



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

**BIOPOLÍMEROS DE INTERÉS INDUSTRIAL. SÍNTESIS Y
CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)**

JIMMY ANDRÉS LÓPEZ JIMÉNEZ

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

**BIOPOLÍMEROS DE INTERÉS INDUSTRIAL. SÍNTESIS Y
CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)**

JIMMY ANDRÉS LÓPEZ JIMÉNEZ

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2011

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre Abril de 2006 y Marzo de 2011, bajo la dirección del Dr. Marcelo Armando Villar, Profesor Titular de la Universidad Nacional del Sur e Investigador Principal del CONICET.

Jimmy Andrés López Jiménez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de (.....)

Agradecimientos

Esta tesis doctoral fue desarrollada principalmente en la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI-UNS-CONICET) con un par de estadías en la Universidad Nacional de Colombia y la Agricultural University of Athens (AUA). Durante el transcurso de estos cinco años recibí el apoyo de muchas personas y ahora es el momento para agradecerles:

A mi madre, mi hermana y toda a toda mi familia, que a pesar de la distancia han sabido estar siempre presentes, gracias también por el apoyo de siempre y por darme día a día ese amor tan grande,

A mi esposa y amiga, por su amor, su entrega, su comprensión, su enorme corazón, y por estar siempre junto a mí,

A mi director de tesis, Dr. Marcelo Villar, por su valiosa ayuda, soporte, y por su amistosa y constante guía durante estos 5 años. Gracias por haberme dado la oportunidad de venir a este lindo país y confiar en mi trabajo,

A mi supervisor a distancia, el Dr. Apostolis Koutinas, por haberme dado la oportunidad de aprender tantas cosas interesantes y por haber hecho tan satisfactoria mi estadía en Grecia. Gracias por la confianza,

A la Dra. Maria Amelia Cubitto, en el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, de la UNS, por su valiosa ayuda para introducirme en el mundo de la microbiología y de los polihidroxicarbohidratos. Gracias también a Lorena, Gabriela, Patricia y Fernando, miembros del grupo de trabajo de Maria Amelia, por su asistencia y paciencia durante mi trabajo experimental en su laboratorio,

Al Dr. Carlos A. Cardona, por su respaldo y guía durante mi estadía en las Plantas Piloto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Gracias por las gestiones económicas durante mi viaje y por haberme incluido en su equipo de trabajo. Gracias a

Javier M. Naranjo, por su buena disposición y buena onda durante nuestro trabajo conjunto en el laboratorio,

Al Dr. Jorge Ressia (PLAPIQUI), a la Dra. Silvana Tripodi (PLAPIQUI), a Matías Méndez (PLAPIQUI), a la Dra. Olga Ines Pieroni (Departamento de Química - UNS), a la Dra. Nelda Olivera (CENPAT - Argentina), y a la Dra. Urania Kalantzi (AUA - Atenas) por su ayuda con algunas técnicas específicas,

A la Dra. Verónica Bucalá por su valiosísima ayuda durante los estudios de optimización,

A mis compañeras de trabajo en AUA: Maria Metsoviti, Katerina Mpelka, Foteini Tsekoura, Isabel López y Afroditi Xatzifragkou, por su gran ayuda, los buenos momentos, y la amistad,

Al personal de PLAPIQUI, que por su buena onda y gran disposición, hacen muy placentero el estar allí compartiendo con ellos,

A la gente del grupo de polímeros, especialmente a los becarios, por compartir momentos tan divertidos y agradables,

A mis amigos en Bahía que hicieron de estos 5 años una época muy placentera, llena de lindos recuerdos, gracias especiales a la Rolis y a Gus por estar tan presentes desde mi llegada y por haberme extendido ese brazo amigo,

A CONICET y UNS por el apoyo financiero,

A Dios, por darme salud y bienestar, y por permitirme ir recorriendo este camino paso a paso.

A Aleyda, Leidy,

Ioana y Matías.

Resumen

El rápido y marcado progreso que se ha venido dando en los últimos años en la ciencia y tecnología de los polímeros ha creado nuevos materiales plásticos con excelentes propiedades físicas y durabilidad. Sin embargo, los productos plásticos tienen usualmente aplicaciones para un solo uso, especialmente en el envasado de alimentos y en aplicaciones médicas. Dado que estos materiales no son biodegradables pueden permanecer en la superficie de la tierra por cientos de años sin cambios considerables en su estructura. Debido a esto, se han incrementado, en los últimos años, los intereses sociales y gubernamentales de modo tal de contrarrestar los efectos nocivos para el medio ambiente; enfocándose los esfuerzos hacia la producción de nuevos materiales biodegradables a partir de estructuras económica y ambientalmente sostenibles. Los poli(hidroxialcanoato)s, PHAs, una gran familia de biopolíesteres naturales, son una de las alternativas más viable para la sustitución de plásticos de origen petroquímico.

En esta tesis se hace una contribución tanto a nivel experimental como teórica con el objetivo de mejorar las técnicas actuales asociadas a la producción de PHAs. Fueron empleadas diferentes cepas productoras de PHAs bajo diversas condiciones nutricionales, en medios sintéticos como complejos. Además fueron obtenidos nuevos esquemas de biorrefinerías para la producción de PHAs mediante el uso de materias primas renovables como topinambur, residuos de semillas de canola y glicerol. Por otro lado, se emplearon técnicas de optimización dinámica enfocadas a la maximización de la productividad de los PHAs en fermentaciones semicontinuas. Finalmente, los PHAs obtenidos a partir del trabajo experimental fueron identificados y caracterizados mediante el uso de diversas técnicas analíticas de polímeros.

En general, los aportes experimentales y teóricos de esta tesis constituyen una potencial aplicación a esquemas actuales de producción de biopoliésteres naturales de origen microbiano. Además, los resultados experimentales obtenidos representan un importante punto de partida en el estudio de la biosíntesis de diferentes copolímeros de PHAs a partir de sistemas biotecnológicos económicos y complejos, como los desarrollados a partir de los esquemas de bioproceso que emplean topinambur, residuos de semillas de canola y glicerol.

Abstract

The rapid and marked progress that has been occurring in polymer science and technology during the last years has created new plastic materials with excellent physical properties and durability. However, plastics are usually single-use, especially in food packaging and medical applications. Since these materials are not biodegradable, they can remain on the earth surface for hundreds of years without significant changes in their structure. Because of this, nowadays, social and governmental interests have considerably increased aiming to offsetting the adverse effects of synthetic polymers on the environment. These efforts are being focused on the production of new biodegradable materials from economically and environmentally sustainable structures. Poly(hydroxyalkanoate)s, PHAs, a large family of natural biopolyesters, are one of the more viable alternative in order to replace petrochemical-based plastics.

This thesis makes a contribution both at experimental and theoretical level to improve current techniques associated to the whole PHAs production process. Different PHA-producer strains were used by implementing different nutritional culture conditions on both synthetic and complex media. In addition, new biorefinery structures for PHAs production were obtained through renewable feedstock material such as Jerusalem artichoke, rapeseed cake, and glycerol. On the other hand, dynamic optimization techniques were used in order to maximize the productivity of PHAs. Finally, the PHAs obtained from the experimental work were identified and characterized by several analytical techniques.

Overall, the experimental and theoretical contributions developed in this thesis represent a potential application to current developments in production of natural microbial

polyesters. In addition, the experimental results represent an important start point in the study of the biosynthesis of different hydroxyalkanoates-based copolymers from inexpensive and complex biotechnological systems, such as those developed from bioprocess schemes based on Jerusalem artichoke, rapeseed cake, and waste glycerol.

Índice

Índice de Tablas	i
Índice de Figuras	ii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Introducción	1
1.2. Organización de la Tesis	6
1.3. Referencias	7
Capítulo 2: Estado del arte de los poli(hidroxicanoato)s, objetivos y plan de trabajo	11
2.1. Introducción	11
2.2. Historia del PHB y los PHAs	12
2.2.1. Descubrimiento del PHB	13
2.2.2. Re-descubrimiento del PHB	14
2.2.3. Identificación de los PHAs	15
2.2.4. Crecimiento del interés en ciencia y tecnología de los PHAs	18
2.3. Biosíntesis de los PHAs	19
2.3.1. Producción de PHAs a partir de diferentes bacterias	21
2.3.1.1. <i>Cupriavidus necator</i>	20
2.3.1.2. <i>Escherichia coli</i> recombinante	22
2.3.1.3. <i>Pseudomonas sp.</i>	23
2.3.1.4. <i>Bukholderia cepacia</i>	23
2.3.1.5. <i>Alcaligenes latus</i>	24
2.3.1.6. <i>Bacillus sp.</i>	24
2.3.1.7. Comparación entre algunas bacterias productoras de PHAs.	26
2.4. Propiedades físicas y biológicas	26
2.4.1. Propiedades físicas	26
2.4.2. Propiedades biológicas	29
2.5. Materias primas – Biorrefinerías	32
2.5.1. Suero de leche	34
2.5.2. Almidón	34
2.5.3. Melazas de caña	35

2.5.4. <i>Glicerol</i>	36
2.5.5. <i>Aceites vegetales</i>	36
2.5.6. <i>Producción de PHB a partir del concepto de biorrefinería</i>	38
2.6. Aplicaciones	39
2.7. Comercialización	40
2.8. Conclusiones sobre el estado del arte actual de los PHAs	43
2.9. Objetivos y plan de trabajo de esta tesis	44
2.10. Referencias	46
Capítulo 3: Producción de PHB a partir de una nueva cepa de <i>B. megaterium</i> aislada del Estuario de Bahía Blanca	59
3.1. Introducción	59
3.2. Aislamiento de cepas productoras de PHB	64
3.3. Secuenciación y caracterización de la cepa <i>Bacillus</i> sp.	68
3.4. Estudio de la extracción de PHB a partir de tres métodos diferentes	68
3.5. Fermentaciones usando <i>B. megaterium</i> BBST4	70
3.5.1. <i>Fermentaciones en agitador orbital</i>	70
3.5.2. <i>Fermentaciones en biorreactor</i>	72
3.6. Conclusiones	74
3.7. Referencias	75
Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur implementando el concepto de biorrefinería	81
4.1. Introducción	81
4.2. Producción de medio de cultivo genérico a partir de topinambur	85
4.2.1. <i>Producción de enzimas crudas a partir de SSFs</i>	85
4.2.2. <i>Hidrólisis enzimáticas de la harina de topinambur</i>	86
4.3. Fermentaciones bacterianas en Erlenmeyers	92
4.4. Conclusiones	101
4.5. Referencias	102

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de los subproductos generados de la producción industrial de biodiesel	109
5.1. Introducción	109
5.2. Producción de PHAs a partir de residuos sólidos de canola y glicerol crudo	113
5.2.1. <i>Producción de medio de cultivo</i>	113
5.2.2. <i>Análisis de la producción de PHB a nivel de agitador orbital usando medio nutritivo y glicerol puro</i>	115
5.2.3. <i>Efecto de las impurezas presentes en el glicerol crudo sobre la producción de PHB</i>	119
5.3. Conclusiones	122
5.4. Referencias	123
Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos	129
6.1. Introducción	129
6.2. Estructura química a partir de FTIR y ¹ H- y ¹³ C-NMR	131
6.2.1. <i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier</i>	131
6.2.2. <i>Resonancia magnética nuclear</i>	133
6.3. Propiedades térmicas	139
6.3.1. <i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	139
6.3.2. <i>Análisis termogravimétrico</i>	142
6.4. Conclusiones	144
6.5. Referencias	145
Capítulo 7: Aplicación de técnicas de optimización dinámica para la producción de PHB y otros metabolitos secundarios	151
7.1. Introducción	151
7.2. Descripción del método de parametrización del vector de control	155
7.3. Casos de estudio	156
7.3.1. <i>Caso de estudio I: Producción de PHB</i>	156
7.3.2. <i>Caso de estudio II: Producción de penicilina</i>	158
7.3.3. <i>Caso de estudio III: Producción de astaxantina</i>	160
7.4. Resultados y análisis	162
7.4.1. <i>Caso de estudio I: Producción de PHB a partir de C. necator</i>	163

