

Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial

Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level

Recibido: 05-04-2015 Aceptado: 30-05-2015

Ana Carolina Lemos Delgado¹
Alexis Mina Cordoba²

Resumen

Los Polihidroxicanoatos (PHA) son plásticos biocompatibles y biodegradables sintetizados por una amplia variedad de microorganismos, que comparten características muy similares con los plásticos de origen petroquímico. Los estudios más recientes se centran en la búsqueda de sustratos económicos y en estrategias de extracción que permitan la reducción de los costos del producto y de esta forma, puedan incursionar en un mercado ampliamente difundido donde dominan los plásticos derivados del petróleo. El objetivo de esta revisión, consiste en mostrar la producción de polihidroxicanoatos como un recurso y herramienta de primera mano que tienen un gran potencial de uso en aplicaciones que van desde la manufactura de productos desechables de uso común, hasta la de productos biomédicos y farmacéuticos de alto valor agregado.

Palabras clave: bioplásticos; biopolímeros; polihidroxicanoatos; microorganismos; biosíntesis.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA's) are biodegradable and biocompatible plastics synthesized by a wide variety of microorganisms, which share similar characteristics with petrochemical plastics. The most recent studies focus on the pursuit of economic substrates and extraction strategies that allow reducing product costs and thus, can make inroads in a market widely disseminated where petrochemical plastics dominate. The aim of this review is to show the polyhydroxyalkanoates production as a resource and tool first hand and have great potential for use in applications ranging from the manufacture of disposable products commonly used to biomedical and pharmaceutical products high added value.

¹ Colombiana, Bióloga, Estudiante de Maestría en Biotecnología, Facilitadora área de Biotecnología Tecnoacademia Nodo Cali, Centro ASTIN, SENA Regional Valle.
e-mail: alemosd@sena.edu.co.

² Colombiano, Ingeniero de Materiales, Facilitador área de Nanotecnología Tecnoacademia Nodo Cali, Centro ASTIN, SENA Regional Valle.
e-mail: jminac@sena.edu.co.

Key Words: bioplastic; biopolymers; polyhydroxyalkanoates; microorganisms; biosynthesis.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros a los que se le han dado variados usos en la industria, desde la farmacéutica, alimentos y transporte entre otros, convirtiéndose en la base de la mayoría de los productos de consumo habituales (Grados *et al.*, 2008) y reemplazando a los empaques de vidrio y papel debido a algunas de sus propiedades como la elasticidad y flexibilidad (Arcos, 2007), además de su fácil moldeamiento y alta resistencia química (Castillo, 2008). Los polímeros convencionales, se producen mayormente como derivado de la industria petroquímica y perduran en la naturaleza por largos periodos de tiempo, debido a su alto peso y conformación molecular que los hace materiales recalcitrantes y resistentes a la acción degradadora de los microorganismos (Khanna y Srivastava, 2005; González *et al.*, 2013), no son biodegradables y se bio-acumulan en los ecosistemas, produciendo grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente (Wendlandt *et al.*, 2005)

Por su parte, los bioplásticos son un tipo de material que en las últimas décadas ha sido utilizado para reemplazar a los plásticos derivados del petróleo y en contraste con estos, se pueden producir a partir de fuentes renovables de energía (Rozsa *et al.*, 2004; Arroyave *et al.*, 2013). La Asociación Europea de Bioplásticos clasifica estos como: 1) Plásticos sintetizados a partir de fuentes renovables y 2) Polímeros biodegradables que cumplen con todos los criterios de las normas científicas reconocidas de biodegradabilidad y compostaje de plásticos según el estándar Europeo EN 13432 (Industry Experts, 2012) como lo son los polihidroxicanoatos (PHA).

