



## PRODUCCIÓN DE POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO (PHB) POR *Ralstonia eutropha* ATCC 17697

Barbosa Marcela<sup>1</sup>, Espinosa Hernández Armando<sup>1</sup>, Malagón Romero Dionisio<sup>2</sup>,  
Moreno Sarmiento Nubia<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería.

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología.

Universidad Nacional de Colombia. Colombia. A.A 14490, Bogotá D.C.

ncmorenos@unal.edu.co

### RESUMEN

*Ralstonia eutropha* es la bacteria más utilizada en la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) por su capacidad de acumular polímero hasta en un 80% de su peso seco. En el presente trabajo se realizaron fermentaciones por lote alimentado en dos etapas a escala 3 litros usando tres concentraciones de fructosa (5, 10 y 15 g/l). En la primera etapa, manteniendo constante la relación carbono-nitrógeno en 6.85 g C/ g N, se buscó obtener una alta concentración celular; en la segunda etapa las células obtenidas se limitaron en la fuente de nitrógeno para permitir la acumulación del biopolímero. La mejor concentración para producir el material es 5 g/l en la cual se obtuvo un porcentaje de acumulación del 66.2%, una velocidad de crecimiento específico inicial de 0.5171 h<sup>-1</sup> y una productividad de 0.1245 g PHB/ l h.

**Palabras claves:** PHB, *Ralstonia eutropha*, lote alimentado, biopolímeros, fermentación.

### ABSTRACT

*Ralstonia eutropha* is the most frequently used bacterium in producing poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PBH), due to its ability to accumulate polymer up to 80% (of its dry weight) w/w. In this project, three liter batch fermentations were done in two stages per batch, using fed-batch fermentation, with 3 different initial concentrations of fructose (5, 10 and 15 g/l). In the first stage, the carbon-nitrogen ratio was maintained constant at 6.85 g C/ g N, in order to obtain a high final cell concentration. In the second stage, the nitrogen source for the cells was limited to allow biopolymer accumulation. The best concentration for producing the material was 5 g/l of initial fructose concentration, from which an accumulation of 66.2% of dry cell weight was obtained, with an initial specific growth rate of 0.5171 h<sup>-1</sup>, and a 0.1245 g PHB/ l h productivity.

**Key words:** PHB, *Ralstonia eutropha*, fed-batch fermentation, biopolymers, fermentation.

### INTRODUCCIÓN

Los poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos (PHAs) son una serie de poliésteres sintetizados por algunos géneros bacterianos como material de reserva, cuando el medio de cultivo se encuentra desbalanceado con limitación

en nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio y/o oxígeno y con exceso de fuente de carbono (Kim *et al.*, 1994; Lee, 1996b; Madison y Huisman, 1999). Son considerados fuertes candidatos para el reemplazo de los polímeros de origen petroquímico, ya que siendo sintetizados por microorganismos a

partir de sustratos agrícolas, tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias, en hábitats tan diversos como suelo, mar, aguas estancadas o aguas residuales (Lee, 1996b).

Aunque se ha detectado la acumulación de PHAs en cerca de 300 especies bacterianas el porcentaje de acumulación en muchas de ellas es muy bajo por lo cual se rechazan ante la imposibilidad de industrializar el proceso. Sin embargo, especies como *Ralstonia eutropha* (antes *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* recombinante y *Azotobacter vinelandii* han sido investigadas ampliamente. El microorganismo más investigado ha sido *R. eutropha* por su capacidad de acumular grandes cantidades de PHAs del tipo poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), en un porcentaje cercano al 80% del peso seco de la bacteria, en un medio simple a partir de fuentes de carbono económicas tales como glucosa, fructosa y residuos de la industria oleica (Kim *et al.*, 1994; Lee, 1996b). La mayoría de estos trabajos de investigación utilizan cepas mutantes de *R. eutropha* capaces de crecer sobre glucosa. Sin embargo, la cepa nativa crece en fructosa, por lo cual es necesario establecer las condiciones para la acumulación del polímero.