7.4.2. <i>Caso de estudio II: Producción de penicilina a partir de P. chrysogenum</i>	166
7.4.3. <i>Caso de estudio III: Producción de astaxantina a partir de X. dendrorhous</i>	169
7.5. Conclusiones	172
7.6. Lista de símbolos	173
7.7. Referencias	175
Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros	181
8.1. Diferentes bioprocesos para la producción de PHAs	181
8.1.1. <i>Producción sostenible de PHAs a partir de cepas Bacillus</i>	181
8.1.2. <i>Producción sostenible de PHAs a partir topinambur y los residuos de la manufactura industrial del biodiesel</i>	184
8.2. Trabajos futuros	187
8.3. Referencias	189
Anexo A: Materiales y métodos	193
A.1. Materiales y métodos	193
A.1.1. <i>Reactivos</i>	193
A.1.2. <i>Materias primas de origen agrícola y subproductos industriales</i>	193
A.1.2.1. <i>Tubérculos de topinambur</i>	193
A.1.2.2. <i>Semillas de canola</i>	194
A.1.2.3. <i>Glicerol crudo</i>	194
A.2. Microorganismos	194
A.2.1. <i>Bacterias</i>	195
A.2.2. <i>Hongos filamentosos</i>	196
A.3. Fermentaciones en estado sólido	197
A.4. Medios de cultivo	197
A.4.1. <i>Medios sintéticos</i>	198
A.4.2. <i>Medios complejos</i>	198
A.5. Fermentaciones sumergidas para la producción de PHAs	200
A.5.1. <i>Fermentaciones en Erlenmeyers (shake flasks)</i>	200
A.5.2. <i>Fermentaciones en biorreactor</i>	201

A.5.3. Muestreo	202
A.6. Extracción de los PHAs obtenidos por fermentación	203
A.6.1. Digestión + extracción en Soxhlet	203
A.6.2. Dispersión–extracción con cloroformo e hipoclorito de sodio	203
A.6.3. Extracción con Soxhlet	204
A.7. Métodos analíticos	204
A.7.1. Determinación del contenido de humedad	204
A.7.2. Determinación del contenido de cenizas	205
A.7.3. Concentración de fuentes de carbono	205
A.7.4. Concentración de azúcares totales e inulina	206
A.7.5. Concentración de aminoácidos libres (FAN)	208
A.7.6. Concentración de fósforo	209
A.7.7. Concentración de biomasa celular	211
A.7.8. Concentración de P(3HB) y P(3HB-co-3HV)	211
A.7.9. Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	212
A.7.10. Resonancia magnética nuclear (NMR)	213
A.7.11. Cromatografía por exclusión de tamaños (SEC)	213
A.7.12. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	213
A.7.13. Análisis termogravimétrico (TGA)	214
A.8. Referencias	214

Índice de Tablas

Tabla 2.1:	Clasificación de los poli(hidroxicanoato)s de acuerdo a la longitud del monómero (Steinbüchel y col., 1992; Steinbüchel y Valentin, 1995)	17
Tabla 2.2:	Comparación entre algunas de las bacterias productoras de PHAs en base a las fuentes de carbono que consumen y los copolímeros que producen	25
Tabla 2.3:	Comparación de diferentes propiedades físicas y mecánicas de PHAs y polímeros sintéticos (Khanna y Srivastava, 2005)	28
Tabla 2.4:	Algunos microorganismos degradadores de PHAs aislados de diferentes ambientes	32
Tabla 2.5:	Producción de PHAs a partir de fuentes de carbono renovables	37
Tabla 2.6:	Niveles de producción actuales y proyecciones futuras de las principales industrias manufactureras de PHAs alrededor del mundo (Chanprateep, 2010; Kosior y col., 2006)	42
Tabla 3.1:	Comparación entre algunas de las bacterias del género <i>Bacillus</i> productoras de PHAs en base a las fuentes de carbono que consumen y los copolímeros que producen	62
Tabla 3.2:	Propiedades taxonómicas de las bacterias de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Azotobacter</i> sp. aisladas y caracterizadas como productoras de PHB	66
Tabla 4.1:	Rendimiento de la hidrólisis enzimática empleando las enzimas producidas a diferentes tiempos de cultivo de <i>A. awamori</i>	88
Tabla 4.2:	Influencia de la concentración inicial de fructosa y FAN sobre las principales variables en fermentaciones microbianas usando medios de cultivo producidos a partir de topinambur	95
Tabla 5.1:	Composición parcial del residuo de canola (Wang y col., 2010)	113
Tabla 5.2:	Efecto de la concentración inicial de glicerol puro sobre el crecimiento de <i>C. necator</i> y sobre la acumulación de PHB en medio nutritivo a concentración constante de nutrientes (500 mg FAN/L)	116
Tabla 5.3:	Composición del glicerol crudo usado en el presente estudio	119
Tabla 6.1:	Propiedades térmicas de los PHAs producidos por diferentes micro-organismos y medios de cultivo	141
Tabla 6.2:	Variación de la temperatura de fusión del P(3HB-co-3HV) en función de la composición molar de 3HV (Pearce y Marchessault, 1994)	141
Tabla A.1:	Correlaciones para el cálculo de las diferentes concentraciones de fuentes de carbono usadas por HPLC, y sus respectivas desviaciones	206

Índice de Figuras

Figura 2.1:	Estructura química del PHB, n=100 hasta 30000	13
Figura 2.2:	Micrografía TEM de gránulos de PHB en <i>Wautersia eutropha</i> (Tian y col., 2005)	13
Figura 2.3:	Estructura química general de los PHAs y algunos comonomeros que han sido identificados, n=100 hasta 30000 (Lee, 1996a)	16
Figura 2.4:	Evolución anual en el número de publicaciones sobre PHB (●) y PHAs (○) en los últimos 45 años. Búsquedas desarrolladas en Scopus con las palabras claves: polyhydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoates, PHB, y PHAs	18
Figura 2.5:	Ruta metabólica asociada a la producción de PHB a partir de hexosas (Anderson y Dawes, 1990)	20
Figura 2.6:	Ciclo del carbono de los PHAs	30
Figura 2.7:	Biodegradación de PHAs. Botellas hechas de BIOPOL™ incubadas en lodos activados por 0, 2, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente (Sudesh y col., 2000)	31
Figura 3.1:	Fotografías de microscopia de fluorescencia de la cepa <i>Bacillus</i> sp. a dos tiempos diferentes de cultivo: (1) 20 h y (2) 48 h	67
Figura 3.2:	Micrografías obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión de la cepa <i>Bacillus</i> sp. a dos tiempos de cultivo diferentes: A) 20 h y B) 48 h	67
Figura 3.3:	(■) % Rendimiento y (□) % pureza del PHB producido a partir de <i>Alcaligenes latus</i> obtenido mediante tres métodos de extracción diferentes	70
Figura 3.4:	. Concentración de peso celular seco (■), glucosa (▲) y PHB (●) obtenido a partir de la fermentación de <i>B. megaterium</i> BBST4 en Erlen-meyers. (Concentración inicial de glucosa: 10 g/L)	71
Figura 3.5:	Concentración de peso celular seco (■), glucosa (▲) y PHB (●) obtenido a partir de la fermentación de <i>B. megaterium</i> BBST4 en Erlen-meyers. (Concentración inicial de glucosa: 20 g/L)	71
Figura 3.6:	Concentraciones de glucosa, nitrógeno y biomasa y %PHB acumulado en función del tiempo para las fermentaciones discontinua (●) y semicontinua (■) empleando <i>B. megaterium</i> BBST4	73
Figura 4.1:	Estructura química de la inulina	83
Figura 4.2:	Rendimiento de azúcares y nutrientes producidos a partir de la hidrólisis de harina de topinambur empleando las enzimas producidas a diferentes tiempos de fermentación en estado sólido usando <i>A. awamori</i> . Símbolos: (●) azúcares reductores, (■) fructosa, (▲) FAN y (▼) fósforo	87
Figura 4.3:	Perfiles de concentración obtenidos para la hidrólisis de harina de topinambur empleando las enzimas de <i>A. awamori</i> obtenidas luego de 2 días de fermentación en estado sólido. Símbolos: (●) azúcares reductores, (■) fructosa, (◆) inulina, (○) glucosa, (□) sacarosa, (▲) FAN y (▼) fósforo	90
Figura 4.4:	Concentraciones de fructosa y biomasa y % de PHB acumulado en la producción de PHB	93

	empleando un medio nutritivo y diferentes concentraciones iniciales de fructosa: (●) 10 g/L, (■) 20 g/L y (▲) 30 g/L	
Figura 4.5:	Efecto de la concentración inicial de fructosa y FAN sobre los niveles de acumulación de PHB en <i>C. necator</i> DSMZ 4058 empleando medios de cultivo producidos a partir de topinambur. Símbolos: (●) 14 g/L fructosa y (○) 28 g/L	97
Figura 4.6:	Fermentaciones para la producción de PHB con <i>C. necator</i> usando hidrolizados de topinambur y medio nutritivo. Símbolos: (●) medio nutritivo con 20 g/L de fructosa y 500 mg/L de FAN inicial, (■) hidrolizado de topinambur con 14 g/L de fructosa y 490 mg/L de FAN y (▲) hidrolizado de topinambur con 28 g/L de fructosa y 430 mg/L de FAN	99
Figura 5.1:	Perfil de concentración de nitrógeno orgánico (FAN) obtenido en la hidrólisis de residuos sólidos de canola a partir de las enzimas de <i>A. oryzae</i> producidas por fermentación en estado sólido	115
Figura 5.2:	Concentraciones de biomasa, PHB acumulado, y glicerol en la producción de PHB a partir de glicerol puro empleando un medio con una concentración inicial de glicerol de 26 g/L y una concentración inicial de FAN de 500 mg/L. Símbolos: (●) biomasa total, (■) PHB y (▲) glicerol	118
Figura 5.3:	Efecto de la concentración de K_2SO_4 sobre el crecimiento celular y la producción de PHB a partir de <i>C. necator</i> DSMZ 545 empleando como medio de cultivo hidrolizados de residuos de canola y glicerol crudo. Símbolos: (●) 2 g/L, (■) 10 g/L y (▼) 20 g/L de K_2SO_4	121
Figura 6.1:	Espectros FTIR de muestras de PHAs obtenidos a partir de diferentes microorganismos y medios de cultivo	132
Figura 6.2:	Espectros de ^{13}C -NMR a 125 MHz del PHB producido a partir de <i>B. megaterium</i> y <i>A. latus</i>	134
Figura 6.3:	Espectro de ^{13}C -NMR a 125 MHz del P(3HB-co-3HV) producido a partir de <i>C. necator</i> empleando los residuos de la producción de biodiesel (Muestra A)	135
Figura 6.4:	Espectro de ^{13}C -NMR a 125 MHz del PHA producido a partir de <i>C. necator</i> empleando residuos de la producción de biodiesel (Muestra B)	136
Figura 6.5:	Termogramas correspondientes al PHB producido a partir de <i>B. megaterium</i> y <i>A. latus</i>	139
Figura 6.6:	Análisis termogravimétrico (TGA) de los diferentes PHAs obtenidos	143
Figura 7.1:	a) Concentraciones de biomasa total, residual, y PHB, b) concentración de fructosa, c) concentración de urea, d) perfil de alimentación de fructosa y e) perfil de alimentación de urea en función del tiempo de fermentación	164
Figura 7.2:	a) Velocidad específica de crecimiento (μ), b) concentraciones de PHB y biomasa residual en función del tiempo de fermentación, y c) ruta metabólica del PHB (Anderson y Dawes, 1990)	165
Figura 7.3:	a) Evolución de la concentración de penicilina, de biomasa y de glucosa y volumen de biorreactor y b) perfil óptimo de alimentación de glucosa en función del tiempo de fermentación	167

