

RESEÑA ANALÍTICA

Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxitirato por *Rhizobium tropici*

Yuliet Franco, Gretel Gómez,* Roberto Núñez** y Jorge Martínez.†***

Instituto de Investigaciones en Sanidad Vegetal. Calle 110 No. 514, Playa. Código Postal 11600, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: yfranco@inisav.cu *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, kilómetro 3½, Carretera a Tapaste, Gaveta Postal 1, San José de La Lajas, La Habana. **Centro de Bioproductos Marinos, Loma entre 35 y 37, Plaza de la Revolución, Código Postal 10600, Ciudad de La Habana. ***Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Calle 25 No. 455, El Vedado, Código Postal 10400, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 31 de marzo de 2008. Aceptado: 12 de noviembre de 2008.

Palabras clave: polihidroxitirato, PHB, bioplásticos, *Rhizobium tropici*, optimización del proceso de fermentación.

Key words: markers polyhydroxybutyrate, PHB, biopolymers, *Rhizobium tropici*, optimization of fermentation process.

RESUMEN. Los polihidroxiácidos (PHAs), son poliésteres acumulados intracelularmente como materiales de reserva de carbono y energía por varios microorganismos. El representante más común de esta familia es el poli-β-hidroxitirato (PHB). Estos biopolímeros se consideran buenos sustitutos de los plásticos sintéticos derivados del petróleo por ser biodegradables. Sin embargo, la mayor desventaja para la comercialización de los PHA son sus elevados costos de producción comparados con los plásticos derivados del petróleo. La optimización del proceso de fermentación, es una de las estrategias más utilizadas para reducir estos costos. Este trabajo tuvo como objetivos determinar el valor óptimo de pH inicial de la fermentación para la producción de PHB, así como optimizar las condiciones de agitación y aeración del proceso para el rendimiento producto biomasa y para la acumulación de PHB por la cepa *Rhizobium tropici* 3. La optimización del pH inicial se realizó en zaranda orbital ajustando el valor entre 6 y 8 y se modeló la relación entre el pH y la concentración de PHB ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) mediante la utilización de polinomios ortogonales. Se definió que el pH inicial óptimo con el cual se asegura la mayor producción de PHB es $6,58 \pm 0,2$. La búsqueda de los valores óptimos de agitación-aeración para la producción de PHB y para el rendimiento producto-biomasa, se realizó mediante el empleo de un diseño central compuesto Box-Wilson. Las fermentaciones se realizaron en un fermentador de 7,5 L con 5 L de medio de cultivo optimizado. Se determinó que los valores óptimos para la producción fueron $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y 1 vvm (volumen de aire por minuto por volumen de medio de cultivo) para la agitación y la aeración respectivamente y para el rendimiento producto-biomasa, los valores óptimos fueron $472 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y 1,55 vvm.

ABSTRACT. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters intracellularly accumulated by various microorganisms as carbon and energy storage materials. The most common representative is poly-β-hydroxybutyrate (PHB). These biopolymers have been considered to be good substitutes for petroleum-derived synthetic plastics because of their similar properties to synthetic polymers and its complete biodegradability after disposal. Nevertheless a major drawback to the commercialisation of PHAs is their much higher production cost compared with petrochemical-based synthetic plastic materials. Optimization of fermentation process is one of the strategies more used to reducing high production costs of PHB. The aims of this work were to determine the optimal initial pH value for PHB production, as well as to optimize the agitation-aeration conditions of the fermentation process for product-biomass yield and for PHB accumulation by *Rhizobium tropici* strain 3. Optimization of initial pH was carried out in an orbital shaker. The pH values were adjusted between 6 and 8. The relation between pH and PHB concentration ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) was modelled by using orthogonal polynomials. The optimal pH that assures the biggest PHB production is 6.58 ± 0.2 . As statistical tools, a central compose design Box-Wilson was used to search the optimal values of two important variables in fermentation process: agitation-aeration rates, for PHB production and for product-biomass yield. The fermentations were carried out in a bioreactor with 7.5 L capacity with 5 L of optimum culture medium. It was determined that optimal values to obtain a maximum PHB production are $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and 1 vvm (volumes of air per minute per volume of batch) for agitation and aeration respectively and for product-biomass yield optimal values are $472 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and 1.55 vvm.