Para la producción del polímero por *R. eutropha*, la estrategia de fermentación más empleada es el cultivo por lote alimentado en el cual las células crecen hasta una determinada concentración sin limitación de nutrientes, luego un nutriente esencial es limitado para permitir la síntesis de PHAs. Durante esta etapa, la concentración de biomasa permanece constante presentándose acumulación de polímero (Lee, 1996a; Madison y Huisman, 1999).

Bajo el título de PHAs se conocen actualmente más de 90 polímeros. De todos ellos,

el más ampliamente estudiado es el PHB, el cual es un homopolímero cuyas unidades monoméricas están todas en la configuración D(-) debido a la estereoespecificidad de las enzimas involucradas en la síntesis (Lee, 1996a). Sin embargo, es un polímero altamente cristalino (55-80%), lo cual hace que sea un material excesivamente frágil (Madison y Huisman, 1999). La temperatura de transición vítrea y de fusión son 5 y 175 °C, respectivamente.

La más importante de las aplicaciones del PHB es como material para aplicaciones biomédicas tales como filamentos de suturas, portadores de drogas y generación de constructos para el crecimiento celular debido a que resulta biocompatible (Poirier *et al.*, 1995; Gogolewski *et al.*, 1993). Es particularmente importante el hecho que el producto de la degradación del PHB, es decir D(-)-3-hidroxibutirato, es un metabolito intermedio común presente en las células animales (Lee, 1996a). Se han detectado también cantidades relativamente grandes en plasma sanguíneo humano, lo cual reafirma su biocompatibilidad (Lee, 1996a).

En este trabajo se establecieron las condiciones para la acumulación y recuperación de PHB por *R. eutropha* ATCC 17697, sobre fructosa comercial como fuente de carbono a escala 3 litros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

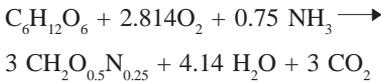
**Microorganismo.** Se utilizó la cepa silvestre *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. La cepa se conservó liofilizada y almacenada a 4°C. El liofilizado se reactivó mediante cultivo en 50ml de caldo nutritivo durante 24 horas en agitador orbital a 200 r.p.m y 30°C. Luego se pasó al medio TFY (Triptona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, fructosa 1g/l y fosfato ácido de potasio 1 g/l); el pH se ajustó a 7.0. El cultivo se dejó

durante 24 horas en agitador orbital a 200 r.p.m y 30°C.

Al finalizar este tiempo se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 15 minutos para recuperar la biomasa. Después de desechar el sobrenadante la biomasa fue resuspendida en 30ml de medio TFY. Se prepararon crioviales agregando 1ml de esta solución y 0,5ml de glicerol (agente crioprotector), los cuales se mantuvieron congelados a -70°C.

**Medios de cultivo.** El medio de cultivo fue fructosa comercial 10 g/l, sulfato de amonio 2.75 g/l, fosfato diácido de potasio 2.0 g/l, fosfato monobásico de sodio 1.6 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado 0.5 g/l y solución de microelementos 2 ml/l.

Para el medio de cultivo del fermentador se realizó el balance de materiales siguiendo la metodología propuesta por Duarte (1995)



Con base en esta ecuación se estableció la relación carbono/nitrógeno en 6.85 g C/g N para no limitar el crecimiento celular. Manteniendo esta relación se examinaron 3 concentraciones de fructosa iniciales (5, 10 y 15 g/l) todas ellas con su respectivo duplicado bajo un diseño completamente al azar (DCA). Las concentraciones de fructosa y sulfato de amonio examinadas se presentan en la Tabla 1.

El medio del fermentador contiene fosfato diácido de potasio 4.3 g/l, fosfato monobásico de sodio 1.6 g/l, sulfato de magnesio heptahidratado 1.2 g/l, ácido cítrico 1.7 g/l, solución de microelementos 10 ml/l. La fructosa y el sulfato de amonio se emplearon en las concentraciones establecidas para cada ensayo.

La solución de microelementos contiene

FeSO<sub>4</sub> 2 g/l, MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O 0.03 g/l, CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O 2 g/l, CuCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O 0.01 g/l, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.1 g/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.3 g/l, CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, NiCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O 0.02 g/l y Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O 0.03 g/l en solución 0.1 N de HCl.