Figura 7.4:	a) Velocidad específica de crecimiento (μ), b) concentraciones de penicilina y biomasa en función del tiempo de fermentación y c) ruta metabólica de la penicilina (Nielsen y Jørgensen, 1996)	168
Figura 7.5:	a) Concentraciones de biomasa, astaxantina, etanol y glucosa y b) perfil de alimentación de glucosa en función del tiempo de fermentación	170
Figura 7.6:	a) Velocidad específica de crecimiento (μ), b) concentraciones de astaxantina y biomasa en función del tiempo de fermentación y c) ruta metabólica de la astaxantina (Goldstein y Brown, 1990)	171
Figura 8.1:	Bioproceso propuesto para la producción de PHB a partir de topinambur y residuos sólidos de semillas oleaginosas	186
Figura 8.2:	Bioproceso propuesto para la producción de PHAs a partir de los dos principales subproductos derivados de la manufactura industrial del biodiesel	187
Figura A.1:	Biorreactor (Bioengineering, Suiza) usado en una de las etapas de esta tesis	201
Figura A.2:	Curva de calibración para el cálculo de los azúcares totales usando inulina como estándar	207
Figura A.3:	Curva de calibración para el cálculo de la concentración de fósforo en las muestras líquidas	210
Figura A.4:	Curvas de calibración para el cálculo del contenido de P(3HB) y P(3HV) a partir de cromatografía gaseosa. Correlaciones: PHB (g) = $0,013 X - 2,9 \cdot 10^{-5}$ y PHV (g) = $0,013 X - 6,4 \cdot 10^{-5}$	212

Capítulo 1: Introducción

1.1. Introducción

En la actualidad existe una diversidad de materiales fabricados a partir de plásticos sintéticos que no son biodegradables, lo cual implica un problema al momento de su desecho. Además, la manufactura de estos materiales es totalmente dependiente de fuentes no renovables como petróleo y gas, ya que las materias primas para su fabricación provienen en un 100 % de dichas fuentes. El rápido y marcado progreso que se ha venido dando en los últimos años en la ciencia y tecnología de los polímeros ha creado nuevos materiales plásticos con excelentes características físicas y durabilidad (Chanprateep, 2010). Sin embargo, los productos plásticos tienen usualmente aplicaciones para un solo uso, especialmente en el empaqueo de alimentos y en aplicaciones médicas. Debido a la no biodegradabilidad de estos materiales, después de su desecho en rellenos sanitarios y algunos otros casos dentro de ambientes marinos, estos materiales pueden permanecer en la superficie de la tierra por cientos de años sin considerables cambios en su estructura, ya que no son afectados por la degradación microbiana (Flechter, 1993). Su excesivo tamaño molecular parece ser el principal responsable para la gran resistencia de estos materiales a la biodegradación y a su persistencia en el suelo por períodos de tiempo prolongados (Atlas, 1993).

La capacidad industrial a nivel mundial para la producción de plásticos de origen petroquímico se incrementó de una manera dramática desde 1.5 millones de toneladas en 1950, hasta más de 245 millones de toneladas en 2008 (Chanprateep, 2010). Esto equivale a un crecimiento anual en la producción de 9 %. De acuerdo a valores estimados, el

Capítulo 1: Introducción

consumo anual per cápita de plásticos es de 80 Kg. en los Estados Unidos de América, de 60 Kg. en los países europeos y de 2 Kg. en países en desarrollo como los pertenecientes principalmente a América Latina y Asia (Kalia y col., 2000). Se estima que cada año es arrojada en rellenos sanitarios, después de su uso, aproximadamente el 40 % de la producción mundial de plásticos. Otros varios cientos de miles de toneladas son también descartadas en ambientes marinos y acumuladas en regiones oceánicas (Reddy y col., 2003). La incineración de desechos ha sido una de las alternativas, pero sin embargo, esta técnica es costosa y además peligrosa ya que pueden ser liberados compuestos nocivos como cloruro de hidrogeno y cianuro de hidrogeno (Atlas, 1993; Johnstone, 1990). El reciclado también presenta algunas desventajas, ya que es difícil separar la gran diversidad de plásticos, y existen además cambios en los materiales originales lo cual limita sus aplicaciones futuras (Flechter, 1993; Johnstone, 1990).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) reportó que en 1993 fueron producidas 19,2 millones de toneladas de plásticos sólo en ese país. De esta cantidad, sólo 0,7 millones de toneladas fueron usadas para reciclado y reutilización (Wilson y Strock, 1996). Por otro lado, en Europa del Este los materiales plásticos representan en los rellenos sanitarios alrededor del 7 %. Entre los mismos se encuentra principalmente polietileno/polipropileno: 65 %; poliestireno: 15 %; poli cloruro de vinilo: 10 %; entre otros (Premraj y Mukesh, 2005).

Por otra parte, en los últimos años se han incrementado los intereses sociales y gubernamentales con el principal objetivo de contrarrestar estos efectos nocivos para el medio ambiente. Es por esto que, muchos intereses están siendo abocados a la producción de materiales plásticos totalmente biodegradables y amigables con el medio ambiente (Chanprateep, 2010; Doi, 1990; Ojumu y col., 2004; Premraj y Mukesh, 2005; Zheng y col., 2005).

Capítulo 1: Introducción

Se conoce por biodegradables a aquellos materiales cuyas estructuras pueden ser reducidas o hidrolizadas a sustancias más simples por la acción de organismos vivos como hongos, levaduras y otras clases de microorganismos. Esta biodegradabilidad depende principalmente de la estructura química de los monómeros presentes en el polímero, masa molar y cristalinidad (Gu, 2003). Entre los plásticos biodegradables, los biopoliésteres están siendo ampliamente explorados en la actualidad. Son polímeros cuyos monómeros poseen enlaces éster, los cuales son fácilmente hidrolizables. Es por ello que muchos poliésteres sintéticos son biodegradables. Algunos ejemplos de poliésteres biodegradables, tanto de origen biotecnológico como sintético, son: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), y poli(hidroxialcanoato)s (PHAs).

Los PHAs son poliésteres naturales que acumulados en diversos microorganismos como fuente de carbono y energía. A la fecha, se conocen más de 100 microorganismos capaces de acumular estos poliésteres microbianos bajo condiciones limitantes en algún nutriente esencial para el crecimiento celular como N, P, S, O o Mg, y en presencia de un exceso de fuente de carbono (Doi, 1990; Lee, 1996a; b). Estos biopoliésteres son acumulados intracelularmente a niveles tan altos como un 90 % del peso seco (Anderson y Dawes, 1990; Madison y Huisman, 1999). Aunque el poli(hidroxibutirato) (PHB) es el miembro más famoso y estudiado de los PHAs, hasta la fecha han sido identificadas más de 100 unidades monoméricas diferentes como constituyente de los PHAs. Este factor le da a los PHAs una gran versatilidad ya que pueden obtenerse distintos biopolímeros con diferentes propiedades físicas y por ende con múltiples aplicaciones. El PHB es un termoplástico altamente cristalino con un punto de fusión de alrededor de 170 °C. Debido a sus propiedades físicas, es a menudo comparado con el polipropileno, ya que poseen similares puntos de fusión, grados de cristalinidad y temperatura de transición vítrea. En

Capítulo 1: Introducción

definitiva, estas similitudes son útiles a la hora de visualizar el tipo de aplicaciones que se le han dado y se le darán al PHB (Holmes, 1985).

Además de las propiedades ya mencionadas, el PHB es un plástico no xenobiótico, lo cual lo convierte en totalmente degradable. Este polímero puede ser producido a partir de una gran variedad de fuentes renovables como glucosa, sacarosa, fructosa y a partir de diversos residuos como suero de leche, aguas residuales, melaza de caña, glicerol, etc. Algunas de las características del PHB son su biocompatibilidad, alto grado de polimerización, insolubilidad en agua, alto grado de cristalinidad si es extraído de su ambiente natural, y su isotacticidad (Steinbüchel y Füchtenbusch, 1998).

Aunque el PHB, y en general todos los PHAs, ofrecen varias ventajas, aún existen principalmente tres razones para que haya una prioridad en la utilización de los plásticos sintéticos sobre los biodegradables. Primero, los biopoliésteres naturales pueden estar sujetos a cambios importantes en calidad y disponibilidad. Segundo, el crecimiento de las industrias petroquímicas ha asegurado que, al menos en países desarrollados, los polímeros sintéticos derivados del petróleo sean más baratos que sus contrapartes naturales. Tercero, y definitivamente la razón más importante, la manufactura y el procesado de los polímeros sintéticos es más fácil que para el caso de los biopolímeros (Holmes, 1985). Sin embargo, este dominio está amenazado por la disminución en las reservas mundiales de gas y petróleo y por el incremento en la contaminación ambiental debida a los plásticos no biodegradables. Sumando estos factores al desarrollo de importantes esfuerzos académicos enfocados a la producción de PHAs y sus aplicaciones, se puede afirmar que poco a poco los plásticos biodegradables se comenzarán a usar tan comúnmente en la vida diaria como se usan en la actualidad los plásticos sintéticos.

Capítulo 1: Introducción

Se sabe que la porción más representativa del costo total de producción del PHB, es el valor de los substratos usados para la fermentación, cuyo costo puede variar entre el 28 y el 50 % del costo total de manufactura (Braunegg y col., 2004; Lee y Choi, 1998; Lynd y col., 1999). A este costo total, le siguen en importancia el nivel de productividad en la etapa fermentativa, y la extracción y purificación del biopolímero producido (Lee y Choi, 1998). Dos publicaciones recientes (Chanprateep, 2010; Jacquel y col., 2008) hacen una profunda revisión de los principales trabajos desarrollados hasta la fecha, en los cuales se tiene como objetivo general la reducción de los costos totales de manufactura de los PHAs. Los autores hacen hincapié en los trabajos más relevantes sobre el uso de fuentes de carbono económicas y renovables, búsqueda de nuevas cepas y manipulación genética de microorganismos para mejorar la producción de PHAs, y en el mejoramiento de las técnicas de extracción y purificación de los biopolímeros obtenidos.

En esta tesis se busca contribuir tanto a nivel experimental como teórico para mejorar las técnicas actuales asociadas al proceso global de producción de polihidroxialcanoatos. Fueron usadas diferentes cepas productoras de PHB bajo diversas condiciones nutricionales tanto en medios sintéticos como complejos. Además fueron obtenidos nuevos esquemas de biorrefinerías para la producción de PHAs mediante el uso de topinambur, residuo de canola y glicerol. Por otro lado, se emplearon técnicas de optimización enfocadas a la maximización de la productividad en diversas configuraciones de biorreactores productores de PHB. Finalmente, los PHAs obtenidos a partir de diferentes bacterias y medios de cultivo de distintas procedencias, fueron caracterizados mediante el uso de diversas técnicas de caracterización de polímeros.

1.2. Organización de la Tesis

El objetivo general de la presente tesis ha sido el estudio de la producción de PHAs a partir de diferentes microorganismos y medios de cultivo sintéticos y complejos; así como la posterior caracterización de los diferentes PHAs producidos. La tesis está organizada en 8 capítulos con las siguientes características.

En el **Capítulo 2** se hace una extensa revisión de la historia del PHB y del más reciente estado del arte de las investigaciones relacionadas con este biopolímero y en general con los PHAs. Entre los puntos más importantes se discuten las principales aplicaciones de los PHAs, así como el estado actual de su comercialización a nivel mundial. También es analizado el concepto de biorrefinería, que recientemente ha empezado a ser aplicado a la producción del PHB. Por último se mencionan en detalle los objetivos generales y específicos de esta tesis, así como el plan de trabajo seguido durante el transcurso de la investigación.

