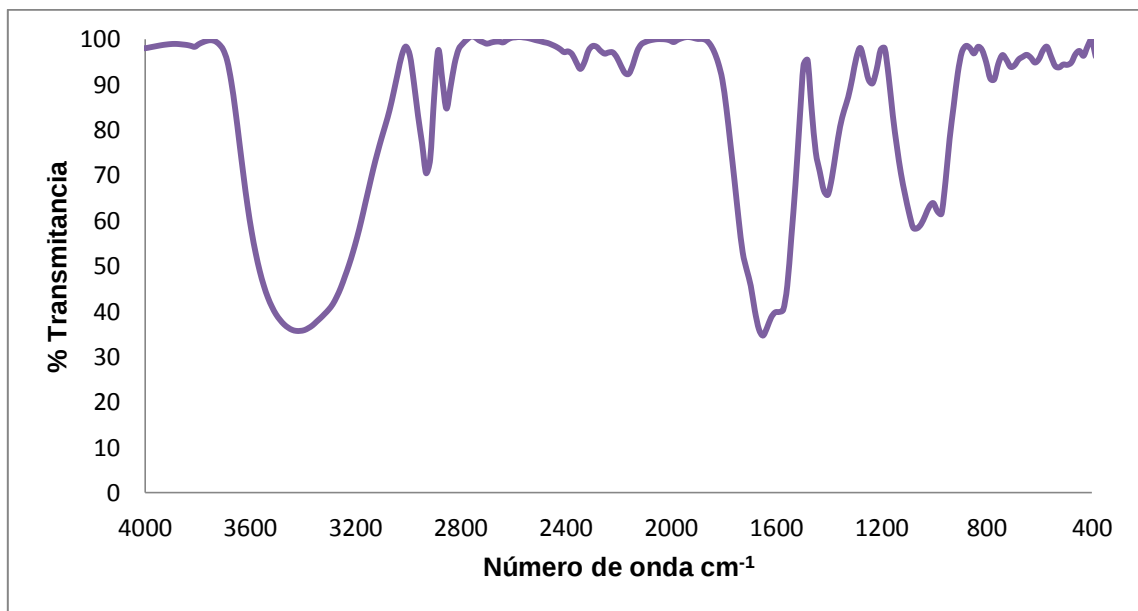


Gráfico 10. Experimento 3

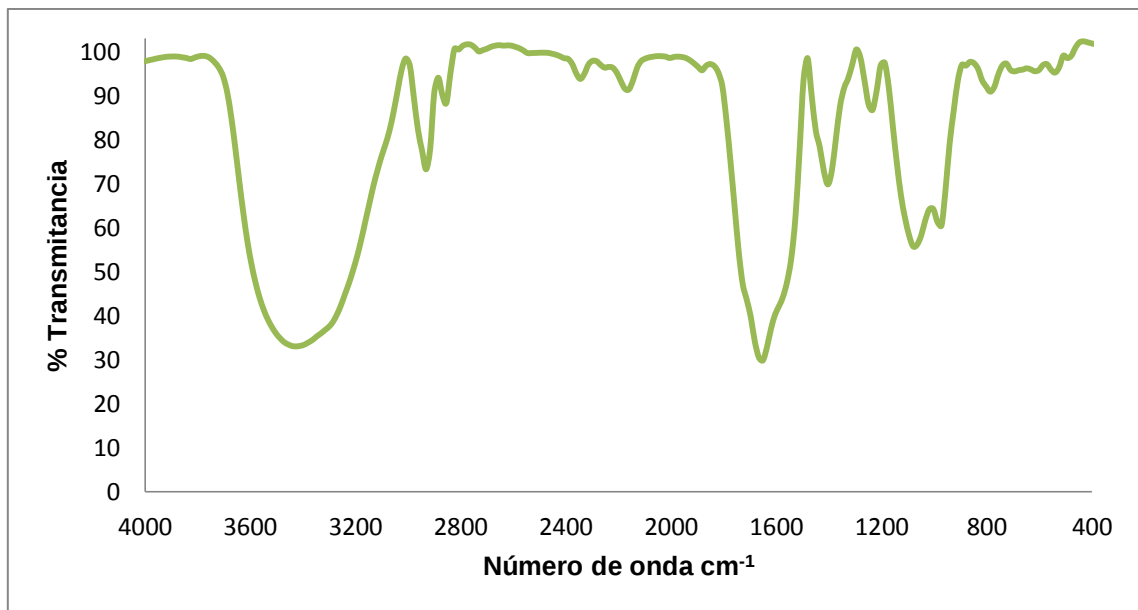


Gráfico 11. Experimento 4

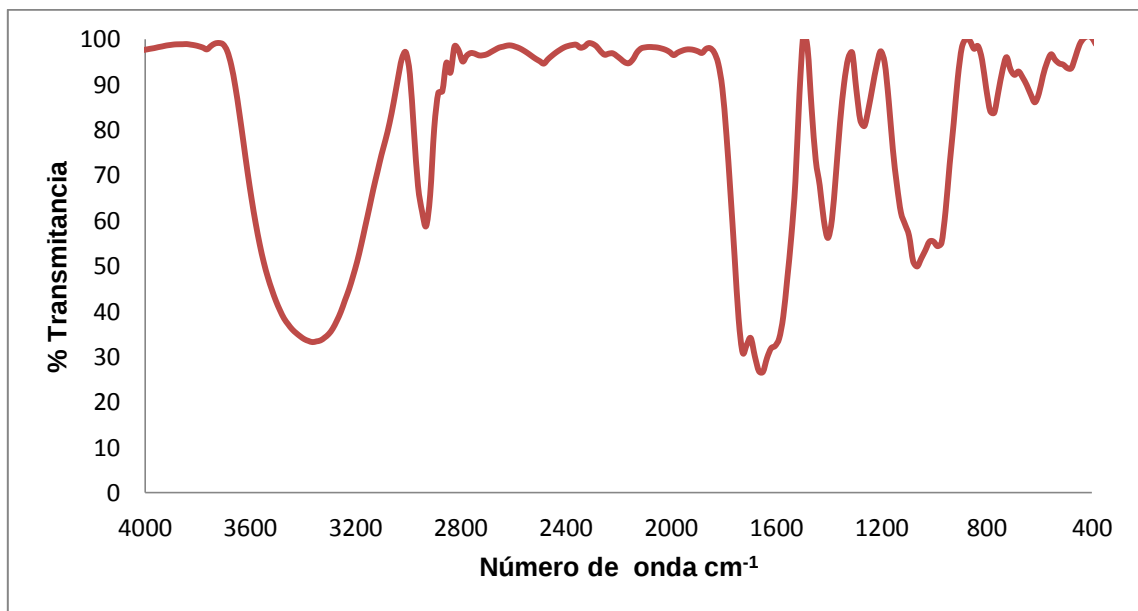


Gráfico 12. Experimento 5

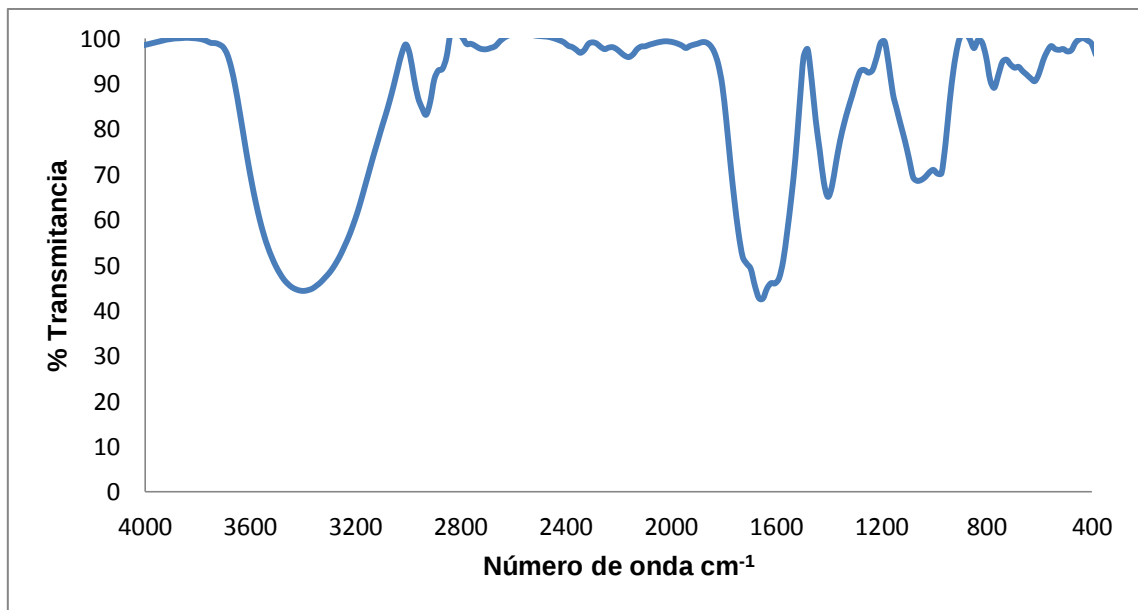


Gráfico 13. Experimento 6

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Askeland Donald R., Phulé, Pradeep P. [2008]. Ciencia e ingeniería de los materiales. Primera edición. México. Cengage Learning.
- [2] Barbosa M., Espinosa-Hernández A., Malagón Romero D. Moreno Sarmiento N. [2005]. Producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. Universitas Scientiarum. Pontificia Universidad Javeriana, 10 (1), 45-54.