INTRODUCCIÓN

Los polihidroxiácidos (PHAs) son polímeros biodegradables sintetizados por numerosos géneros bacterianos en respuesta a estrés ambiental y desbalance nutricional.¹ Debido a que poseen propiedades similares a las del polietileno y a que son convertidos en abono o degradados en un tiempo promedio de 6 a 12 meses cuando se exponen a la microbiota del suelo y a los sedimentos marinos,^{2,3} resultan buenos candidatos para

sustituir a los plásticos derivados del petróleo, los cuales tardan desde 40 a 50 hasta 200 años en degradarse.⁴

Uno de los PHAs más estudiados y mejor caracterizados es el poli-β-hidroxitirato (PHB), un homopolímero constituido por monómeros de β-hidroxitirato. Entre sus usos más frecuentes está la fabricación de envases para diferentes productos: de limpieza, farmacéuticos, entre otros. Además, por ser biocompatible y fácilmente absorbido por el organismo puede ser empleado en el

área médico farmacéutica para la fabricación de prótesis, hilos de sutura y cápsulas que liberan los medicamentos al torrente sanguíneo lentamente.⁵

A pesar de las ventajas ambientales de estos bioplásticos frente a los plásticos derivados del petróleo, los elevados costos de producción constituyen una objeción para su rentabilidad industrial.⁶ Las investigaciones realizadas sobre los PHA en los últimos años apuntan a reducir estos costos y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias. Para lograr estos objetivos es fundamental optimizar el proceso de fermentación, facilitar la purificación del polímero y fundamentalmente, abaratar el costo de los sustratos utilizados para su obtención. También se realiza la búsqueda de nuevas cepas productoras.⁷ Una estrategia alternativa es la obtención de productos secundarios con gran valor agregado como exopolímeros y hormonas promotoras del crecimiento vegetal.⁸

Los objetivos de este trabajo fueron optimizar el pH inicial de la fermentación para la producción de PHB, así como las condiciones de agitación y aeración del proceso para el rendimiento producto biomasa y para la acumulación de PHB por la cepa *Rhizobium tropici* 3 en fermentador de 7,5 L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo empleado

En el estudio se utilizó la cepa 3 de *Rhizobium tropici* de la Colección del Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.

Medios de cultivo

Todas las fermentaciones se realizaron en un medio de cultivo optimizado para el rendimiento PHB-biomasa (YP/X)⁹ el cual presenta la composición siguiente: (g · L⁻¹) sacarosa, 13; extracto de levadura 5,8 y extracto de suelo (80 mL/L).

Determinación cuantitativa de PHB

Cada muestra de 1 mL se centrifugó en equipo Eppendorf a 10 000 r · min⁻¹ durante 10 min, se lavó y se digirió en disolución de hipoclorito de sodio 5 % (v/v) (Cl- libre) con EDTA 10 mmol/L, colocándola a 37 °C durante una hora y media. Luego, se centrifugó y se lavó primero con agua destilada y posteriormente, con acetona (0,2 mL). Finalmente, la biomasa se lavó con etanol (1 mL) y se dejó secar. La muestra se digirió con ácido sulfúrico 80 % (v/v) durante 30 min a 90 °C y se midió la absorbancia a 214 nm en espectrofotómetro PYE UNICAM PU 8610 UV/VIS.¹⁰ Las muestras con absorbancias que excedieron a 0,8, se diluyeron con H₂SO₄ 7 mmol/L.¹¹ La concentración de PHB (g · L⁻¹) se calculó según una curva patrón de PHB puro, cuya expresión matemática fue:

$$y = 0,02x \quad r^2 = 0,89.$$

Determinación del peso seco celular

El peso seco de los cultivos se determinó contra una curva de calibración realizada con un cultivo, al cual se le practicaron diluciones y a cada una se le determinó la absorbancia a 650 nm, se centrifugaron y secaron a 80 °C hasta peso constante. La curva de calibración se graficó como absorbancia contra peso seco, la cual fue representada por la expresión siguiente:

$$y = 4,77x - 0,71 \text{ (gramos de biomasa seca} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}, \quad r^2 = 0,98.$$

Optimización del pH inicial de la fermentación

El estudio se realizó en zaranda orbital a 70 r · min⁻¹ y (30 ± 2) °C, en frascos de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, durante 36 h. El pH se ajustó en un intervalo entre 6 y 8 con NaOH o HCl 1 mol/L según el caso. Se modeló la relación entre pH y la concentración de PHB (g · L⁻¹). Para la búsqueda del óptimo, se siguió un diseño factorial completo, en el cual se realizó un ajuste de polinomios ortogonales. Al polinomio obtenido se le determinó la primera y segunda derivadas (δY/δX), lo que permitió determinar el pH óptimo para la máxima producción de PHB.