Los **Capítulos 3, 4 y 5** están abocados al estudio de la producción de PHAs a partir de diferentes medios de cultivo y microorganismos. El **Capítulo 3** describe el proceso completo de aislamiento de microorganismos nativos productores de PHB. En esta etapa fue usada, para el estudio de la producción y caracterización de PHB, una cepa de *Bacillus megaterium* denominada BBST4 extraída del Estuario de Bahía Blanca (38°45' and 39°40' S, and 61°45' and 62°20' W, Buenos Aires - Argentina). Los **Capítulos 4 y 5** describen la biosíntesis de PHAs a partir de nuevas estructuras de biorrefinerías, las cuales tienen como base fuentes naturales renovables como el topinambur (*Helianthus tuberosus*), y subproductos de la industria del biodiesel como lo son la harina de canola (*Brassica campestris*) y el glicerol. En estos dos capítulos, al aplicarse nuevas estructuras de biorrefinerías, fueron desarrolladas, paralelamente, nuevas metodologías para el procesamiento biológico de las materias primas usadas.

Capítulo 1: Introducción

El **Capítulo 6** presenta la caracterización y el análisis de las propiedades físicas y estructurales de todas las muestras de PHAs obtenidos en las etapas experimentales previas. En ese sentido, se comparan las estructuras de los biopolímeros obtenidos a partir de las diferentes metodologías de trabajo. Al final de dicho capítulo se analizan las diferencias encontradas y se plantean las ventajas de unos esquemas de producción en comparación con otros teniendo como base la estructura final del PHA obtenido.

En el **Capítulo 7** se hace un desarrollo teórico sobre la producción de PHB en biorreactores semicontinuos (fed-batch). Para ello se emplean técnicas de optimización dinámica enfocadas a la optimización de los perfiles de alimentación que maximizan la productividad final de PHB. Esta metodología demostró tener una gran versatilidad para maximizar la producción de metabolitos secundarios en biorreactores semicontinuos debido a la gran similitud entre los resultados obtenidos de la optimización dinámica y las rutas metabólicas asociadas a la biosíntesis del PHB. Por lo tanto, se hizo una extensión de las metodologías aplicadas al PHB a otros metabolitos secundarios como la penicilina y la astaxantina. Los resultados obtenidos fueron altamente satisfactorios y nuevamente coincidieron con los mecanismos de control metabólico asociados a su producción.

Finalmente, en el **Capítulo 8** se proponen los esquemas de bioproceso para la producción de PHAs a partir de los datos experimentales obtenidos en los capítulos previos. Simultáneamente se plantea también el trabajo a futuro que se desprende de esta tesis. Adicionalmente, en el **Anexo A** se presentan todas las metodologías experimentales usadas durante el desarrollo de esta tesis.

1.3. Referencias

Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, 450-472.

Capítulo 1: Introducción

- Atlas, R.M., 1993. Microbial ecology: Fundamentals and applications, 3rd Ed., pp. 39-43.
- Braunegg, G., Bona, R., Koller, M., 2004. Sustainable polymer production. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 43, 1779-1793.
- Chanprateep, S., 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 621-632.
- Doi, Y., 1990. Microbial Polyesters. VCH: New York.
- Flechter, A., 1993. In: Plastic from bacteria and for bacteria: PHAs as natural biodegradable polyesters. Springer Verlag. New York. pp. 77-93.
- Gu, J.D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 69-91.
- Holmes, P.A., 1985. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physical Technology*, 16, 32.
- Jacquel, N., Lo, C.W., Wei, Y.H., Wu, H.S., Wang, S.S., 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39, 15-27.
- Johnstone, B., 1990. A throw away answer. *Far Eastern Economical Reviews*, 147, 62-63.
- Kalia, V.C., Raizada, N., Sonakya, V., 2000. Bioplastics. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 59, 433-445.
- Lee, S.Y., 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14.
- Lee, S.Y., 1996b. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnology*, 14, 431-438.
- Lee, S.Y., Choi, J.I., 1998. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 387-393.

Capítulo 1: Introducción

- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U., 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 15, 777-793.
- Madison, L.L., Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 21-53.
- Ojumu, T.V., Yu, J., Solomon, B.O., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, 3, 18-24.
- Premraj, R., Mukesh, D., 2005. Biodegradation of polymers. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 186-193.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, 137-146.
- Steinbüchel, A., Fuchtenbusch, B., 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*, 16, 419-427.
- Wilson, P., Strock, J.M., 1996. Market Status Report: Postconsumer Plastics.
- Zheng, Y., Yanful, E.K., Bassi, A.S., 2005. A review of plastic waste biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 243-250.

Capítulo 2: Estado del arte de los poli(hidroxi- alcanoato)s, objetivos y plan de trabajo

2.1. Introducción

El hecho de que la gran mayoría de materiales plásticos producidos alrededor del mundo sean no degradables, implica que su proceso de desecho represente un gran problema para la sociedad y para el medio ambiente. Este es un problema que crece día a día de manera exponencial, estimándose en 25 millones de toneladas por año la tasa de acumulación de estos residuos en el ambiente (Lee y col., 1991). Este problema ha creado mucho interés en el desarrollo de plásticos biodegradables, los cuales deben poseer propiedades físicas y químicas similares a las de los plásticos sintéticos convencionales (Lee, 1996a). Estos polímeros ambientalmente degradables son la alternativa más fuerte para reemplazar los polímeros de origen petroquímico. Basados en la definición dada por la Asociación Europea de Bioplásticos, los biopolímeros son producidos a partir de fuentes renovables acorde a la norma ASTM D6866, y pueden ser completamente degradados de acuerdo a estándares internacionales como EN13432, ASTM D6400 y ISO17088 (Chanprateep, 2010). Los biopolímeros más prometedores que cumplen con estos criterios son los poli(hidroxi-alcanoato)s (PHAs) y el poli(ácido láctico) (PLA). Ambos han recibido mucha atención como posibles reemplazos de polímeros de origen petroquímico, sin embargo las investigaciones en PHAs han aumentado considerablemente en los últimos años haciéndolos cada vez más competitivos en precio en comparación con los PLA y los plásticos sintéticos (Chanprateep, 2010). Los PHAs tienen un gran potencial para la reducción de su costo de producción a largo plazo. Además, basados en la tasa de aumento

del petróleo (www.theplasticsexchange.com/Public/Public_News.aspx), el precio de los plásticos de origen petroquímico podría incrementarse nuevamente entre un 50 y un 80 % en 2012. Estas razones y algunas otras más que serán mencionadas a lo largo de este capítulo, auguran un gran futuro a los PHAs, motivando a la ciencia a continuar con sus desarrollos en esta importante área.

En este capítulo, se hace una reseña histórica del desarrollo de los PHAs empezando por el descubrimiento del PHB. Por otro lado, son revisados y analizados también otros factores relacionados con el desarrollo científico y tecnológico de estos biopolímeros: propiedades físicas y biológicas, síntesis a nivel microbiano, materias primas usadas para su producción, caracterización de las diferentes estructuras de PHAs, principales aplicaciones actuales y a futuro, y comercialización de PHAs.

2.2. Historia del PHB y los PHAs

El poli(hidroxibutirato) (PHB) es un biopoliéster termoplástico producido por una gran variedad de bacterias. Este biopolímero es acumulado como reserva de carbono y energía en condiciones limitantes de algún nutriente esencial para el crecimiento celular y en exceso de una fuente de carbono (Doi, 1990; Lee, 1996a; b). En otras palabras, el PHB es para las bacterias lo que el almidón es para las plantas y la grasa para los animales. El homopolímero contiene como monómero el ácido 3-hidroxibutírico, el cual se muestra en la Figura 2.1. Este biopolímero es producido en forma de gránulos insolubles en el citoplasma celular, los cuales pueden ser observados claramente por el uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la Figura 2.2 se muestran los gránulos de PHB observados por Tian y colaboradores (Tian y col., 2005).

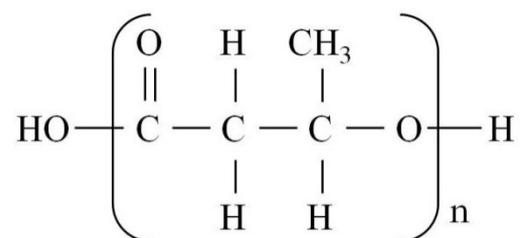


Figura 2.1. Estructura química del PHB, n=100 hasta 30000

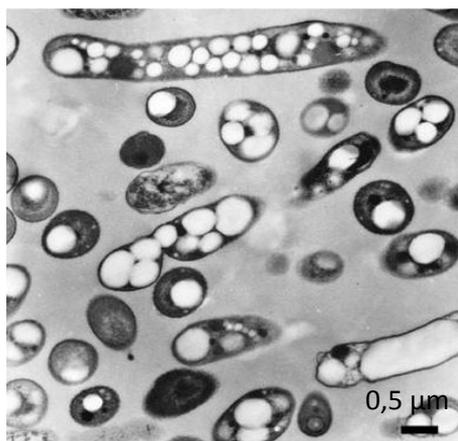


Figura 2.2. Micrografía TEM de gránulos de PHB
en *Wautersia eutropha* (Tian y col., 2005)

2.2.1. Descubrimiento del PHB

Muchos químicos, bioquímicos y microbiólogos de finales de los años 1950s desconocían el hecho de que algunas bacterias fuesen capaces de producir poliésteres naturales, aún cuando en 1927 ya se había reportado su presencia en una bacteria del género *Bacillus* (Lenz y Marchessault, 2005). Estos biopolímeros se mantuvieron desconocidos por una amplia comunidad científica durante varios años después de su descubrimiento por parte del bacteriólogo francés Maurice Lemoigne, quien publicó sus resultados en una serie de revistas francesas poco leídas internacionalmente (Lemoigne, 1923; 1925; 1926; 1927).

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

El poliéster que Lemoigne separó y caracterizó fue poli(3-hidroxi-*butirato*), PHB. Su descubridor reportó al PHB como un polímero ópticamente activo (Lemoigne, 1925). De hecho, los PHAs son los únicos miembros de una familia de poliésteres naturales que tienen los mismos tres carbonos en su estructura principal difiriendo sólo en el tipo de grupo alquilo en la posición 3 o β . Todos los PHAs tienen la misma configuración para el centro quiral en la posición β , lo cual es sumamente importante tanto para sus propiedades físicas como para la actividad de las enzimas envueltas en su biosíntesis y degradación (Anderson y Dawes, 1990; Steinbüchel y Fächtenbusch, 1998).

Lemoigne era el director del Laboratorio de Fermentaciones del Instituto Pasteur en Lille, Francia en el momento en que descubrió el PHB en el interior de bacterias. Comenzó los trabajos que lo condujeron al descubrimiento del PHB con la idea de encontrar la causa de la acidificación de suspensiones acuosas cuando la bacteria *Bacillus megaterium* era mantenida en atmósferas libres de oxígeno. En 1923, reportó que el ácido producido por la bacteria era el ácido 3-hidroxi-*butírico* (Lemoigne, 1923). En 1927 describió la extracción de un material sólido obtenido del interior de una bacteria, el cual caracterizó como un polímero del ácido 3-hidroxi-*butírico* (Lemoigne, 1927).

2.2.2. Re-descubrimiento del PHB

El re-descubrimiento del PHB ocurrió de manera simultánea y fue publicado independiente en 1958 y 1959 por microbiólogos del Reino Unido y de los Estados Unidos de América. En la Universidad de Edimburgo (Escocia), Wilkinson y colaboradores se vieron interesados en la relación entre la presencia de gránulos de lípidos en el interior de bacterias, las grandes cantidades de PHB encontradas en algunas especies de microorganismos, y la función del PHB en las células (Williamson y Wilkinson, 1958). Durante el mismo período, en la Universidad de California en Berkeley, Stanier y

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

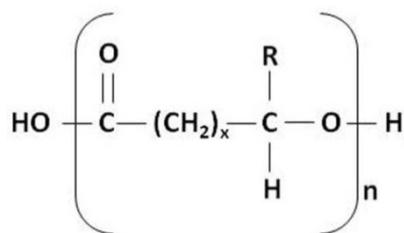
colaboradores encontraron que el PHB fue el producto primario de la asimilación oxidativa y fotosintética de compuestos orgánicos en bacterias fototrópicas. Estos autores analizaron en detalle la biosíntesis y el mecanismo de degradación del PHB en las células (Doudoroff y Stanier, 1959).