**Estrategia de fermentación.** Para iniciar la fermentación se tomó como semilla uno de los crioviales preparados como se describió anteriormente. El criovial se pasó al inóculo (10% del volumen del fermentador), el cual permaneció durante 24 horas a 200 rpm y 30°C en agitador orbital. Para la fermentación se usó un fermentador SOVILAB con un volumen de operación de 3 l manteniendo la temperatura en 30°C y agitación 300 rpm. El pH se mantuvo entre 6.7 y 7.0 mediante la adición de solución de NaOH 3 N. Las fermentaciones se llevaron a cabo por lote alimentado en dos etapas, en la primera se dejó crecer la biomasa sin limitación y una

**TABLA 1. Concentraciones de fructosa y sulfato de amonio examinadas**

Fructosa (g/l)	Sulfato de amonio (g/l)
5	1.375
10	2.750
15	4.125

vez agotada la fuente de carbono, se adicionó al fermentador un pulso de fructosa que restableciera la concentración inicial. La fermentación se detuvo cuando la fructosa se consumió totalmente o su concentración no cambió en el tiempo. Para garantizar la pureza del cultivo se realizó microscopía usando tinción de Gram y para observar acumulación de polímero se usó tinción con sudán negro (Schlegel *et al.*, 1970).

#### **Determinación de parámetros cinéticos.**

El seguimiento de la fermentación se realizó mediante la medición de la concentración de biomasa y de fructosa. La biomasa se midió indirectamente mediante la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro VARIAN DSM 100 teniendo una curva patrón construida para *R. eutropha* que relaciona absorbancia y peso seco de la biomasa, usando como blanco solución salina a una longitud de onda de 600 nm (Barbosa, 2002).

La concentración de fructosa se determinó por el método de DNS (ácido dinitrosalicílico) usando como blanco agua destilada a 540nm de longitud de onda (Miller, 1959).

**Recuperación del polímero.** Una vez finalizada la fermentación, se centrifugó el caldo de fermentación durante 45 minutos a 5.000 r.p.m. en centrífuga SORVALL. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en solución de TRIS-HCl 0.5M de pH 7.0. Se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó en un equipo LABCONCO modelo 77500-00 durante 72 horas.

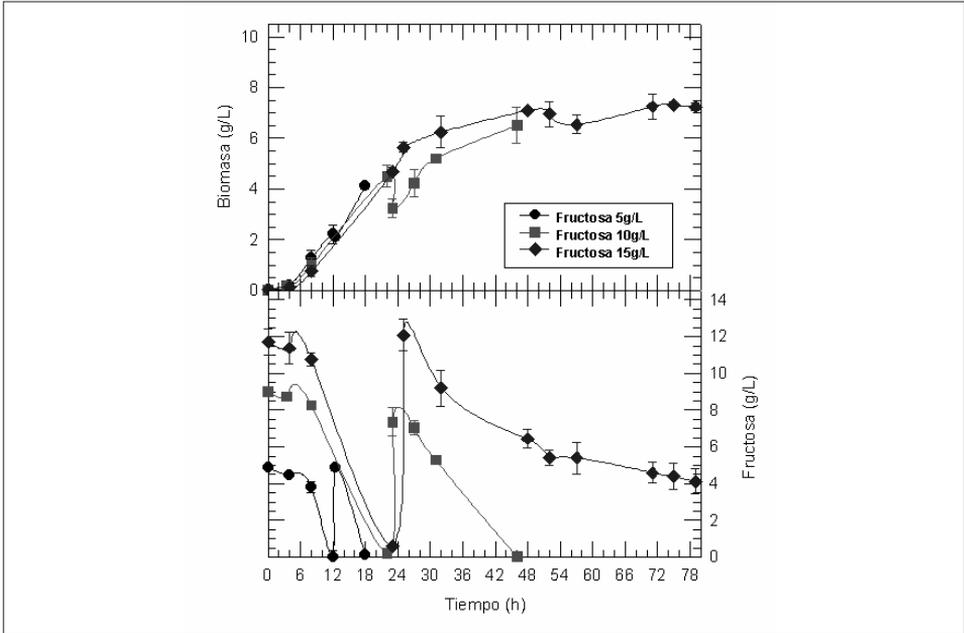
La recuperación del polímero se realizó mediante dispersiones de hipoclorito-cloroformo siguiendo la metodología empleada por Cortázar y Malagón (2001): por cada gramo de biomasa liofilizada se usaron 100ml de dispersión de hipoclorito de sodio