- [3] Bello, D., Zinn M., Brandl H., Otero M. A. [2008]. Aislamiento y caracterización de Poli-B-hidroxibutirato obtenido por vía fermentativa a partir de *Bacillus megaterium*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 42 (3), 101-105.
- [4] Mirac Y., Soran H., Beyatli Y. [2005]. Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21, 565-566.
- [5] Cassimeris L., Lingappa V., Plopper G. [2012]. Lewin Células. Segunda edición. China. Mc Graw Hill.
- [6] Chavira Martínez E. [2013]. Biomateriales. Saberes y ciencias. La jornada de Oriente. 2 (19), 4-9.
- [7] Desrosier Norman W. [2006]. Conservación de alimentos. 32 Reimpresión. México. Compañía editorial continental.
- [8] Duffó Gustavo. [2005]. Biomateriales: una mejor calidad de vida. Primera edición. Argentina. Eudeba.
- [9] Dunn Irving J., Heinzle Elmar, Ingham John, Přenosil Jiří E. [2003]. Biological Reaction Engineering Dynamic Modelling Fundamentals with simulation Examples. 2^a edición. Federal Republic of Germany. Wiley-VCH.
- [10] Ecoembalajes de España S.A (ECOEMBES). [2007]. Disponible en: <http://www.ecoembes.com/es/documentos-e-informacion/estudios-idi/Documents/PI%C3%A1sticos/Informe%20Preliminar.pdf>
- [11] Ellner Richard. [2000]. Microbiología de la leche y de los productos lácteos. Madrid España. Diaz de Santos.