Si bien se ha explorado y ahondado en diferentes procesos para reciclar o eliminar los plásticos de origen petroquímico del medio ambiente, la tendencia socioeconómica hacia los modelos de desarrollo sostenibles han impulsado la investigación sobre la generación de bioplásticos como los polihidroxicanoatos (Verlinden *et al.*, 2007), que ofrecen una mejor biocompatibilidad, ocasionando menores impactos en los ecosistemas. Sin duda el reto de esta tecnología de producción limpia, radica en obtener bioplásticos con propiedades similares a los plásticos de origen petroquímico existentes en el mercado con un costo similar o menor (Rivera, 2009).

Polihidroxicanoatos

Los biopolímeros o polihidroxicanoatos (PHA) son considerados fuertes candidatos para el reemplazo de los polímeros de origen petroquímico, ya que siendo sintetizados por microorganismos a partir de sustratos de bajo o nulo valor económico y en general de recursos renovables, tienen características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno (González *et al.*, 2013; Lee, 1996; Sudesh *et al.*, 2000; Serrano, 2010), pero tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias (Du *et al.*, 2001), en hábitats tan diversos como suelo, mar, aguas estancadas o aguas residuales (Barbosa *et al.*, 2005 Carballo *et al.*, 2003).

Estos, son polímeros de ácidos hidroxicanoicos que algunos microorganismos acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. La polimerización de los ácidos hidroxicanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxicanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster; de ahí que se han llamados biopolíesteres (Khanna y Srivastava 2005) (Figura 1).

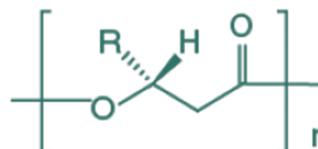


Figura 1. Estructura química del PHA
Fuente: (tomado de Andler y Díaz, 2013)

El valor de n dependerá del grupo R y el microorganismo en el cual se produce el biopolímero, variando entre 100 y 30000 (Lee, 1996a). En la Tabla 1 se indican las sustituciones más comunes del grupo radical y el nombre que recibe el polímero (Andler y Díaz, 2013).

Tabla 1. Sustituciones del grupo radical y algunos de los PHA más conocidos.

Grupo R	Nombre del Polímero	Abreviación
CH ₃	poli(3-hidroxicbutirato)	PHB
CH ₂ CH ₃	poli(3-hidroxicvalerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	poli(3-hidroxichexanoato)	PHHx

Fuente: Tomado de (Andler y Díaz, 2013)

A pesar de las ventajas ambientales de los PHA frente a los plásticos petroquímicos, el problema fundamental que todavía afronta la producción de este polímero es su elevado costo (Andler y Díaz, 2013), por lo que se están tomando medidas para hacerlos más accesibles a la población, entre las cuales figuran mejoras en el proceso de fermentación y extracción.

Autores como Salehizadeh y Van Loosdrecht 2004, señalan como la investigación sobre la producción de PHA ha dado lugar a la obtención de cultivos con una concentración de polímero de más de 80 g/L y con una productividad de más de 2 g/L/h, usando sistemas por lote alimentado o continuo que potencialmente podrían producir 50 000 toneladas por año, marcando de esta manera un uso y un aprovechamiento potencial de producción de este biopolímero (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004)

Por otra parte, para autores como Dai y colaboradores (2007), la producción de PHA mediante procesos fermentativos con microorganismos, se puede efectuar con un microorganismo (cultivo puro) o un consorcio de microorganismos (cultivos mixtos); sin embargo su producción económica va a depender no solo en los costos de la materia prima de carbón sino en las condiciones de asepsia del cultivo (monocultivos) que son la tecnología más utilizada o la producción por cultivos mixtos (Dai *et al.*, 2007).

La producción de PHA usando cultivos mixtos, ofrece una ventaja frente a los cultivos puros, debido a que en este tipo de fermentaciones las condiciones de esterilidad no son requeridas. (Arcos, 2007). En cualquier caso, se requiere establecer los valores óptimos para cada uno de los parámetros operacionales involucrados en el proceso fermentativo, siendo los de mayor incidencia la temperatura, el pH y el tiempo de fermentación (Kulpreecha *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta ahora el desafío sigue siendo desarrollar un bioproceso con alta eficiencia de conversión en PHA al más bajo costo posible (Andler y Díaz, 2013).