Ambos grupos de investigación determinaron que los gránulos intracelulares de PHB servían como una reserva de energía y alimento, y que el polímero era producido como una respuesta a limitaciones nutricionales en el ambiente con el objetivo de prevenir la muerte celular en caso de que algún elemento esencial para el crecimiento desapareciese del medio.

2.2.3. Identificación de los PHAs

Hasta antes de mediados de los 70s, el PHB era plenamente aceptado como un material de reserva celular, el cual era reconocido como el único miembro de la familia de los PHAs. Sin embargo, en 1972 y 1974, Wallen y colaboradores publicaron un par de trabajos en los cuales reportaron la identificación de otros hidroxialcanoatos (HAs) unidos al 3-hidroxi butirato (Wallen y Davis, 1972; Wallen y Rohwedder, 1974). Esta primera identificación de los HAs es vista como un hito, o una segunda etapa en el desarrollo científico y tecnológico de los poliésteres naturales. A finales de los 80s, fueron identificados una gran variedad de microorganismos capaces de acumular copolímeros de PHAs. Además, estos fueron identificados en una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto en bacterias anaeróbicas como aeróbicas (Byrom, 1987). Hasta la fecha, han sido identificadas más de 100 unidades monoméricas diferentes como constituyente de los PHAs (Chanprateep, 2010), algunas de las cuales son presentadas en la Figura 2.3.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo



x = 1	R = hidrógeno	Poli(3-hidroxiopropionato)
	R = metil	Poli(3-hidroxi butirato)
	R = etil	Poli(3-hidroxi valerato)
	R = propil	Poli(3-hidroxi hexanoato)
	R = pentil	Poli(3-hidroxi octanoato)
	R = nonil	Poli(3-hidroxi dodecanoato)
x = 2	R = hidrógeno	Poli(4-hidroxi butirato)
	R = metil	Poli(4-hidroxi valerato)
x = 3	R = hidrógeno	Poli(5-hidroxi valerato)
	R = metil	Poli(5-hidroxi hexanoato)
x = 4	R = hexil	Poli(6-hidroxi dodecanoato)

Figura 2.3. Estructura química general de los PHAs y algunos comonómeros que han sido identificados, n=100 hasta 30000 (Lee, 1996a)

El interés surgido en estos copolímeros, particularmente en aquellos constituidos por unidades de 3-hidroxi butirato (3-HB) y 3-hidroxi valerato (3-HV), se debe principalmente al hecho de que estos tienen menores puntos de fusión, son menos cristalinos, más dúctiles, y son más fáciles de procesar que el PHB puro (Luzier, 1992). Por lo tanto, son mejores candidatos para la fabricación de diversos materiales que hoy en día no es posible fabricar a partir del PHB. La variación en el contenido de 3-HV, o en otros casos de otros comonómeros de HAs, otorgan al biopolímero diferentes propiedades físicas y

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

termomecánicas, las cuales aumentan considerablemente su espectro de aplicación (Braunegg y col., 1998).

Es de esperarse, que se sigan descubriendo nuevos PHAs obtenidos a partir de diferentes fuentes de carbono y nuevas bacterias. Actualmente se está avanzando en el diseño metabólico y la modificación genética dirigida de las enzimas involucradas en la síntesis de PHAs para la producción de nuevos poliésteres (Steinbüchel y Valentin, 1995).

Los PHAs pueden ser clasificados también en función de la longitud del monómero: longitud de cadena corta (SCL, por sus siglas en inglés), longitud de cadena media (MCL) y longitud de cadena larga (LCL) (Steinbüchel y col., 1992). La Tabla 2.1 muestra la composición del monómero en las tres categorías mencionadas anteriormente.

Tabla 2.1 Clasificación de los poli(hidroxicanoato)s de acuerdo a la longitud del monómero (Steinbüchel y col., 1992; Steinbüchel y Valentin, 1995)

Polímeros	Longitud de los monómeros	
	(Número de átomos de carbono)	Ejemplo
SCL	3-5	Poli(3-hidroxi- <i>butirato</i>)
MCL	6-14	Poli(3-hidroxi- <i>hexanoato</i>)
LCL	> 14	Poli(3-hidroxi-7- <i>cis</i> - <i>tetradecanoato</i>)

Los copolímeros y terpolímeros de PHAs son principalmente producidos por la alimentación de diferentes sustratos que estimulan metabólicamente a los microorganismos a producir los diferentes monómeros que luego son incorporados en el biopolímero. Los copolímeros más conocidos son el poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) (P(3HB-*co*-3HV)), el poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*hexanoato*) (P(3HB-*co*-3HHx)) y el poli(3-

hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato) (P(3HB-*co*-4HB)) (Doi, 1990; Madison y Huisman, 1999).

2.2.4. Crecimiento del interés en ciencia y tecnología de los PHAs

Debido a las necesidades ya mencionadas sobre el PHB y en general de los PHAs en el desarrollo de las sociedades actuales y futuras, las investigaciones sobre estos biopolímeros naturales han tenido mucha atención en los últimos años, especialmente después de mediados de los años 80s. En la Figura 2.4 se presenta la evolución en las publicaciones científicas sobre PHB y PHAs en los últimos 45 años.

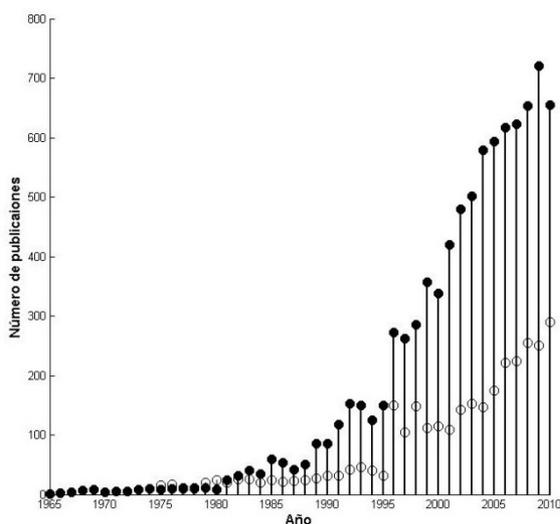


Figura 2.4. Evolución anual en el número de publicaciones sobre PHB (●) y PHAs (○) en los últimos 45 años. Búsquedas desarrolladas en Scopus con las palabras claves:

polyhydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoates, PHB, y PHAs

Debido a la gran diversidad de temas en los cuales se ha derivado la investigación de éstos biopolímeros, se calcula que en los próximos años este interés continúe en ascenso.

Además, se espera también el descubrimiento de nuevos copolímeros capaces de satisfacer necesidades que aún no han sido suplidas por los poliésteres descubiertos a la fecha.

2.3. Biosíntesis de los PHAs

Los PHAs son comúnmente producidos por bacterias, las cuales se dividen principalmente en dos grupos dependiendo de las condiciones de cultivo requeridas para su síntesis. El primer grupo de bacterias requiere la limitación de alguno de los nutrientes esenciales para el desarrollo celular como nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre, y un exceso en su fuente de carbono. Las bacterias incluidas en este grupo son *Cupriavidus necator* (conocida también como *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* y *Ralstonia eutropha*), *Bacillus* sp., *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans*. Por otro lado, el segundo grupo de microorganismo productores de PHAs como *Alcaligenes latus*, una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*, y una cepa recombinante de *E. coli*, son aquellas que no requieren limitaciones nutricionales para la síntesis de PHA (Doi, 1990).

Las mayores productividades de PHAs han sido obtenidas mediante el uso de fermentaciones semicontinuas (fed-batch) y continuas. Las fermentaciones semicontinuas son más adecuadas para el primer grupo de bacterias. En este caso, el biorreactor semicontinuo permite un cultivo en dos etapas con las siguientes características: una primera etapa sin limitaciones nutricionales en la cual se obtienen altas concentraciones de biomasa celular sin la formación de biopolímero, seguida de una segunda etapa en la cual mediante la limitación de algún nutriente se inhibe el crecimiento celular y se activa la biosíntesis del PHA (López y col., 2010).

Cupriavidus necator puede llegar a acumular hasta un 90 % de su peso seco como PHB luego que el fósforo o hidrógeno del medio son consumidos por completo en su medio de cultivo (Doi, 1990; Kim y col., 1994). Sin embargo, otro grupo de bacterias e

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

incluso otras variantes de ésta, pueden acumular PHB de una manera más efectiva cuando hay limitación de nutrientes sin llegar a su completa ausencia. En resumen, la correcta selección de microorganismos productores de PHAs depende de varios factores como su capacidad para procesar fuentes de carbono baratas, velocidad de crecimiento, velocidad de biosíntesis del polímero y la máxima cantidad de polímero que pueda acumular en su citoplasma.

La ruta metabólica asociada a la biosíntesis de PHB en *C. necator* a partir de glucosa o azúcares de su tipo, es llevada a cabo a través de tres reacciones enzimáticas (Figura 2.5).

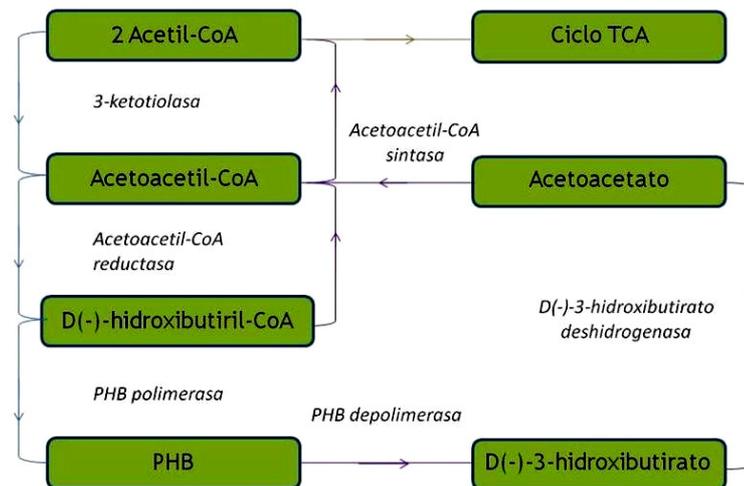


Figura 2.5. Ruta metabólica asociada a la producción de PHB a partir de hexosas

(Anderson y Dawes, 1990)

En este esquema metabólico, la 3-ketolasa (acetil-CoA acetiltransferasa) cataliza la reacción de condensación reversible en la que dos moléculas de acetilcoenzima (acetil-CoA) forman el complejo acetoacetyl-coenzima. Este intermediario es reducido a 3-hidroxibutiril-CoA por la acción de la enzima acetoacetyl-CoA reductasa para formar un complejo enzimático relacionado al monómero del PHB: 3-hidroxibutiril-CoA.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Finalmente, el PHB es producido por una serie de reacciones de polimerización llevadas a cabo por la enzima PHB polimerasa o PHB sintasa (Anderson y Dawes, 1990; Doi, 1990; Steinbüchel y Fächtenbusch, 1998; Yamane, 1993). Yamane (1993) propuso la reacción neta para la producción de PHB a partir de glucosa teniendo en cuenta todas las reacciones globales involucradas en su síntesis. De dicha reacción, este autor reportó que el rendimiento máximo alcanzable usando esta fuente de carbono no podría ser mayor a 0,48 g PHB/g glucosa. Aunque este valor es medianamente bajo, no es malo en términos de productividad industrial. Sin embargo, en los últimos años han surgido trabajos muy interesantes en los que se reportan mayores rendimientos a partir de otras fuentes de carbono y otros microorganismos (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004). Empleando otras fuentes de carbono como ácidos orgánicos y aceites vegetales es posible obtener rendimientos mayores a 1 g PHA/g fuente de carbono (Lee y col., 2008; Satoh y col., 1992). Estos resultados tienen un gran futuro, ya que altos rendimientos permitirían la obtención de mayores cantidades de distintos copolímeros de PHAs. Además, los costos de producción tienden a una reducción sustancial si se emplea como fuente de carbono subproductos de otras industrias como el suero de leche (Ahn y col., 2001), las melazas de caña (Oliveira y col., 2007; Solaiman y col., 2006) y algunos aceites vegetales (Loo y col., 2005). Más adelante en este capítulo se analizará con mayor detalle el efecto de la fuente de carbono sobre el rendimiento y la productividad de los PHAs.