- [12] Rojas de Gáscue B., Manosalva J.L., Liendo G., Nonato R., Rosell C. [2000]. Caracterización a partir de la microscopía óptica de luz polarizada, las propiedades térmicas y la espectroscopía del termoplástico biodegradable poli(hidroxibutirato). *Revista latinoamericana de metalurgia y materiales*, 20 (2), 47-53.
- [##] Yu J. Porter Michael M. [2011]. Crystallization kinetics of poly(3-hydroxybutyrate) granules in different environmental conditions. *Journal of biomaterials and nanobiotechnology*, (2), 301-310.
- [##] Franco Y., Gómez G., Núñez R., Martínez J. [2009]. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxibutirato por *Rhizobium tropici*. *Revista CENIC ciencias biológicas*, 40 (1), 53-57.
- [##] Lee Sang Y., Park S. J., Ahn W. S. [2000]. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and environmental microbiology*, 66 (8), 3624-3627.
- [##] Font de Valdez G., Mozzi F., Hébert E. M., Pescuma M., [2008]. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Elsevier. Food microbiology*, 25, 442-451.
- [10] Fogler, H. Scott. [2008]. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. Cuarta edición. México. Pearson Prentice Hall.
- [11] He Wennan, Weidong Tian, Zhang Guang, Chen Guo-Qiang, Zhang Zengming. [1998]. Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *Fems microbiology letters*. Elsevier 169, 45-49.
- [12] Jawetz Ernest, Melnick Joseph L. [2011] Manual de microbiología médica,. 25^a edición. Pp 245. Mc Graw Hill
- [13] Jones, D. M. [1997]. Procesamiento de plásticos, Inyección, moldeo, hule, PVC. México: Limusa noriega editores. Pp. 13-21.
- [14] MacFaddin, J. F. [2003]. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Buenos Aires, Argentina.: Editorial Médica Panamericana.

- [15] Madigan Michael T., M. J. [2009]. Biología de los microorganismos. PEARSON Addison Wesley. .
- [16] Martínez Morales Luis J., Castañeda Lucio Miguel, Molina Dalia. [2002] Producción bacteriana de Polihidroxialcanoatos (PHAs). Temas de actualidad en microbiología, ambiente y salud. Pp. 71-94.
- [17] Meyer Marco R., Kirchner Salinas F.R., Usami Olmos C., Johan D. Berlijn, Medina Figueroa J., Orozco Luna F. [2007]. Manuales para educación agropecuaria. Elaboración de productos lácteos. Área: Industrias rurales 3ra edición. Trillas.
- [18] Moreno Sarmiento N., Malagón Romero D., Cortázar J., Espinosa-Hernández A. [2006]. Recuperación de poli- β -hidroxihexanoato-co-octanoato sintetizado por *Pseudomonas putida* mediante el uso de dispersiones hipoclorito-cloroformo. Universitas Scientiarum. Pontificia Universidad JAVERIANA, 11 (1), 41-48.
- [19] Pettinari J. M., López N. I., Ruíz A. J., De Almeida A. [2004]. Bioplásticos: una alternativa ecológica. Química Viva 3 (3), 122-133.
- [20]
- [21] Renneberg Reinhard. [2009]. Biotecnología para principiantes. Reverté. Primera reimpresión.
- [22] Roskoski, J Robert. [1997]. Bioquímica. México: McGraw-Hill Interamericana.
- [23] Sawyer Linda C., Grubb David T. [1996]. Polymer Microscopy. Great Britain. Chapman & Hall.
- [24] Seymour Raimond B., E. C. [2002]. Introducción a la química de los polímeros. Reverté, S.A.
- [25] Sha K R. [2012]. FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by novel *Bacillus* sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India. J Biochem Tech. 3 (4): 380-383.
- [26] Shriner Ralph L. [2013]. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Segunda edición. Limusa Wiley.

- [27] Skoog Douglas A., James Holler F., A. Nieman Timothy. **[2001]**. Principios de análisis instrumental. Mc Graw Hill.
- [28] Steinbüchel Alexander, Y. D. **[2002]**. Biopolymers. Biology, chemistry, biotechnology, applications. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH.
- [29] Sukenik Chaim N. Aped Inbal, Mazuz Yacov. **[2012]**. Variations in the structure and reactivity of thioester functionalized self-assembled monolayers and their use for controlled surface modification. Beilstein Journal of nanotechnology. 3, 213–220