Clasificación de los PHA

Los polihidroxiálcanoatos se clasifican de acuerdo con la naturaleza de sus unidades monómeras, si el polímero está formado por solo un tipo de unidades se denomina homopolímero (Anderson y Dawes, 1990); a su vez, si está integrado por monómeros con distinta longitud de átomos de carbono en el mismo gránulo se refiere entonces a un copolímero (Zhao y Chen, 2007).

Se conocen tres tipos de PHA según la longitud de la cadena lateral: PHA scl (*short chain length*), PHA mcl

(*medium chain length*) y PHA lcl (*long chain length*) donde la cadena lateral alquílica varía de 1 a 14 carbonos (Cardona, 2012). Las características principales de los PHA scl son ser demasiados rígidos y frágiles, mientras los PHA mcl son más elásticos pero dotados de menos fuerza mecánica (Ortiz, 2009). Se debe mencionar que la razón por la cual un PHA se forma como un polímero de cadena corta o media está relacionada directamente con la enzima encargada de la síntesis (sintasa) ya que esta es específica al sustrato y puede actuar sobre monómeros con diferente número de átomos de carbono (Anderson y Dawes, 1990); de esta manera la composición química de los PHA va a depender del sustrato utilizado, de la enzima PHA-sintasa y de la ruta metabólica involucrada (Lemos *et al.*, 1998).

Dentro de los PHA, el poli(3-hidroxi butirato) o PHB es uno de los más estudiados y es sintetizado por diferentes bacterias (Gumel *et al.*, 2013). Posee características muy similares al polipropileno (PP) que es uno de los plásticos convencionales (de la industria petroquímica) de mayor uso. En la Tabla 2 se muestran una comparación de ambos polímeros.

Tabla 2. Comparación propiedades físicas entre PHB y polipropileno (PP)

Parámetro	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	2	-10
Cristalinidad (%)	60	50-70
Fuerza de tensión (MPa)	43	38
Extensión hasta quiebre (%)	5	400

Fuente: (Jendrossek y Handrick, 2002).

Síntesis y acumulación microbiana de PHA

Si bien, se han detectado acumulaciones de PHA en diferentes especies bacterianas, el porcentaje de acumulación en muchas de ellas es muy bajo, por lo cual son rechazadas ante la dificultad o imposibilidad de industrializar el proceso (Ieczak *et al.*, 2013; Andler y Díaz, 2013); en la actualidad se conocen al menos 75 géneros diferentes de bacterias productoras de PHA, tanto Gram negativas como Gram positivas, que los acumulan en el citoplasma bajo ciertas y determinadas condiciones de cultivo (Scherer *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2009 y Suwannasing *et al.*, 2012).

Se debe resaltar que la producción de los gránulos de PHA es inducida bajo una serie de condiciones

desfavorables para el crecimiento bacteriano, con lo cual estos biopolímeros son producidos y acumulados intracelularmente como reserva de energía cuando las células bacterianas se encuentran en dichas condiciones de estrés que generalmente puede ser nutricional como la limitación de fósforo, nitrógeno, oxígeno o en un pH no óptimo y un exceso de la fuente de carbono. Se ha reportado que se puede llegar a alcanzar en una bacteria hasta 90 % de su peso seco en moléculas de PHA (Madison y Huisman, 1999).

Los PHA son acumulados como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma de los microorganismos, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas (Figura 2) (Ábalos *et al.*, 2003; Gómez, 2013). Estas bacterias sintetizan los PHA como compuestos de almacenamiento de fuentes de carbono y energía (Lenz y Marchessault, 2005; Ojumu, *et al.*, 2004) y probablemente cumplen con otras funciones en la célula bacteriana. De esta manera, constituyen un grupo de materiales biodegradables de gran potencial biotecnológico (Arcos, 2007).