Optimización de las condiciones de agitación-aeración

Se utilizó un diseño central compuesto Box-Wilson¹² para evaluar el efecto de la agitación-aeración y su interacción sobre la producción de PHB y el rendimiento producto-biomasa YP/X, así como para determinar sus valores óptimos (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Matriz codificada del diseño central compuesto Box-Wilson.

Experimento	Factor	
	X ₁	X ₂
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	-α	0
8	α	0
9	0	-α
10	0	α
11	0	0

α = 1,414 2. X₁ Agitación. X₂ Aeración.

Tabla 2. Variables independientes y niveles empleados en el diseño central compuesto.

Variables	Nivel		
	Bajo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
X ₁ [Agitación (r · min ⁻¹)]	300	500	700
X ₂ [Aeración (vvm)]	0,5	1	1,5

vvm Volumen de aire por volumen de medio de cultivo.

Las fermentaciones correspondientes al diseño experimental empleado se realizaron en fermentador Inforst HT con vaso de 7,5 L, impelente de turbina de 6 cm y controles automatizados de temperatura, agitación y aeración, con 5 L de medio del cultivo optimizado y toma de muestras (5 mL) mediante puerto estéril, cada 2 h. La temperatura fue controlada a (30 ± 2,0) °C y el pH inicial óptimo. Los otros parámetros de la fermentación permanecieron constantes.

Se realizaron tres repeticiones en el centro del plan del diseño. Todos los cálculos, procesamientos estadísticos y gráficos tridimensionales de superficie se reali-

zaron con el paquete de programas Statistica TM para Windows, Versión 5,0, Stat Soft.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del pH inicial de la fermentación

Es bien conocido, según lo señalado por el manual Bergey,¹³ que el rango óptimo de pH para el crecimiento del género *Rhizobium* se encuentra entre 6-7. Sin embargo, el pH también influye notablemente en la producción de metabolitos secundarios. En este estudio se empleó un medio de cultivo optimizado en zaranda,⁹ por lo tanto, la búsqueda del pH óptimo para la producción de PHB en esta misma escala complementa una fase preliminar del proceso de optimización.

El pH inicial del medio de cultivo para esta cepa, debe garantizar que hacia el final de la fermentación los caldos no se acidifiquen de forma significativa y así las células sean viables pues el objetivo final de estos procesos es la obtención de biomasa para la extracción del polímero. Por otro lado, al ser la fermentación relativamente corta, en lugar de ajustar durante todo el proceso, solo es necesario realizar la optimización del pH inicial.

Luego de aplicar el análisis matemático al modelo obtenido, dado por la ecuación (a), se determinó que el valor óptimo de pH inicial, con el cual se alcanzan los máximos valores de PHB, es $6,58 \pm 0,2$ (Fig. 1). Este valor de pH óptimo se encuentra dentro del rango óptimo para el crecimiento de esta bacteria, de modo que esta condición no afecta la obtención de biomasa.

Optimización de las condiciones de agitación-aeración

Los rendimientos más elevados se produjeron cuando los valores de las variables independientes correspondieron al centro del plan (Tabla 3) y tuvieron una adecuada reproducibilidad, lo cual le confirió gran fortaleza y confiabilidad al diseño estadístico.

En los valores mínimos del plan se produjeron también los mínimos de rendimiento y esto es lógico, pues aunque niveles bajos de aeración favorecen la producción de PHB,⁹ valores bajos de agitación no permiten un adecuado crecimiento. Si se comparan los resultados de la fermentación 1 con la 2, se observa que con el aumento de la agitación, mejora el rendimiento.