2.3.1. Producción de PHAs a partir de diferentes bacterias

2.3.1.1. Cupriavidus necator

Cupriavidus necator es tal vez la bacteria más usada y estudiada en la producción de PHAs. Esto es debido a su excelente habilidad para acumular grandes cantidades de

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

polímero en su citoplasma a partir de fuentes de carbono simples como glucosa, fructosa y ácido acético. Esta cepa ha sido la primera en ser implementada en la producción industrial de PHB, ya que Imperial Chemical Industries (Reino Unido) la usan para la producción de PHB a partir de glucosa y P(3HB-co-3HV) a partir de una mezcla de glucosa y ácido propiónico mediante fermentaciones semicontinuas (Khanna y Srivastava, 2005).

La mayor productividad hacia la producción de PHB reportada para este microorganismo es de 2,42 g/L h (Kim y col., 1994). Estos autores lograron obtener concentraciones celulares de hasta 164 g/L, con una acumulación de PHB del 76 % en 50 h de fermentación. Aparte de glucosa, este microorganismo puede consumir diversas fuentes de carbono como fructosa, aceites vegetales, aminoácidos, glicerol, entre otras. Recientemente, esta bacteria ha sido estudiada para la producción de PHB a partir de esquemas de biorrefinerías basados en el uso de todos los componentes del trigo como única fuente de carbono y nutrientes (Koutinas y col., 2007b; Xu y col., 2010). Bajo estos esquemas de biorrefinería se han logrado obtener también altas concentraciones celulares del orden de 163 g/L, con la máxima acumulación de PHB hasta ahora reportada: 93 %.

2.3.1.2. *Escherichia coli* recombinante

Las cepas recombinantes de *E. coli* capaces de producir PHAs, son cepas modificadas genéticamente en las cuales han sido insertados genes de *C. necator*, *Pseudomonas* sp. o *A. latus*. Estas cepas han sido empleadas en la producción de PHB con resultados muy satisfactorios en términos de productividad final (Lee y col., 1995). La habilidad de esta bacteria para metabolizar sacarosa es vista como una gran ventaja debido a que la sacarosa es una fuente de carbono mucho más barata que la glucosa (Yu y col., 2003; Zhang y col., 1994). Sin embargo, las cepas recombinantes parecen, en general, inestables en presencia de medios complejos baratos. Además, debido a la ausencia de

enzimas depolimerasas en su citoplasma, estas pueden colapsar rápidamente generando lisis celular (Chen y col., 2006).

2.3.1.3. *Pseudomonas sp.*

Las *Pseudomonas* son conocidas como bacterias capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono para producir PHAs de cadena media (MCL). En general, estas cepas no sintetizan PHAs de cadena corta. Muchos de los PHAs sintetizados a partir de *Pseudomonas* no tienen, generalmente, una relación directa entre el monómero y la fuente de carbono usada. Las tres especies de *Pseudomonas* más usadas para la producción de PHAs de cadena media son: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans* y *Pseudomonas citronellosis* (Liu y Chen, 2007; Ouyang y col., 2007; Ruth y col., 2007; Sudesh y col., 2000; Sun y col., 2007). Al final de esta sección, con ánimos comparativos, se presenta una tabla donde se muestran las principales bacterias productoras de PHAs.

2.3.1.4. *Bukholderia cepacia*

Esta cepa, antes conocida como *Pseudomonas cepacia* ha sido la única bacteria en poder sintetizar una mezcla de dos homopoliésteres: poli(3-hidroxibutirato) (P3HB) y poli(3-hidroxi-4-pentenoato) (P3H4PE) a partir de glucosa y gluconato (De Andrade Rodrigues y col., 2000), el copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-4-pentenoato) (P(3HB-co-3H4PE)) a partir de gluconato o sacarosa y el copolímero P(3HB-co-3HV) a partir de xilosa y ácido levulínico (Keenan y col., 2004). El P3H4PE es un nuevo miembro de la familia de los PHA que fue obtenido empleando los ácidos 4-pentenoico y pentanoico como fuentes de carbono (Braunegg y col., 1998).

2.3.1.5. *Alcaligenes latus*

Alcaligenes latus es otra de las bacterias de la que se han tomado genes para producir cepas recombinantes de *E. coli*. Esta bacteria no requiere de ninguna limitación nutricional para la producción de PHB. Sin embargo, cuando le es impuesta cierta limitación, los niveles de PHB que produce son mucho mayores que en condiciones balanceadas (Wang y Lee, 1997). Con esta bacteria y bajo condiciones nutricionales desbalanceadas, se ha logrado el mayor rendimiento y productividad hacia PHB reportado hasta el momento: 4,94 g/L h, con una acumulación de PHB del 88 % (Wang y Lee, 1997).

2.3.1.6. *Bacillus sp.*

Las bacterias del género *Bacillus* tienen la gran ventaja de metabolizar un gran número de fuentes de carbono como glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol, incluso polímeros naturales como el almidón (Valappil y col., 2007a). Sin embargo, esta bacteria tiene a la esporulación como uno de sus mayores obstáculos para su implementación a nivel industrial. La esporulación es un proceso de supervivencia que desarrollan los organismos de esta especie cuando encuentran limitaciones nutricionales, formando un complejo inmune a diversas condiciones adversas como valores extremos de pH y altas temperaturas. Desafortunadamente el mismo proceso que estimula la acumulación de PHB, conlleva también a la esporulación como medio de supervivencia. Es por ello que las acumulaciones de PHB en estos organismos no logran valores mayores al 65 % del peso seco (Kulpreecha y col., 2009; Valappil y col., 2007b).

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Tabla 2.2 Comparación entre algunas de las bacterias productoras de PHAs en base a las fuentes de carbono que consumen y los copolímeros que producen

Bacteria	Fuente de carbono	PHAs producidos	Referencia
<i>C. necator</i>	Glucosa, ácido valérico, fructosa, butirolactona, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, aceite de palma	PHB, P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB)	Pötter (2002); Pederson y Srienc (2004); Yu y Si (2004); Kim y col., (1994); Rao y col., (2010)
<i>E. coli</i> recombinante	Glucosa, ácidos grasos: ácido dodecanoico, valérico, heptanoico y nonanoico	P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-3HV-co-3HHx)	Lu y col.,(2003); Park y col., (2001); Valentín y col., (2000)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ácidos octanoico, nonanoico, tetradecanoico y dodecanoico, octanoato de sodio, glucosa	P(HA)s de cadena media	Liu y Chen (2007); Ouyang y col., (2007); Sun y col., (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sacarosa, gluconato, xilosa, ácido levulinico	P(3HB), P(3H4PE) P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3H4PE)	De Andrade Rodrigues y col., (2000); Keenan y col., (2004)
<i>Alcaligenes latus</i>	Glucosa, sacarosa	P(3HB)	Wang y Lee (1997); Grothe y Chisti (2000)
<i>Bacillus</i> sp.	Glucosa, fructosa, sacarosa, gluconato	P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-3HV-co-4HB)	Kulpreecha y col., (2009); Valappil y col., (2007a), (2007b)

2.3.1.7. Comparación entre algunas bacterias productoras de PHAs.

La Tabla 2.2 presenta, a modo de resumen, información comparativa entre las diferentes bacterias productoras de PHAs que han sido mencionadas en esta sección. En ese sentido, dichos microorganismos son comparados en base al sustrato que metabolizan y al PHA que producen. Como puede notarse se han descubierto nuevos copolímeros producidos por diferentes especies.

2.4. Propiedades físicas y biológicas

Los PHAs son polímeros semicristalinos con un grado de cristalinidad 60 a 80 % (Sudesh y col., 2000). Sin embargo, en el citoplasma celular, estos poliésteres son amorfos (Banard y Sanders, 1989). Al momento de extraer el polímero, una vez que las células son rotas ocurre un cambio rápido en la morfología del polímero, pasando de amorfo a cristalino. Esto implica que los gránulos del polímero en el interior de la célula son muy pequeños y que la probabilidad de nucleación conlleva a una cristalización lenta (Khanna y Srivastava, 2005). A continuación, se detallan específicamente las principales propiedades físicas y biológicas de los PHAs.

2.4.1. Propiedades físicas

La familia de los PHAs exhibe una amplia variedad de propiedades mecánicas desde las correspondientes a polímeros cristalinos rígidos hasta las observadas en materiales viscoelásticos. Dichas propiedades dependen de la composición y del tipo de monómeros presentes en el PHA. Por ejemplo, los MCL-PHAs son elastómeros semicristalinos con puntos de fusión relativamente bajos, una baja resistencia a la tracción y una alta elongación a la rotura (Preusting y col., 1990).

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Ya que el PHB es el miembro más estudiado entre los PHAs, las propiedades de estos pueden ser explicadas en base a las de PHB. La masa molar del PHB producido a partir de cepas nativas puede variar entre 10.000 y 3.000.000 g/mol con un índice de polidispersidad de aproximadamente 2 (Macrae y Wilkinson, 1958). Las densidades de la fase cristalina y amorfa son 1,26 y 1,18 g/cm³, respectivamente. Propiedades mecánicas como el modulo de Young y la resistencia a la tracción son muy cercanas a las del polipropileno, aunque la deformación a la fractura es mucho menor que la de otros plásticos sintéticos como el polipropileno y el poliestireno. En la Tabla 2.3 se comparan las principales propiedades físicas y mecánicas del PHB y otros copolímeros de PHAs con las de otros plásticos de origen petroquímico.

La naturaleza frágil del PHB es una de las propiedades que más ha sido estudiada. Día a día, gracias a nuevos desarrollos sus propiedades son cada vez mejores. Se sabe que dicha naturaleza quebradiza del PHB ocurre durante el almacenamiento del polímero después de su primera cristalización después de la fusión (De Koning y Lemstra, 1993). Sin embargo, esto puede ser solucionado mediante un proceso simple de alineación después de la cristalización inicial (De Koning y col., 1994).

Adicionalmente, las propiedades físicas también pueden ser mejoradas por la incorporación de otros HAs para formar copolímeros. Propiedades como la cristalinidad, punto de fusión, rigidez y dureza pueden ser mejoradas en los copolímeros en comparación con las obtenidas para el PHB (Doi, 1990).

La estructura y propiedades de los PHAs han sido más estudiadas que las del PHB como tal. Por ejemplo, se sabe que los copolímeros P(3HB-co-3HV) son isodimórficos, es decir, tienen un punto de fusión mínimo en aproximadamente un 30 mol% de HV.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Tabla 2.3 Comparación de diferentes propiedades físicas y mecánicas de PHAs y polímeros sintéticos (Khanna y Srivastava, 2005)

Polímero	T _f (°C)	E (GPa)	σ _s (MPa)	ε _f (%)	T _g (°C)
P(3HB)	179	3,5	40	5	4
P(3HB- <i>co</i> -3HV)					
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-	-
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-	-
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-	-
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-	-
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-	-
P(3HB- <i>co</i> -4HB)					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(4HB)	53	149	104	1000	-
P(3HHx- <i>co</i> -3HO)	61	-	10	300	-
P(3HB- <i>co</i> -3HA)					
6 mol% 3HA	133	0,2	17	680	-8
P(3HB- <i>co</i> -3HP)					
67 mol% 3HP	44	-	-	-	-19
P(3HB- <i>co</i> -3HHx)	52	-	20	850	-4
PP (isotactico)	176	1,9	40	100	-8
PET	265	2,7	55	125	72
PS (atáctico)	-	3,0	40	7	100
PEAD	130	0,8	15	500	-125

T_f: Temperatura de fusión; E: modulo de Young; σ_s: resistencia mecánica; ε_f: deformación a la fractura.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Además, a medida que la fracción de 3HV aumenta, los copolímeros se hacen más flexibles. Con el aumento del contenido de 3HV disminuye la temperatura de fusión sin ninguna variación considerable en la temperatura de degradación. Esto le otorga a los copolímeros una mayor ventana térmica de procesamiento sin el peligro de degradación (Khanna y Srivastava, 2005). En resumen, las propiedades térmicas pueden ser controladas ajustando el contenido de 3HV incorporado en el copolímero durante la fermentación.