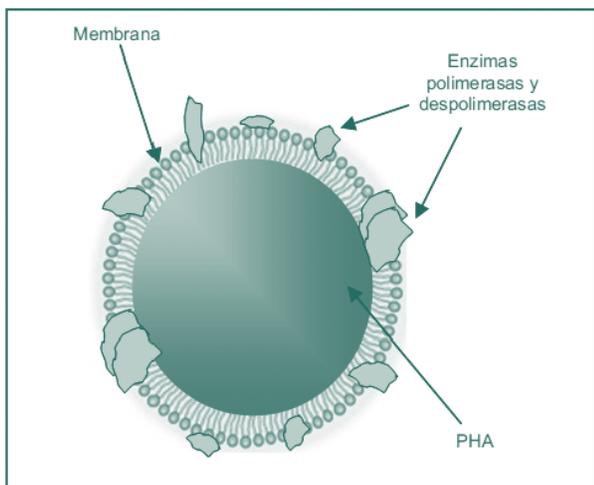


Figura 2. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente.
Fuente: (Sudesh *et al.*, 2000).

Investigaciones previas realizadas sobre los procesos de producción y acumulación de los PHA indican que el número de gránulos por célula se definen en las primeras etapas del proceso y que la producción del polímero cesa cuando el contenido de acumulación alcanza entre el 80-90% del peso celular en base seca de la bacteria (Catone, 2013). Este fenómeno ha llevado a la conclusión de que existen restricciones físicas que impiden a la célula acumular más polímero, a pesar de la disponibilidad de sustrato y actividad de la enzima PHA polimerasa (Wang y

Lee, 1997). Estas inclusiones se observan bajo el microscopio como gránulos esféricos de diferentes tamaños (Braunegg *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta que el PHA es un compuesto de almacenamiento a partir de un exceso de carbono, es natural que los microorganismos cuenten con una enzima para degradarlo y así recuperar este carbono almacenado cuando en el medio circundante este escasee, de este modo los PHA pueden servir como una fuente de carbono o de energía para los microorganismos durante un período de ayuno o de estrés nutricional (Punrattanasin, 2001; Arcos, 2007). En bacterias como *Ralstonia eutropha*, se ha observado que la tasa de degradación del polímero acumulado es aproximadamente diez veces más lenta que la tasa de síntesis. Sin embargo el mecanismo de degradación de PHA no se ha investigado tan extensamente como la síntesis (Doi *et al.*, 1992).

Sin embargo, también existen bacterias que presentan una producción del polímero asociada al crecimiento, aunque este caso es menos frecuente (Lee, 1996a). En la Tabla 3, se muestran los principales nutrientes cuya limitación da lugar a la síntesis de PHA en diferentes bacterias.

Tabla 3. Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHA's en diferentes microorganismos

Microorganismo	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nitrógeno
<i>Ralstonia eutropha</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	Oxígeno
<i>Rhizobium ORS571</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	Fósforo
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

Fuente: (Babel y Steinbüchel, 2001).

Finalmente, a la hora de la elección del microorganismo para la producción industrial del biopolímero variará dependiendo de factores como la habilidad celular para utilizar fuentes de carbono no costosas, la velocidad de

crecimiento, la velocidad de síntesis del biopolímero, la calidad y cantidad de PHA y el costo de los procesos de recuperación (Lee y Choi, 2001). A nivel industrial se emplean cepas como la *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Paraccus denitrificans*, *Protomonas extorquens* y *E. coli* recombinante (Lee, 1996b; Fernández *et al.*, 2005; Arroyave *et al.*, 2013).