comercial al 5 % p/v y cloroformo G.R. (50% v/v). Se dejó a temperatura ambiente en agitación constante durante 1 hora, transcurrido este tiempo se dejó decantar y se recuperó la fase orgánica. Esta fase se concentró en rotavapor a  $70^{\circ}\text{C}$ , sin usar vacío, hasta alcanzar un volumen cercano a 20-40 ml. El polímero se precipitó en metanol frío manteniendo una relación 1/10 en volumen de cloroformo a metanol, se dejó precipitar durante 8 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se filtró al vacío y se desechó el sobrenadante, el polímero obtenido se dejó secar hasta alcanzar peso constante.

**Caracterización del polímero.** Para determinar el tipo de polímero se midió la temperatura de fusión mediante el uso de un calorímetro diferencial de barrido (DSC) marca TA modelo 2100 en modo estándar, con una rampa de calentamiento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $-50^{\circ}\text{C}$  hasta  $200^{\circ}\text{C}$ , con un periodo de estabilización de 5 minutos. Para determinar el tipo de polímero obtenido se realizó espectroscopía infra-rojo en un equipo Spectrum 2000 con un rango de espectro de  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ ; adicionalmente, el polímero se sometió a metanólisis siguiendo la metodología descrita por Braunegg *et al.* (1978) para obtener el metil-éster del polímero y ser detectado mediante cromatografía de gases en un equipo Varian 3400 usando una columna DB-Wax semicapilar ( $15\text{m} \times 0.53\text{ mm} \times 0.1\text{ }\mu\text{m}$ ), con un flujo de 8 ml/min y helio como gas de arrastre. El programa de la columna fue 1 min a  $60^{\circ}\text{C}$  y luego una rampa de  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $220^{\circ}\text{C}$  donde permaneció 1 min, los estándares externo e interno fueron ácido  $\beta$ -hidroxibutírico y ácido benzoico, respectivamente.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El comportamiento cinético de la fructosa y la biomasa para las tres concentraciones de fructosa iniciales estudiadas (5, 10 y 15 g/l), se muestra en la Figura 1.



**FIGURA 1.** Cinética de crecimiento y consumo de fructosa de *Ralstonia eutropha*, en cultivo por lote alimentado limitado, en fuente de nitrógeno para 3 concentraciones de fructosa iniciales 5, 10 y 15 g/l.

En la Tabla 2 se presentan los siguientes parámetros cinéticos, la velocidad de crecimiento específico inicial ( $\mu_0$ ), el rendimiento de sustrato en biomasa para la etapa de crecimiento ( $Y_{x/s1}$ ), el rendimiento de sustrato en biomasa para la etapa de acumulación ( $Y_{x/s2}$ ), el rendimiento de biomasa en producto ( $Y_{p/x}$ ), el rendimiento de sustrato en producto global ( $Y_{p/s}$ ) y la productividad ( $p$ ). Los datos reportados en la Tabla 2 corresponden al promedio de los resultados obtenidos en los dos ensayos realizados para cada concentración de fructosa estudiada. Estos datos fueron analizados mediante el cálculo de la varianza para un diseño DCA usando como estadístico de comparación la distribución F para un nivel de significancia del 5%. El valor F que aparece en la mencionada Tabla corresponde al valor obtenido a partir de los datos experimentales, el cual fue comparado con el valor crítico F que es 9.5520.