La introducción de comonómeros diferentes al 3HV como el 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxipropionato y el 4-hidroxibutirato, también da copolímeros con propiedades mecánicas mejoradas (Tabla 2.3). Tal como en el caso de los copolímeros P(3HB-co-3HV), las propiedades térmicas y físicas de estos PHAs pueden controlarse durante la fermentación por medio de la alimentación de diferentes sustratos y en diferentes proporciones.

2.4.2. Propiedades biológicas

Además de las características ya mencionadas en la sección anterior, la biodegradabilidad es otra importante característica de los PHAs. Los PHAs pueden ser degradados a dióxido de carbono y agua por una gran variedad de microorganismos presentes en la naturaleza (Jendrosseck, 2001), y por ende, tal como se muestra en la Figura 2.6, estos tienen un ciclo del carbono que está completamente cerrado.

La producción de los PHAs está completamente basada en la utilización de productos agrícolas tales como azúcares y ácidos grasos como las principales fuentes de carbono y energía. Estas materias primas provienen directamente de la transformación del dióxido de carbono y el agua por medio de la fijación de la luz solar. Es por ello que los PHAs son considerados como materiales de naturaleza renovable (Madison y Huisman, 1999).

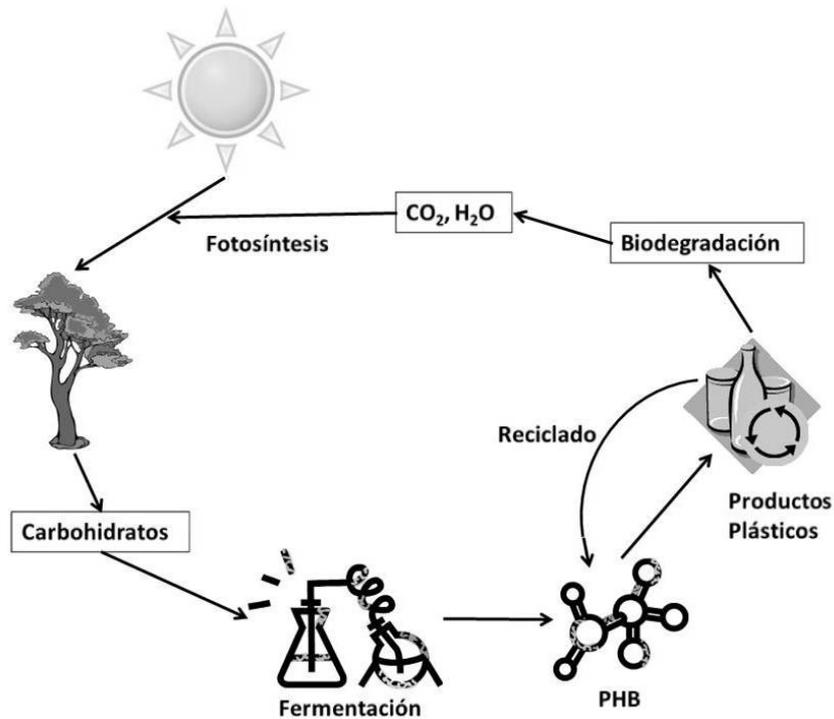


Figura 2.6. Ciclo del carbono de los PHAs

Debido a que los PHAs son almacenados en el citoplasma celular como reserva de carbono y energía, éstos pueden ser eventualmente hidrolizados y usados como fuente de energía cuando no hay más fuente de carbono disponible en el medio. Lemoigne fue el primero en estudiar este fenómeno cuando encontró que el ácido 3-hidroxi-butírico era liberado por *Bacillus megaterium* en un ambiente acuoso (Lenz y Marchessault, 2005). A este fenómeno interno se le conoce como biodegradación intracelular. El PHB, y en general todos los PHAs, pueden ser rápidamente hidrolizados a su monómero correspondiente mediante la acción de enzimas extracelulares provenientes de una gran variedad de bacterias y hongos. Estos microorganismos pueden consumir los PHAs después de su excreción, la cual es comúnmente debida a la muerte o lisis de bacterias las cuales los tenían almacenados (Jayasekara y col., 2005).



Figura 2.7. Biodegradación de PHAs. Botellas hechas de BIOPOL™ incubadas en lodos activados por 0, 2, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente (Sudesh y col., 2000)

El proceso de biodegradación de los PHAs puede diferenciarse en dos categorías: degradación intracelular y extracelular. Investigaciones basadas en la biodegradación intracelular en *Wautersia eutropha* han mostrado que es un proceso largo en comparación con la biosíntesis. Sudesh y colaboradores (Sudesh y col., 2000) mostraron que ésta puede tardar hasta 10 veces más que la biosíntesis. Sin embargo, la biodegradación extracelular es la que tiene mayor relevancia e importancia. Muchos microorganismos, entre bacterias y hongos, tienen la habilidad de secretar enzimas capaces de hidrolizar los PHAs, las cuales son comúnmente llamadas PHA hidrolasas y PHA depolimerasas (Jendrossek, 2007; Nobes y col., 1998). En la Figura 2.7 se presenta una fotografía en la cual se muestra de manera evolutiva el proceso de biodegradación de botellas de PHAs comerciales (BIOPOL™).

Algunos estudios han demostrado que también existen depolimerasas para aquellos PHAs que poseen cadenas largas (Wang y Schellhorn, 1995). Así como existe una gran diversidad de PHAs, existen también muchos tipos de depolimerasas intra y extracelulares.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Todas estas enzimas consisten de una sola cadena de polipéptido con un peso molecular de entre 40.000 y 60.000 g/mol (Jendrossek y col., 1995; Sudesh y col., 2000).

La biodegradabilidad de los PHAs en ambientes naturales como suelos, aguas de mar y de lagos es un proceso influenciado, generalmente, por varios factores como: población microbiana, temperatura, nivel de humedad, pH, nivel de nutrientes así como sus composiciones, cristalinidad, aditivos y la propia superficie del PHA (Khanna y Srivastava, 2005). Entre los microorganismos más estudiados y conocidos capaces de producir depolimerasas extracelulares se encuentran los reportados en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Algunos microorganismos degradadores de PHAs aislados de diferentes ambientes

Fuente	Microorganismo	Referencia
Suelo	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Megaert y col., (1993)
	<i>Acidovorax faecalis</i>	Megaert y col., (1993)
	<i>Comamonas sp.</i>	Jendrossek y col., (1993)
	<i>Pseudomonas lemoignei</i>	Delafield y col., (1965)
	<i>Variovorax paradoxus</i>	Megaert y col., (1993)
Lodos activados	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Tamio y col., (1982)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Schirmer y col., (1993)
Agua de mar	<i>Comamonas testosteroni</i>	Kasuya y col., (1994)
Agua de lago	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Mukai y col., (1994)
Pantanos anaerobios	<i>Ilobacter delafildii</i>	Jansen and Harfoot, (1990)

2.5. Materias primas - Biorrefinerías

Los sustratos usados para la producción de PHAs microbianos son el dióxido de carbono, fuentes fósiles (metano, aceites minerales, etc.), materiales renovables (azúcares simples, almidón hidrolizado, suero de leche, glicerol, etc.) y otras sustancias químicas (ácido propiónico, ácido 4-hidroxi-butírico, etc.) (Fonseca y Antonio, 2006). La fuente de

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

carbono como tal, es el componente que más contribuye al costo final de producción de los PHAs, representando hasta un 50 % del costo total de producción (Braunegg y col., 2004; Lee y Choi, 1998; Lynd y col., 1999). Por lo tanto, para el diseño ingenieril de nuevos procesos, se deben buscar fuentes de carbono tan baratas como sea posible. Es por esto que muchos trabajos recientes se han orientado a la búsqueda de materiales renovables y subproductos industriales no sólo como fuentes de carbono, sino también como fuentes de nutrientes para la producción de PHAs (Solaiman y col., 2006; Thomsen, 2005).

Los esquemas que están basados en el uso balanceado de todos los componentes presentes en diversos materiales renovables son denominados biorrefinerías. Estas están ligadas a la necesidad de desarrollar procesos de producción de bajo costo, los cuales son totalmente amigables con el medio ambiente en términos de la utilización de materiales renovables y en la mínima generación de residuos. Por ejemplo, Webb y colaboradores (Dorado y col., 2009; Koutinas y col., 2007a; Koutinas y col., 2007b; Xu y col., 2010) han desarrollado esquemas de biorrefinerías para la producción integral de ácido succínico y PHB basados en el uso de una única materia prima: el trigo. Bajo esta metodología, el almidón presente en el trigo es hidrolizado para producir altas concentraciones de glucosa, mientras que el alto contenido proteico del trigo también es tenido en cuenta para la producción de una solución rica en nitrógeno, fósforo, aminoácidos y vitaminas (Koutinas y col., 2005). La combinación de ambas soluciones en las proporciones adecuadas lleva a la producción de un medio de cultivo muy económico y totalmente genérico, ya que su contenido de carbono y nutrientes es ideal para el crecimiento de un importante grupo de microorganismos productores de una gran cantidad de metabolitos.

La gran mayoría de los trabajos de investigación publicados en la literatura abierta no están basados en el concepto de biorrefinería. Es decir, se basan en la utilización de una fuente de carbono económica y renovable con la adición de otros suplementos

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

nutricionales comerciales. Con el objetivo de dar una mirada general en este campo, en las siguientes secciones son resumidos algunos de los principales materiales renovables que han sido usados en la producción de PHAs. Estos casos sólo tienen en cuenta fuentes de carbono, dejando de lado los demás suplementos nutricionales necesarios para la producción de bioplásticos.

2.5.1. Suero de leche

Ahn y colaboradores (Ahn y col., 2001) usaron suero de leche, un subproducto de las industrias lecheras, para la producción de PHB. Se sabe que el suero de leche contiene lactosa, proteínas, sales y en menor proporción ácido láctico. En dicha investigación, los autores usaron una cepa recombinante de *E. coli*. Adicionalmente, debido a las condiciones nutricionales del medio, los autores tuvieron que agregar a éste ciertas cantidades de minerales y elementos traza para poder desarrollar fermentaciones semicontinuas. Bajo estas condiciones, los autores lograron obtener concentraciones finales de PHB de aproximadamente 103 g/L, con una productividad de 1,42 g/L h. Además, sugirieron que el nivel de oxígeno disuelto fue quizás uno de los factores más relevantes durante el proceso de producción de PHB.

2.5.2. Almidón

El almidón es un polímero natural compuesto principalmente por unidades de glucosa. El hidrolizado de almidón es mucho más barato que la glucosa pura. Rusendi y Sheppard (1995) fueron los primero autores en usar almidón de papa, hidrolizado por α -amilasas provenientes de diferentes fuentes microbianas, para la producción de PHB. Estos autores lograron obtener una concentración final de PHB de 50 g/L con un contenido

intracelular del 77 % del peso seco. Yu y colaboradores (2003) demostraron que tanto el contenido final de PHB como su concentración son mucho mayores cuando se usa un hidrolizado de almidón en vez de glucosa pura. Sin embargo, las velocidades de crecimiento celular y de producción de PHB son un poco más lentas debido a la presencia de procesos metabólicos más complejos. Otros autores, han usado también hidrolizado de almidón para producir PHAs a partir de *Haloferax mediterranei* (Chen y col., 2006; Huang y col., 2006). Ellos encontraron que esta cepa tiene la habilidad de producir el copolímero P(3HB-co-3HV) sin la adición de ninguna fuente de carbono extra como el propionato o el valerato.