Mundialmente, el microorganismo más estudiado ha sido la bacteria *R. eutropha* debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de PHA, específicamente del tipo poli-b-hidroxibutirato (PHB), en un porcentaje cercano al 80% del peso seco de la bacteria. Esta producción y acumulación, puede llevarse a cabo en un medio simple a partir de fuentes de carbono económicas tales como glucosa, fructosa y residuos de la industria oleica, agroindustrial, entre otras (Lee, 1996b; Priyadarshi *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que en los últimos años son más frecuentes y más numerosos los artículos e investigaciones que se desarrollan en cuanto a la producción, ventajas y desventajas de la obtención de PHA. Dentro de ellos diferentes factores físico-químicos han sido evaluados y puestos a prueba con el fin de conocer y establecer aquellos que presentan mayor incidencia en la producción de estos biopolímeros. Por ejemplo, Kasemsap y Wantawin (2006) en Tailandia investigaron la productividad y el contenido intracelular de PHA a partir de lodos activados provenientes de aguas residuales que fueron utilizados como fuente de carbono a partir de un mix de microorganismos autóctonos de este sustrato para evaluar el efecto del pH sobre la capacidad de producción del biopolímero. Estos investigadores encontraron que los rendimientos obtenidos por los cultivos mixtos, se podían comparar con los de las cepas puras si el proceso tenía una fase anaerobia y un aumento en el pH, porque de esta forma la célula necesita menos energía, y aprovecha la energía suministrada por la degradación del polifosfato en condiciones anaerobias (Castro *et al.*, 2011), demostrando una vez más que la producción de PHA a partir de lodos activados es una solución innovadora que reduce notablemente los costos de proceso, es amigable con el ambiente y puede manejar operaciones más flexibles. (Salazar, 2010).

Se debe resaltar, que han sido utilizados diferentes sustratos a lo largo de los últimos años, entre ellos residuos de procesos de la agricultura como la cascarilla de arroz y almidón de maíz, demostrando que estos sustratos, no solo reducen los costos del material, sino que además incrementan la concentración celular y la acumulación de PHA (Salazar, 2010).

A partir de diferentes ensayos a nivel de laboratorio Huang y colaboradores en el 2006 evaluaron dos tipos de sustratos: cascarilla de arroz y almidón de maíz y como cepa *Haloferax mediterrane* en la capacidad de producción de PHA. Ellos encontraron que esta cepa no puede crecer a partir de cascarilla de arroz en contraste con los sorprendentes resultados que se obtuvieron al usar el almidón de maíz como sustrato, donde la concentración de PHA alcanzó el 77,8 g/l y un contenido de 55,6% de PHA del peso seco celular, representando más de dos veces la concentración celular y tres veces la concentración de PHA si se usa solo almidón de maíz. Estos resultados, hacen este proceso potencialmente viable a gran escala si se continúa con el mismo modelo de fed-batch, y bajo los mismo parámetros utilizados a nivel de laboratorio (Huang *et al.*, 2006).

Aplicación Industrial

Aunque aún no son muy comercializados ni presentan gran demanda mundial, algunas aplicaciones industriales para los PHA ya han sido descritas, entre ellas la fabricación de películas delgadas de recubrimiento; agentes ligantes en formulaciones de tintas a base de agua; como fuente de monómeros quirales para la síntesis de compuestos activos y como soporte para ingeniería de tejidos e implantes médicos temporarios (Vergara, 2012).

Debido a que posee un alto grado de polimerización y un grado de cristalinidad en el rango de 60 a 80%, son activos óptimamente (ya que presentan un carbono quiral), isotácticos (es decir están conformados por unidades repetidas estereoquímicamente regulares) e insolubles en agua. Haciéndolos altamente competitivos con el polipropileno y otros plásticos derivados del petróleo (Reddy *et al.*, 2003; Madison y Huisman, 1999).

Son estas propiedades, las que hacen que los PHA puedan ser usados en los procesos de moldeado (González *et al.*, 2013). Sin embargo, la aplicación más conocida de estos biopolímeros de cadena corta es para la fabricación de botellas desechables, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos (Anderson y Dawes 1990).

Además, pueden ser usados en la cubierta de materiales fibrosos como papel o cartón a partir de la forma de látex acuoso. De esta manera, dado su alta resistencia al agua, está cubierta protege al papel o cartón contra el deterioro causado por la humedad (González *et al.*, 2013).