Las ecuaciones de regresión que describen los datos experimentales obtenidos para las variables dependientes, $Y_{p/x}$ y producción de PHB ($g \cdot L^{-1}$) fueron:

$$Y_{p/x} = 19,33 - 0,94 X_1 + 2,56 X_2 - 2,88 X_1^2 - 4,06 X_1 X_2 - 4,34 X_2^2 \quad r^2 = 0,79$$

$$PHB (g \cdot L^{-1}) = 3,80 - 0,04 X_1 + 0,47 X_2 - 0,69 X_1^2 + 0,03 X_1 X_2 - 0,99 X_2^2 \quad r^2 = 0,86$$

El análisis estadístico mostró que la aeración tuvo una influencia significativa tanto en la producción de PHB como en el rendimiento, pues sus correspondientes coeficientes de regresión fueron significativos para un intervalo de confianza del 95 %. El signo de los coeficientes de aeración (X2) indica que este factor tuvo un efecto positivo sobre ambas variables de respuesta. El término $X_1 X_2$ representa la interacción entre la agitación y la aeración, la cual influyó significativamente solamente en el rendimiento, pues este coeficiente fue significativo para un intervalo de confianza de 95 %, no siendo así para la producción del polímero. Los términos elevados al cuadrado no tienen significado fisiológico, son coeficientes de ajuste del modelo que demuestran que hay curvatura y que puede existir un óptimo local.

A partir de las ecuaciones anteriores, se obtuvieron las superficies respuestas y de contorno para la producción de PHB y para el rendimiento producto-biomasa (Figuras 2 y 3). Para ambas variables respuesta se observó un óptimo local para la zona de estudio (Figuras 2 y 3).

El círculo concéntrico más pequeño de la superficie de contorno (Fig. 2), representa el rango de valores codificados de agitación-aeración donde la producción de PHB alcanzó sus máximos valores. Esta región va desde 470 a 530 $r \cdot min^{-1}$ y de 0,8 a 1,61 vvm, muy cercana a los de los niveles centrales. En el caso del rendimiento la región de valores óptimos se halla desplazada de los valores centrales, y va desde 440 hasta 510 $r \cdot min^{-1}$ y desde 1 hasta 2,1 vvm (Fig. 3). Esta variación con respecto a la región del óptimo para la producción, se puede explicar señalando que aquí se trata de rendimiento producto-biomasa y no simplemente producción, por lo cual estos resultados indican que se obtienen mejores rendimientos disminuyendo ligeramente la agitación, al parecer debido a que el microorganismo es sensible a los efectos cortantes; pero al disminuir la agitación es necesario aumentar la aeración para lograr una mayor biomasa para un mismo estadio fisiológico del microorganismo.

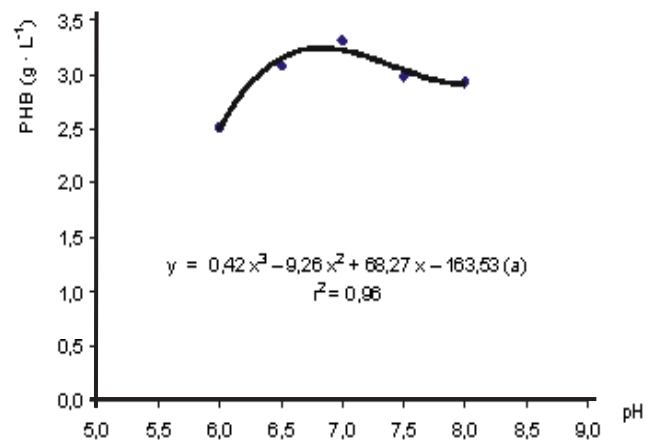


Fig. 1. Influencia del pH inicial sobre la producción de PHB por *Rhizobium tropici* cepa 3 crecido durante 36 h en el medio optimizado⁹ en zaranda orbital a 70 $r \cdot min^{-1}$ y $(30 \pm 2) ^\circ C$.

Tabla 3. Matriz codificada del diseño central compuesto y los resultados observados para las variables de respuesta, concentración de PHB ($g \cdot L^{-1}$) y $Y_{p/x}$. $\alpha = 1,414 2$.

Experimento	Factor		Variable de respuesta	
	X_1	X_2	PHB ($g \cdot L^{-1}$)	$Y_{p/x}$
1	-1	-1	0,88	3,52
2	1	-1	1,52	16,00
3	-1	1	1,82	18,55
4	1	1	1,71	15,40
5	0	0	4,02	18,83
6	0	0	3,58	19,84
7	$-\alpha$	0	3,11	18,35
8	α	0	2,15	6,00
9	0	$-\alpha$	1,46	6,90
10	0	α	2,82	11,60
11	0	0	3,80	19,33

X1 Agitación. X2 Aeración.