Los perfiles de concentración de biomasa para las 3 condiciones evaluadas son similares durante las horas 0 a 12 (Figura 1). Lo anterior es corroborado mediante la velocidad de crecimiento específica inicial que no presenta diferencia significativa para las tres concentraciones de fructosa. Durante las horas 0 a 12 la velocidad de crecimiento permanece constante y no existe una fase de latencia. Sin embargo, después de la hora 12 (cuando se ha alcanzado una concentración de biomasa de 2 g/l), la velocidad de crecimiento específico empieza a disminuir hasta hacerse casi cero en la fermentación de 15 g/l. Lo anterior se debe a que las condiciones de mezclado en el fermentador limitan la distribución de nutrientes, principalmente el oxígeno, necesarios para el crecimiento bacteriano. En otros ensayos (dato no reportado), se realizaron fermentaciones en un equipo BIOFLO III manteniendo la misma agitación y aireación que

**TABLA 2. Parámetros cinéticos obtenidos durante las fermentaciones para las concentraciones de fructosa inicial 5, 10 15 g/l**

Parámetro cinético	Concentración de fructosa			F
	5 g/l	10 g/l	15 g/l	
$\mu_0$ , h <sup>-1</sup>	0.5171	0.4676	0.3565	7.7742
$Y_{x/s1}$ , g/g	0.4553	0.4621	0.4817	0.0610
$Y_{x/s2}$ , g/g	0.4242	0.4104	0.2507	8.8407
$Y_{p/x}$ , g/g	0.662	0.4453	0.5727	7.9105
$Y_{p/s}$ , g/g	0.2839	0.1785	0.2189	4.1627
p, g/l h	0.1245	0.0580	0.0526	36.032

en este trabajo y se logró mantener una fase exponencial por cerca de 24 horas, luego de la cual se presentó el mismo fenómeno de disminución en la velocidad de crecimiento específico, con lo cual se demuestra que las condiciones de mezclado son la limitante para la producción de biomasa. En la fermentación de 15 g/l no se consumió la fructosa, luego del pulso de alimentación, porque la concentración de biomasa (5.6 g/l) exige mejores condiciones de mezclado que al inicio de la fermentación donde la concentración de biomasa es baja.

El rendimiento de sustrato en biomasa, para la etapa de crecimiento sin limitación ( $Y_{x/s1}$ ), es muy similar en los tres casos (el promedio es 0.4664 g biomasa / g fructosa), el cual es un valor cercano a 0.5 g biomasa / g fructosa asumido en el balance de materiales. Lo anterior demuestra que dicho balance, obtenido de manera general para cualquier bacteria, se puede aplicar para el crecimiento de *R. eutropha* en la etapa de crecimiento celular. Mediante microscopía no se observó acumulación de polímero durante esta etapa, lo que corrobora que la relación carbono-nitrógeno (6.85 g C/ g N) es la apropiada para el creci-

miento celular al no existir limitación en la fuente de nitrógeno.

Luego del pulso de alimentación en las fermentaciones de 5 g/l y 10 g/l, el rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{x/s2}$ ) es muy similar y cercano a 0.41 g biomasa / g fructosa. Este valor es menor al obtenido en la etapa de acumulación de biomasa para las mismas fermentaciones. En la fermentación de 15 g/l, este rendimiento es bajo (0.2507 g biomasa/g fructosa) ya que la fructosa no se alcanzó a agotar totalmente cuando se detuvo la fermentación (cerca de la hora 80). En esta etapa de la fermentación, se supone que no debe existir nitrógeno remanente y que su ausencia favorece la acumulación del polímero antes que un aumento en la concentración celular. Durante esta etapa se observó la formación de polímero mediante la tinción con sudán negro.

Los valores obtenidos para este parámetro ( $Y_{p/s}$ ) en este trabajo están dentro del rango reportado por Kim *et al.* (1994), el cual oscila entre 0.1 a 0.33 g PHB / g sustrato usando glucosa como fuente de carbono; aunque la fuente de carbono utilizada es diferente en los dos trabajos, se puede concluir que

para estos dos azúcares el rendimiento es muy cercano y la escogencia de uno u otro se hará teniendo en cuenta criterios económicos. Para la concentración de fructosa de 5 g/l se obtiene el mayor rendimiento con un valor de 0.2839 g PHB / g fructosa que es cercano al máximo dentro del intervalo reportado por Kim *et al.* (1994).