Colombia al igual que algunos países Suramericanos no presentan avances significativos en la orientación y producción de PHA; en los últimos años se han desarrollado avances a escalas de laboratorio. Entre los que se encuentra el caso reportado en el 2008 en la Revista Colombiana de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, donde se publicó una tecnología novedosa que permitió liberar toxinas de la cepa *Bacillus thuringiensis* por medio del uso de gránulos de PHA. Esta tecnología hallaba una solución ambiental importante, ya que la toxina producida por este microorganismo sería inmovilizada dentro del gránulo de PHA, que posteriormente sería utilizado como control biológico de plagas, de esta manera al inmovilizar la toxina dentro del gránulo, se tiene la posibilidad de modificar parámetros como el tamaño del gránulo, así como incrementar el contenido de dicha toxina dentro de él (Rosas, 2008).

En la agricultura, la aplicación de los PHA de cadena corta se desarrolla en macetas biodegradables, tubos de irrigación y matrices para la liberación controlada de factores de crecimiento, pesticidas y herbicidas. Una ventaja en este campo de aplicación es que no se requiere un grado de purificación muy alto del polímero, lo cual puede facilitar el proceso de extracción y hacerlo más económico (Babel y Steinbüchel 2001 citado por Gonzalez *et al.*, 2013).

Se pudo observar que la producción de los PHA comenzó a ser importantes en nuestro entorno y aunque su producción industrial no sea tan viable debido a los tiempos tan largos estimados para mejoras en el proceso, cabe resaltar que estos biopolímeros inician en darse a conocer como una tecnología emergente y de uso potencial para satisfacer las diferentes necesidades de cada país a futuro.

Una de las estrategias que se vislumbran en el panorama, para hacer competitivo la producción de los biopolímeros desde el punto de vista ambiental, tecnológico y hasta económico, sería el aprovechamiento de residuos agroindustriales en la producción de PHA; de este modo se estarían trabajando dos aspectos importantes en sectores diferentes: 1) En el sector agroindustrial, creándose una alternativa de aprovechamiento de un subproducto, dado que en muchas ocasiones, se generan altos impactos ambientales en su disposición final o en la generación de una alta inversión económica para su tratamiento y 2) En la aplicación de tecnologías amigables con el medio ambiente, desde la industria de los biopolímeros, específicamente el PHB, pues se disminuyen los costos de producción y se daría un valor agregado a una materia prima contaminante (Naranjo, 2010).

En Colombia y específicamente el departamento del Valle del Cauca donde la actividad agrícola tiene una participación importante en la economía nacional y regional y al mismo tiempo genera grandes cantidades de desechos sólidos y líquidos (algunos de ellos con características recalcitrantes y contaminantes), la exploración de diferentes alternativas para orientar y desarrollar un manejo ambientalmente sostenible de dichos residuos agroindustriales es una prioridad (Sánchez *et al.*, 2012), convirtiéndolos en puntos clave para el aprovechamiento biotecnológico como lo es la producción de PHA.

De esta manera, esta recopilación pretende inducir y/o orientar trabajos e investigaciones, que puedan abarcar las distintas problemáticas de transformación y optimización de las variables implícitas del proceso de producción y acumulación de los PHA y que además propongan alternativas de solución y aportes que poco a poco dirijan el camino hacia la explotación de los residuos para este fin.

Conclusiones

- Los polihidroxicanoatos son biopolímeros versátiles con diversas aplicaciones en industrias como la: farmacéutica, biomedicina, de alimentos, embalaje, entre otras. Los PHA son biodegradables y se pueden producir de una forma sostenible y amigable con el medio ambiente, utilizando materias primas renovables o de desecho industrial.
- Si bien, los PHA son reconocidos como candidatos para producir plásticos biodegradables, aún tienen como limitación para su producción a gran escala su alto precio en comparación con los plásticos convencionales, por ello es necesario buscar una alternativa amigable con el medio ambiente y económicamente justificable para producirlos.