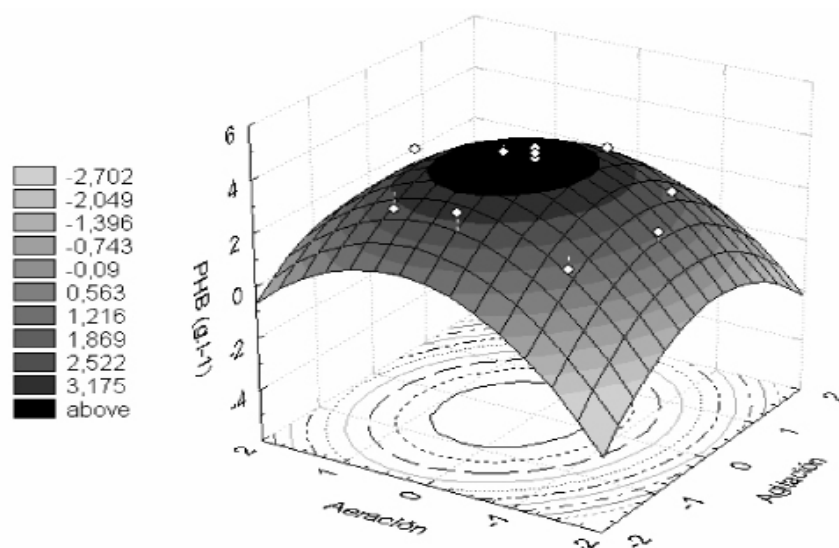


Fig. 2. Gráfico de superficies de respuesta y de contorno mostrando el efecto de la agitación y la aeración sobre la producción de PHB en fermentador 7,5 L. La temperatura fue controlada a $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$, pH inicial $6,58 \pm 0,2$.

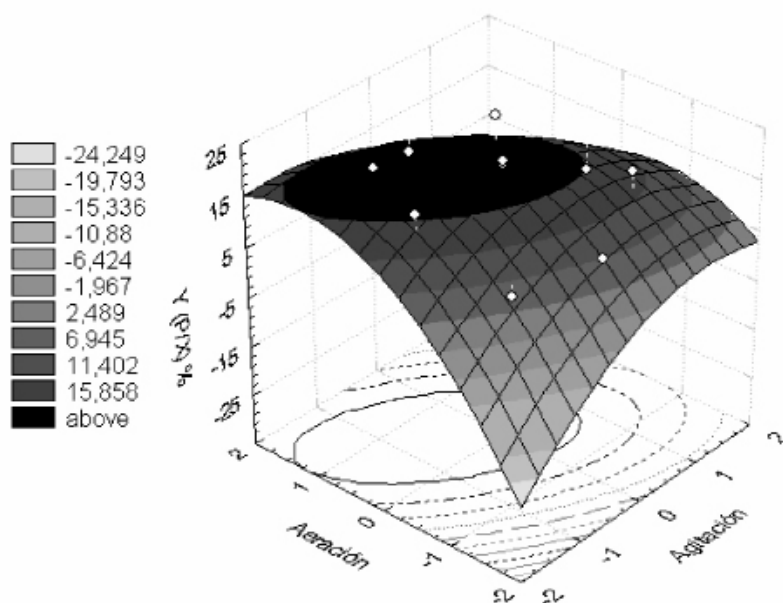


Fig. 3. Gráfico de superficies de respuesta y de contorno mostrando el efecto de la agitación y la aeración sobre el rendimiento producto-biomasa en fermentador de 7,5 L. La temperatura fue controlada a $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$, pH inicial $6,58 \pm 0,2$.

Mediante el análisis numérico, basado en la solución del sistema de derivadas parciales para las variables independientes, se obtuvo el valor correspondiente al óptimo local para cada parámetro estudiado. En el caso del rendimiento, los valores máximos se logran con $472 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y $1,55 \text{ vvm}$, mientras que para la producción de PHB estos valores coinciden con los del nivel central del plan factorial, $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y 1 vvm . Estos últimos fueron seleccionados tomando como referencia estudios para otras Rhizobiaceae (Ej.: *Mesorhizobium plurifarium*⁹). Los resultados demostraron la idoneidad del centro del plan.