El rendimiento de biomasa en producto ( $Y_{p/s}$ ) es mayor para las fermentaciones de 5 y 15 g/l (0.662 y 0.5727 g PHB/g biomasa, respectivamente) y menor para la fermentación de 10 g/l (0.4453 g PHB/g biomasa). A pesar de esto, la prueba estadística concluye que no existe diferencia significativa entre estos rendimientos. Kim *et al.* (1994) reportan un rendimiento de 0.76 g PHB/g biomasa, usando glucosa como fuente de carbono, al finalizar la etapa de acumulación de polímero cuando ha inducido varios pulsos de alimentación por lo cual se recomienda para trabajos posteriores aplicar otros pulsos de alimentación para aumentar el porcentaje de acumulación.

La productividad en el ensayo con 5 g/l es la más alta (0.1245 g PHB / l h) superior estadísticamente al observado en los ensayos con 10 y 15 g/l (0.058 y 0.056 g PHB / l h, respectivamente). Ryu *et al.* (1997) reportan una productividad de 3.75 g PHB/l h usando *R. eutropha* NCIMB 11599 la cual crece en glucosa usando limitación en fosfatos, la cual es la más alta reportada hasta ahora. Kim *et al.* (1994) reportan una productividad de 2.42 g PHB / l h cuando la limitación es en la fuente de nitrógeno, para la cepa NCIMB 11599. Las cepas usadas en los trabajos reportados son diferentes a la del presente trabajo y con varios pulsos de alimentación de glucosa, lo cual hace que la productividad sea mayor en dichos trabajos. Mediante la investigación sobre las condiciones de mezclado que garantizan una etapa de crecimiento exponencial prolongada se podrá aumentar considerablemente la productividad. La mejor con-

centración de fructosa inicial para producir el polímero es 5 g/l; sin embargo, la fermentación de 15 g/l generaría mayor cantidad de polímero al presentarse una mayor concentración de biomasa, por lo cual se recomienda examinar otras condiciones de aireación y agitación para esta concentración. Además, para mejorar la acumulación se puede realizar otro pulso de alimentación de fructosa.

La temperatura de fusión determinada mediante DSC fue 170.53 °C (Figura 2), la cual es cercana a la temperatura reportada para el PHB (175°C). Los picos obtenidos mediante el análisis del espectro infra-rojo (Figura 3) revelan que el material tiene las bandas características del PHB (1728  $\text{cm}^{-1}$ ), correspondiente al enlace C=O y 2928  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-H (Hon *et al.*, 1999). Los tiempos de retención obtenidos mediante cromatografía de gases para el metil- $\beta$ -hidroxibutirato y el ácido benzoico son 3.90 y 5.01, en todas las muestras están presentes estos dos picos (Figura 4), por lo cual se concluye que el polímero obtenido es PHB y que no se forma ningún copolímero.

## CONCLUSIONES

A través de la presente investigación se evaluaron tres concentraciones de fructosa como fuente de carbono para la producción de PHAs usando la cepa *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la concentración inicial de fructosa fue 5 g/l, con la cual se obtuvo 0.1245 g PHB/ l h de productividad, 0.2839 g PHB/g fructosa de rendimiento de sustrato en polímero ( $Y_{p/s}$ ), 66.2% de porcentaje de acumulación en peso seco y 0.5171  $\text{h}^{-1}$  en su velocidad de crecimiento específico. La caracterización del material polimérico mediante cromatografía de gases, DSC y espectroscopia infra-rojo permite concluir que el material obtenido es poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB).