Referencias

- Ábalos, A., Espuny M.J., Bermúdez, R.C. y Manresa, A. (2003). Aplicación de la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) en la caracterización química de los polihidroxicanoatos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Revista Cubana de Química*. 15(2), 3-10.
- Andler, R. y Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. *Technological and market aspects of microbial bioplastics production. Ingenerare* 27- 29. Chile.

- Anderson, A. J. y Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472.
- Arcos, M. (2007). *Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante Un biorreactor discontinuo*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Arroyave, A.L.; Cardona, M. y Agudelo, L.M. (2013). Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxialcanoatos (PHA's) en lodos activados. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2, 69- 76.
- Babel W. y Steinbüchel A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in *Biochemistry. Engineering. Biotechnology*. 1, 342.
- Barbosa, M.; Espinosa, A.; Malagón, D. y Moreno N. (2005). Producción de Poli-B-Hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*. 10(1), 45-54.
- Bello, D.; Otero, M.; Ortega, G. y Carrera, E. (2009). Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxialcanoatos. *Revista ICIDCA* 43(2), 3-13. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120662002>.
- Braunegg, G.; Lefebvre, G. y Genser, K.F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* 65, 127-161.
- Carballo, M.E.; Iglesias, Y.; Martínez, J.; Solano, R.; Fernández, A.I. y Villaverde, M.J. (2003). Evaluación de la producción de polihidroxialcanoatos por cepas bacterianas marinas. *Revista Biología* 17 (1), 52-58.
- Cardona, M. y Agudelo, L.M. (2012). *Producción de bioplásticos a partir de bacterias empleando sustratos no convencionales*. Grupo de Biotransformación Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia.
- Castillo, D. (2008). *Efecto Del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por Pseudomonas putida*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil.
- Castro, J.M.; López, M.J.; Rodríguez C.M.; Muñoz, A. (2011). *Sistema de reducción de lodos en tratamientos de aguas residuales*. Recuperado de: http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:67093/componente67090.pdf. Junio 15 de 2015.
- Catone, V. (2013). *Identificación y análisis de los genes asociados al metabolismo de polihidroxialcanoatos en Pseudomonas extremaustralis*. (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Dai, Y.; Yuan, Z.G.; Jack, K.; Keller, J. (2007). Production of targeted poly(3- hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *Journal of Biotechnology*. (129): 489-497.
- Doi, Y.; Kawaguchi, Y.; Koyama, N.; Nakamura, S.; Hiramitsu, M.; Kimura, H. (1992). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Reviews* 103,103-108.
- Du, G.; Jian, C.; Jian, Y. y Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology* 88, 59-65.
- Fernández, P.; Ortiz, F.L. y España, J.E. (2005). Caracterización de poli-(hidroxibutirato - co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides*, FLB2. *Revista centro de estudios en salud* 1 (6), 1-10.
- Gómez, J.R. (2013). *Producción y caracterización de polihidroxialcanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de Residuos grasos*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- González, Y.; Meza, J.C.; González, O. y Córdova, J.A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1), 77-115.