Las zonas de óptimo de ambas variables respuestas (Figuras 2 y 3) se solapan en una región de valores codificados que corresponden a los de agitación-aeración de 470 hasta $510 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y de 1 a $1,61 \text{ vvm}$. Este rango de valores garantiza los máximos para ambas variables de respuesta, sin que ninguna de las dos se vea afectada y además, permite trabajar con un margen de

error, lo cual es sumamente favorable para el escalado del proceso, donde se hace más difícil el control de los parámetros.

El perfil de fermentación para los valores centrales del diseño de optimización agitación-aeración muestra una curva de crecimiento típica, con una fase de adaptación de dos horas y una fase exponencial que dura desde las dos hasta las ocho horas (Fig. 4). La velocidad específica de crecimiento durante esta última fase es de $0,31 \text{ h}^{-1}$. La fase estacionaria se extiende desde las 10 hasta las 20 h donde se detiene la fermentación.

Durante las primeras horas de fermentación, la producción de PHB es baja, concordando con lo planteado por Yamane, Fukunaga y Lee¹⁴ de que la mayoría de las especies bacterianas producen muy poco PHA durante la fase exponencial del crecimiento discontinuo. La dinámica de la producción de PHB sigue un perfil típico de la reacciones de tipo III según Gaden, o sea no asociada al crecimiento, lo cual se corresponde a un producto

del metabolismo secundario. Esto está en concordancia con que el PHB sea un material de reserva.¹⁵

Después de las 10 h, ocurre un aumento brusco en la producción del polímero, que logra estabilizarse entre las 12 y 20 h, con una producción en aumento de aproximadamente $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a las 20 h.

Entre las 10 y 20 h de fermentación la productividad alcanza $0,34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, no muy elevada comparada con otras reportadas, pero de muy buen valor para una cepa salvaje, ya que Nikel *et al.*,⁶ con el empleo de un medio de cultivo optimizado obtuvieron una concentración de PHB, un rendimiento y una productividad de 29,68, 62,74 y $0,62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente; pero se utilizó una cepa de *Escherichia coli* recombinante que contenía genes para la biosíntesis de PHB.

Por otra parte, Barbosa *et al.*¹⁵ con *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 y con diferentes combinaciones de fermentaciones por lote alimentado en 3 L, obtuvieron productividades de 0,05 hasta $0,12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, valores inferiores a los obtenidos en el presente estudio, sin embargo, informaron mayores rendimientos productivo-biomasa, entre 57 y 66 %.

Türesin *et al.*¹⁶ informaron concentraciones de PHB similares a las obtenidas aquí. Mediante tres variantes diferentes de cultivo por lote incrementado y el empleo de *Alcaligenes latus*, se obtuvieron 2,83; 4,61 y $6,43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PHB. Sin embargo, los rendimientos alcanzados (33,60; 35,80 y 47,30 %) fueron superiores a los obtenidos en este trabajo, aunque es válido destacar que la tecnología de fermentación utilizada no fue la misma.

Si bien las concentraciones de PHB y los rendimientos obtenidos fueron inferiores a algunos informados, es importante tener presente que el medio de cultivo en que se realizó la fermentación es muy barato y asequible. Otro aspecto a considerar es que la cepa de *Rhizobium tropici* utilizada, bajo las mejores condiciones de acumulación del polímero, en el mismo medio empleado para la producción y sin necesidad de añadirle triptófano como precursor, es capaz de producir ácido indolacético (AIA)¹⁰ que es un tipo de hormona promotora del crecimiento vegetal, lo cual aumenta el valor agregado y constituye además, una vía para reducir los costos del polímero, ya que el AIA es un producto caro en el mercado.