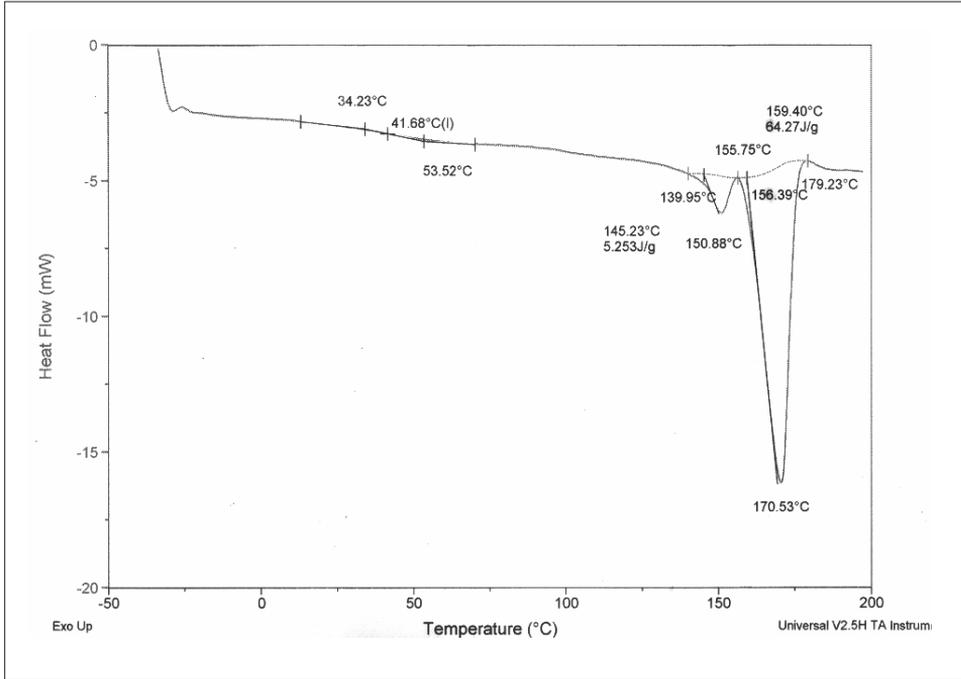


FIGURA 2. DSC realizado a una muestra de polímero. Se realizó desde -50°C hasta 200°C con una rampa de 10°C/min. El pico a 170.53°C corresponde a la temperatura de fusión del polímero.

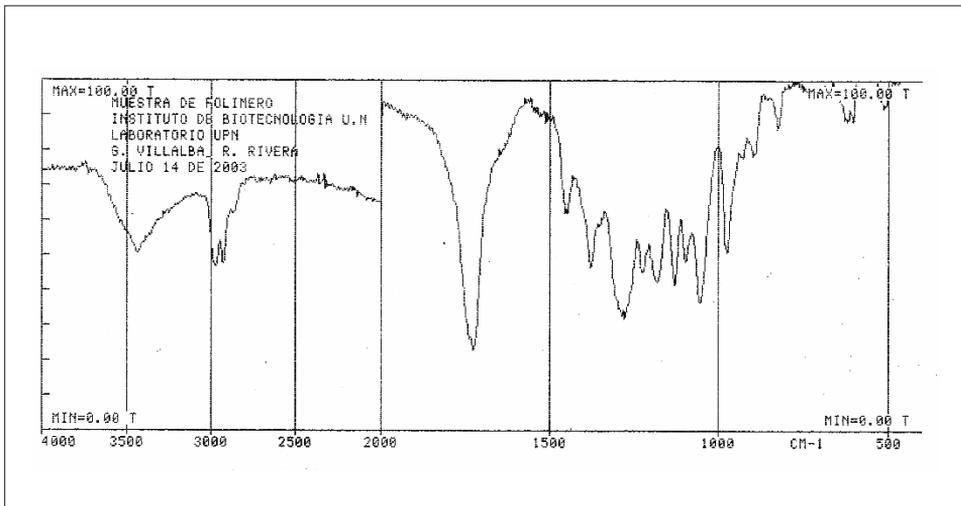
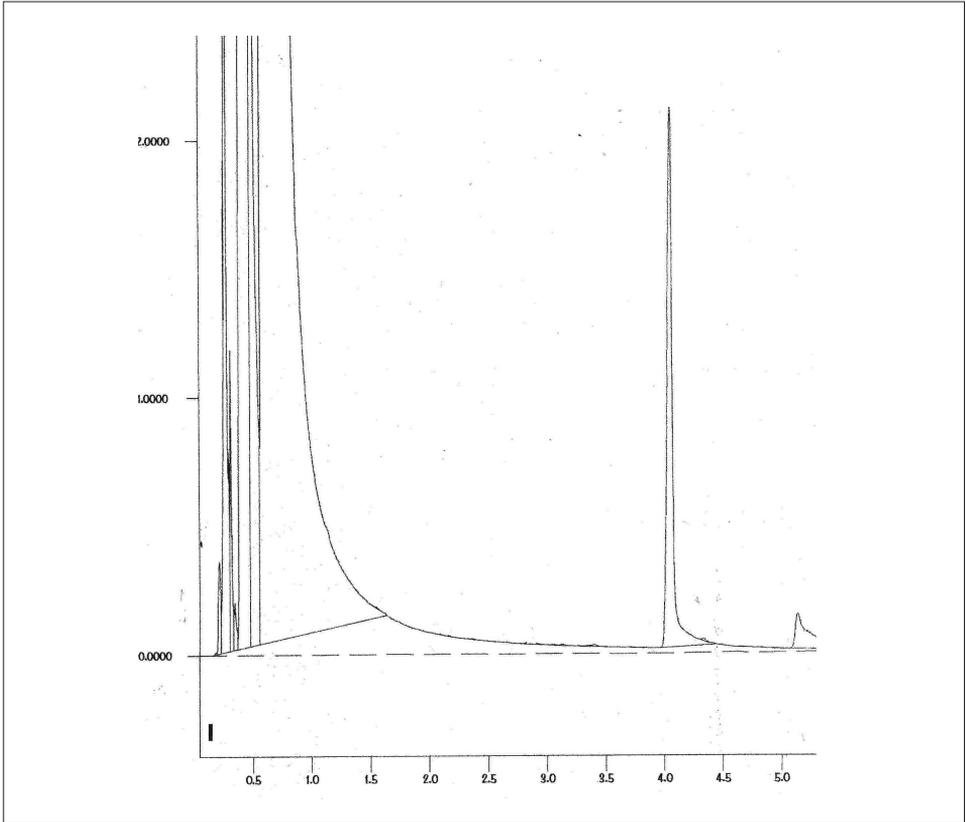