- Grados, R.; Álvarez M.T.; Gimenez A. y Mattiasson, B. (2008). Degradación anaeróbica de desecho agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxialcanoatos. *Biofarbo* 16, 28-35.
- Gumel, A. M.; Annuar M. S. M. y Chisti Y. (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* 21,580–605 DOI 10.1007/s10924-012-0527-1.
- Huang T. Y.; Duan, K. J.; Huang, S. Y. (2006). Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal Ind Microbiological Biotechnology* 33. 701-706.
- Ieczak, J.L.; Schmidell, W. y Falcao de Aragao A.M. (2013). Highcell Highcell-density culture strategies for polyhydroxyalcanoate production: a review *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 40, 275-286.
- Industry Experts (2012). Bioplastics-A global market overview. *Industrial Biotechnology* 8,62-65.
- Jendrossek, D. and Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxy alcanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56, 403-432.
- Kasemsap, C., and Wantawin, C. (2007). Batch production of polyhydroxyalkanoate by low-polyphosphate-content activated sludge at varying pH. *Bioresource Technology* 98, 1020-1027.
- Khanna, S. and Srivastava A.K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 40, 2173-2182.
- Kulpreecha, S.; Boonruangthavorn, A.; Meksiriporn, B. and Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107(3):240-245.
- Lee, S. Y. (1996a). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 1-14.
- Lee, S.Y. (1996b). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalcanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology* 14 (11), 431-438.
- Lee, S.Y. and Choi, J. (2001). Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. T. Scheper. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 71, 183–207.
- Lemos, P. C.; Viana, C.; Salgueiro, E. N.; Ramos, A. M.; Crespo, J. P. S. G. and Reis, M. A. M. (1998). Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture. *Enzyme Microbial Technology* 22, 662–671.
- Lenz, R. and Marchessault, R. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6,1-8.
- Madison L. and Huisman, W. (1999). Microbiology and Molecular *Biology Reviews* 63, 21
- Naranjo, J.M. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos Agroindustriales*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Manizales. Colombia.
- Ojumu, T.V.; Yu, J. and Solomon, B.O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* 3 (1): 18-24.
- Ortiz, E. (2009). *Obtención, aislamiento e identificación de cepas bacterianas presuntas productoras de poli-β-hidroxialcanoatos (PHA's)*. (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana. Mexico.
- Punrattanasin, W. (2001). *The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics*. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Environmental Science and Engineering.
- Priyadarshi, S.; Borse, B.B. and Shukla, A. (2014). Polyhydroxyalkanoates: Role of *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biomedical And Advance Research* 05 (02).

- Reddy, C.S.K.; Kalia, V.C. and Rashm, C. R. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 87, 137–146.
- Rosas, N. (2008). Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 10(1), 49-63. Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/1395/2010>.
- Salehizadeh H. and Van Loosdrecht M.C.M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 22, 261-279.
- Salazar, D. (2010). *Estudio del desarrollo industrial en la producción de polihidroxiálcanoatos en la primera década del siglo XXI* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia
- Sánchez, S. A.; Marín, M.A.; Mora, A.L. y Yepes M.S. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxiálcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (29), 89-100.
- Serrano, J.Y. (2010). Polihidroxiálcanoatos (PHA's): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Revista Teoría y Praxis investigativa*, 5 (2), 79-84.
- Rivera, L.R. y Nevárez, G. V. (2009). Fuentes de carbono económicas para la producción de bioplásticos bacterianos. *Tecnociencia*, 3 (2), 58-63.
- Rozsa, C.; Dupeyrón, D.; Galego, N.; Cyras, V. y Vázquez, A. (2004). Miscibilidad de mezclas poliméricas de polihidroxiálcanoatos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5 (2), 55-66.
- Scherer, T.M.; Fuller, R.C.; Lenz, R.W. and Goodwin, S. (1999). Hydrolysis activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters. *Polymer Degradation and Stability* 64, 267-275.
- Sudesh, K.; Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25 (10), 1503-1555.
- Suwannasing, W.; Moonarmart, S. and Kaewkannetra P. (2012). *Production of polyhydroxyalkanoates (phas): effect of agricultural medium composition as carbon sources by statistical methodology*. 1st Mae Fah Luang University International Conference 2012.
- Vergara, B.; López, M.R. y Pérez, F. (2012). *Una perspectiva de los polihidroxiálcanoatos bacterianos*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mexico.
- Verlinden R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. A.; Williams, C. D. and Radecka I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102:1437-1449.
- Wang, F. y Lee S.Y. (1997). Poly (3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer-content by a fed-batch culture of *Alcaligenes lactus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9), 3703-3706.
- Wendlandt D.; Geyer W.; Mirschel G. (2005). Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *Journal of Biotechnology*. 117, 119-129.
- Zhao W. and Chen G.Q. (2007). Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes PHA-AB. *Process Biochemistry*. 42, 1342-1347.