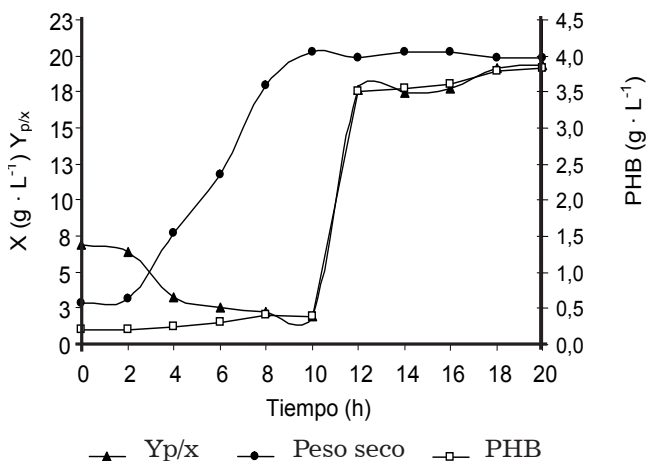


Fig. 4. Perfil típico de la fermentación de *Rhizobium tropici* cepa 3 a $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y 1 vvm, en equipo INFORS HT con vaso de 7,5 L, con 5 L efectivos de medio y con controles automatizados de temperatura, agitación y aeración, a $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ y pH inicial de $6,58 \pm 0,2$, así como medio de cultivo optimizado.⁹

CONCLUSIONES

En los procesos fermentativos microbianos es necesaria la optimización del medio de cultivo y de las condiciones ambientales para explotar completamente el potencial de las cepas seleccionadas y garantizar que el proceso sea económico. Los resultados permitieron concluir que el pH inicial óptimo para la producción de PHB es $6,58 \pm 0,2$ y que las condiciones de agitación-aeración que garantizan resultados óptimos de producción de PHB y de rendimiento (YP/X) son $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y 1 vvm y $472 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ y 1,55 vvm, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Khanna S. and Srivastava A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, **Process Biochem.**, **40**, 607-619, 2005.
- Jendrossek D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **74**, 1186-1196, 2007.
- Steinbüchel A. Biopolymers, Volume 10, General Aspects and Special Applications Edited by Doi Y. and Steinbüchel A., Ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 95-200, 2003.
- Coutinho B., Miranda G., Sampaio G., De Souza L., Santana W. and Coutinho H. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável), **Holos**, Ano 20, dezembro, 76-81, 2004.
- Bohmert K., Balbo I., Steinbüchel A., Tischendorf G. and Willmitzer L. Constitutive Expression of the Ketothiolase Gene in Transgenic Plants, A Major Obstacle for obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants, **Plant Physiol.**, **128**, 1282-1290, 2002.
- Nikel P., Pettinari M.J., Méndez B. and Galvagno M. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly (3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts **International Microbiology**, **8**, 243-250, 2005.
- De Almeida A., Ruiz J., López N. y Pettinari M. Bioplásticos: una alternativa ecológica, *Química Viva*, Número 3, año 3, septiembre, 2004. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/> (Consultado: 28 de febrero de 2008.)
- Martínez J., Carballo M.E., Lasala F., Careaga Z. y Solano R. ¿Plásticos bacterianos? IV Congreso Internacional de Química, **Rev. Cubana de Química**, **XIII**, 110, 2001.
- Lasala F., Martínez J., Núñez R., Rozsa Ch., Galego N., Carballo M.E. y Solano R. Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias diazótroficas II. Estudio de la biosíntesis a escala de zaranda con *Mesorhizobium plurifarium* (4033) **Revista Biología**, **18**, 136-146, 2004.
- Careaga Z. Producción de poli-β-hidroxibutirato en un medio simple por una cepa de *Rhizobium tropici*. Trabajo de diploma, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, junio, 1999.
- Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Sengupta D.K., Page W. J. and Phillips T.E. Colonial opacity variations among the Choleraogenic vibrios, **Microbiology**, **143**, 23-34, 1997.
- Box G. and Wilson K. On the experimental attainment of optimum conditions. **J. Roy. Statist. Soc. Ser., B** **13**, 1-45, 1951.
- Holt J.G., Krug N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. Bergey's Manual of determinative Bacteriology, Ninth Edition, William and Wilkins, Baltimore, 235-242, 1994.
- Yamane T., Fukunaga M. and Lee Y.W. Increased PHB productivity by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth associated PHB producer, **Biotechnol. Bioeng.**, **50**, 197-202, 1996.
- Barbosa M., Espinosa A., Malagón D. y Moreno N. Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697, **Universitas Scientiarum**, **10**, 45-54, 2005.
- Türesin F., Gümüşyazici Z., Kök F.N., Gürsel U., Alaaddinoğlu N.G. y Hasirci V. Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate and its Copolymers and Their Use in Controlled Drug Release. **Turk. J. Med Sci.**, **30**, 535-541, 2000.