FIGURA 3. Espectro infrarrojo para una muestra de polímero. Se aprecian las bandas características del PHB a 1728 cm<sup>-1</sup> (C=O), 2928 cm<sup>-1</sup> (C-H) (Hon *et al.*, 1999)



**FIGURA 4.** Cromatograma de una muestra de polímero de *R. eutropha* sometida a metanólisis (Cromatógrafo Varian modelo 3400) donde se aprecian los picos del metil- $\beta$ -hidroxibutirato (tiempo de retención 3.90 min) y metil-benzoato usado como estándar interno (tiempo de retención 5.01 min). Los picos iniciales corresponden al metanol y cloroformo usados durante la metanólisis.

#### LITERATURA CITADA

- BARBOSA, M. 2002. Producción de polímeros biodegradables usando *R. eutropha*. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B. Y R. LAFFERTY. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology* 6: 29-37.
- CORTÁZAR, J. y MALAGÓN, D. 2001. Evaluación experimental de tres métodos de recuperación de polímeros biodegradables del tipo PHAs sintetizados por *Pseudomonas*. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- DUARTE, A. 1995. *Introducción a la Ingeniería Bioquímica*. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- GOGOLEWISKI, S., JOVANOVIC, M., PERREN, S., DILLON, J y HUGHES M. 1993. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research* 27: 1135-1148.
- HON, K., SUN, S., TIAN, W., CHEN, G. y HUANG, W. 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbial Biotechnology*. 51: 523-526.
- KIM, B., LEE, S., LEE, S., CHANG, H., CHANG, Y., y SEONG IHL, W. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering* 43(9): 892-898.
- LEE, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates. 1996<sup>a</sup>. *Biotechnology and Bioengineering* 49: 1-14.
- LEE, S. 1996<sup>b</sup>. Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. 14: 431-438.
- MADISON, L y HUISMAN, G. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates ): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (1): 21-53.
- MILLER, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* 31: 426.
- POIRIER, Y., NAWRAITH, C., y SOMERVILLE, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. *Biotechnology* 13: 142-150.
- RYU, H., HAHN, S., CHANG, Y., y CHANG. H. 1997. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering* 55(1): 28-32.
- SCHLEGEL, H., LAFFERTY, R., y KRAUSS, I. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Arch. Mikrobiol* 70:283-294.
- Recibido: 4-02-2004**  
**Aceptado: 2-02-2005**