2.5.3. Melazas de caña

Las melazas de caña son un subproducto de la producción de azúcar refinada con un altísimo contenido de azúcares como sacarosa y fructosa principalmente (Albuquerque y col., 2007). Por lo tanto, se han desarrollado varias investigaciones basadas en el uso de este subproducto en la producción de PHAs. Zhang y colaboradores (1994) fueron de los primeros que hicieron desarrollos en la producción de PHAs a partir de melazas. Sin embargo, sus niveles de crecimiento celular y PHB no fueron completamente satisfactorios. Por otro lado, otros autores aislaron una nueva cepa de *Alcaligenes* sp capaz de metabolizar melaza (Bonatto y col., 2004). Ellos desarrollaron algunas fermentaciones con el objetivo de producir PHB, pero nuevamente sus niveles de crecimiento celular y producción de PHB no fueron los esperados. Sin embargo, los autores recalcan la capacidad de esta cepa para producir copolímeros a partir de una sola fuente de carbono.

2.5.4. *Glicerol*

El glicerol es uno de los principales residuos de la producción de biodiesel a nivel industrial a partir de aceites vegetales. Se sabe que por cada tonelada de biodiesel se producen 100 Kg de este subproducto. Es por ello que su utilización en la producción de PHAs tiene un gran valor agregado. Bormann y Roth (1999) fueron unos de los primeros autores en proponer el glicerol como fuente de carbono para la producción de PHB en cultivos discontinuos. Con sus resultados demostraron que era posible convertir glicerol en PHB, aunque su conversión promedio fue de apenas del 17 %, la cual representó sólo la mitad del rendimiento teórico para el glicerol. Recientemente, otros autores han reportado la producción de PHB a partir de glicerol reciclado de plantas de biodiesel (Cavalheiro y col., 2009). En dicho trabajo, estos autores reportaron una producción de biomasa mayor a 60 g/L con acumulaciones de PHB de aproximadamente un 62 %. Estos resultados le dan una gran perspectiva a futuras investigaciones enfocadas a la producción de PHAs a partir de residuos agroindustriales como el glicerol (Posada y col., 2011).

2.5.5. *Aceites vegetales*

Los aceites vegetales son una materia prima ideal para la producción de PHAs debido principalmente a tres razones: 1) son una fuente de carbono barata; 2) los rendimientos teóricos hacia la producción de PHAs son mayores a la unidad y 3) debido a sus variadas estructuras químicas son capaces de producir diversos copolímeros (Fukuki y Doi, 1998; Kahar y col., 2004; Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

Tabla 2.5 Producción de PHAs a partir de fuentes de carbono renovables

Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Bacteria	Biomasa (g/L)	PHB (g/L)	Rendimiento (g PHB/g)	Referencia
Suero lácteo	NH ₄ ⁺	<i>Escherichia coli</i>	120	96	–	Ahn y col., (2001)
Almidón	NH ₄ ⁺	<i>Wautersia eutropha</i>	65	50	0.37	Rusendi y Shepard, (1995)
Glicerol	Caseína y peptona	<i>Wautersia eutropha</i>	32	15	0.17	Bormann y Roth, (1999)
Glicerol	Extracto de levadura	<i>Wautersia eutropha</i>	82.5	51.2	–	Cavalheiro y col., (2009)
Aceite de oliva	NH ₄ ⁺	<i>Wautersia eutropha</i>	4.3	3.4	–	Fukuki y Doi, (1998)
Aceite de soja	NH ₄ ⁺	<i>Wautersia eutropha</i>	126	96	0.76	Kahar y col., (2004)

Fukuki y Doi (1998) reportaron la utilización de diversos aceites vegetales incluyendo el aceite de oliva, aceite de maíz y ácido oleico para la producción de PHB y poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) usando *C. necator*. Sus resultados sugieren que se pueden obtener diversas estructuras de PHAs con valores de productividad razonablemente altos. Posteriormente, el grupo de trabajo del Dr. Doi (Kahar y col., 2004), condujo una investigación para la producción de PHAs a partir de aceite de soja mediante el empleo de *C. necator* en un biorreactor de laboratorio de 10 L. Los niveles de productividad y acumulación de PHAs logrados fueron altamente satisfactorios: aproximadamente 100 g/L de PHB con una acumulación del 76 % del peso seco.

Basados en estos resultados han surgido, en los últimos años, un importante número de investigaciones relacionadas con la producción de PHAs a partir de aceites vegetales (Rao y col., 2010). En la Tabla 2.5 se presentan, a modo de resumen y comparación, algunos ejemplos de la producción de PHAs a partir de distintas fuentes renovables.

2.5.6. Producción de PHB a partir del concepto de biorrefinería

Las biorrefinerías buscan el uso integral de todos los componentes presentes en materias primas renovables como lo son los polímeros naturales compuestos por azúcares, las proteínas compuestas por una gran diversidad de aminoácidos, y los demás minerales y vitaminas disponibles en ellas (Kamm y Kamm, 2004). Este concepto de biorrefinería es muy reciente, en ese sentido se espera que los avances más significativos sean publicados en el transcurso de los próximos años.

Al comienzo de esta sección se mencionaron los avances en biorrefinerías destinadas a la producción de PHB desarrollados bajo la dirección del Profesor Webb en la Universidad de Manchester (Reino Unido) (Dorado y col., 2009; Koutinas y col., 2007a;

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

Koutinas y col., 2007b; Xu y col., 2010). Sin embargo, éstos no son los primeros reportes de biorrefinerías destinadas a la producción de biopolímeros. En 2004, en la Universidad Federal de Rio de Janeiro se hicieron los primeros avances en esta área (Oliveira y col., 2004, 2007). Estos autores reportaron la producción de PHB a partir de una fermentación en estado sólido sobre tortas de soja y de palmera babassu con *C. necator*. Ambas tortas fueron usadas como suplemento nutricional para el crecimiento celular y la producción de PHB, además, fueron adicionadas melazas de caña como fuente de carbono. Las fermentaciones fueron desarrolladas sin la adición de ningún suplemento nutricional ajeno a las materias primas ya mencionadas. Estos resultados mostraron la posibilidad de producir PHAs a partir de estos esquemas de biorrefinería.

En los **Capítulos 4 y 5** de esta tesis se hace un completo desarrollo experimental en donde se obtuvieron dos nuevos esquemas de biorrefinería para la producción de PHAs. El primero está basado en el uso de topinambur (*Helianthus tuberosus*), un tubérculo ampliamente cultivado en todo el mundo, el cual tiene un alto contenido proteico y contiene además altas cantidades de inulina, un polímero natural compuesto principalmente por fructosa y sacarosa. El segundo caso, está basado en el uso de los dos principales residuos de la industria del biodiesel: la harina de canola (*Brassica campestris*) y el glicerol.

2.6. Aplicaciones

Debido a que los PHAs son termoplásticos y biodegradables, los materiales fabricados a partir de estos biopolímeros están reemplazando poco a poco a los plásticos sintéticos de origen petroquímico. Además, el importante rango de propiedades físicas presentes en los bioplásticos de la familia de los PHAs, les otorga un gran número de aplicaciones tanto a nivel industrial, como comercial y médico. Los primeros esfuerzos

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

fueron abocados hacia la producción de botellas, estuches cosméticos, lapiceras, pañales y hasta camisetas de golf (Baptist, 1963a), (1963b). Sin embargo, las mayores aplicaciones serán en aquellas situaciones donde se generan gran cantidad de residuos sólidos con los plásticos de origen petroquímico como bolsas plásticas, botellas y films para alimentos, productos de higiene personal, entre otros (Bucci y col., 2005; Lee, 1996a; Liggat y Brien, 1997; Martini y col., 1989; Noda, 2001; Zinn y col., 2001).

Además de importante rol como reemplazo de los plásticos convencionales, los PHAs tienen un amplio espectro de aplicaciones en medicina debido a su biocompatibilidad. Los PHAs pueden digerirse sin ningún problema para el cuerpo humano (Zinn y col., 2001). Debido a que el ácido 3-hidroxi-butírico está normalmente presente en la sangre, no es difícil imaginar la gran variedad de aplicaciones médicas que tienen estos bioplásticos. En ese sentido, el PHB ha sido usado satisfactoriamente como agente liberador de drogas, soporte para ingeniería de tejidos, transporte de medicamentos, y hasta en una gran variedad de materiales biomédicos como jeringas, hilos de sutura, entre otros (Pouton y Akhtar, 1996; Wiggan y col., 1997; Zinn y col., 2001).

Finalmente, otra importante aplicación de los PHAs está en su capacidad para producir diferentes moléculas a partir de su hidrólisis controlada. En ese sentido, los PHAs pueden ser químicamente hidrolizados y los monómeros pueden ser convertidos a una gran variedad de moléculas con alto interés comercial como 3-hidroxiácidos, ácidos 2-alquenos, 3-hidroxi-alcanoles, 3-acil-lactonas, β -aminoácidos, y ésteres de 3-hidroxiácidos (Williams y Peoples, 1996).

2.7. Comercialización

Si bien la identificación del PHB ocurrió a mediados de los años 20s, su producción y comercialización a nivel industrial sólo empezó en los 80s. Se sabe además, que una

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

compañía americana trató de industrializar la producción de PHB en los 60s, pero sin embargo, la empresa quebró debido a la baja eficiencia de producción y a la ausencia de métodos adecuados para la separación del polímero (Sudesh y col., 2000). En 1970, la empresa Imperial Chemical Industries (ICI/Zeneca BioProducts, Bellingham, UK) comenzó a comercializar P(3HB-co-3HV) (Holmes, 1985). Posteriormente, en 1996, esta empresa vendió su tecnología de producción a Monsanto y luego a Metabolix, Inc.

En Brasil, uno de los mayores exportadores de azúcar a nivel mundial, una empresa denominada PHB Industrial S.A. (Serrana), usa caña de azúcar para producir PHB (BiocycleTM). Este proyecto, que comenzó en 1992, resultó de la fusión entre una empresa productora de azúcar (Irmaos Biagi) y otra productora de alcohol etílico (Grupo Balbo). Esta compañía ha estado produciendo a razón de 50 tn/año y planea incrementar su capacidad hasta 3.000 tn/año (Pessoa Jr. y col., 2005). En Canadá por su parte, la compañía llamada Biomatera Inc, se especializa en la producción de PHAs a partir de residuos agroindustriales. Estos biopolímeros son usados en la manufactura de cremas y geles que son posteriormente usados como agentes retardantes en la liberación de drogas. También son usados para la fabricación de materiales cosméticos y como matrices en regeneración de tejidos (Archambault, 2004). Por otra parte, la industria japonesa Mitsubishi Gas Chemical ha realizado importantes progresos en la producción de PHB implementando procesos fermentativos a partir de metanol (BioGreenTM) (Kosior y col., 2006).

En la Tabla 2.6 se presentan, a modo de resumen, los actuales niveles de producción de las principales plantas que producen de PHAs alrededor del mundo haciendo hincapié en las proyecciones en cuanto al nivel de producción que estas empresas esperan obtener en los próximos años.

Tabla 2.6 Niveles de producción actuales y proyecciones futuras de las principales industrias manufactureras de PHAs alrededor del mundo (Chanprateep, 2010; Kosior y col., 2006).

Polímero	Marca	Compañía	Capacidad (tn)	Precio (€/kg)
PHB	Biogreen	Mitsubishi Gas Chemical (Japón)	10.000	2,5-3
PHB	Mirel	Telles (EE.UU.)	50.000	1,5
PHB	Byocycle	PHB Industrial Company (Brasil)	50	-
PHB, P(HB-co-HV)	Biomer	Biomer Inc. (Alemania)	50	3-5
P(HB-co-HV)	Enmat	Tianan Biologic (China)	10.000	3,3
PHB	Nodax	P&G (EE..UU.)	50.000	2,5
PHB	Nodax	Lianyi Biotech (China)	2.000	3,7
PHB	Kaneka	Kaneka Corporation (Japón)	1.000	-
P(3HB-co-4HB)	Green Bio	Tianjin Gree Bio-Science Co/DSM	10.000	-
PHAs	Meredian	Meredian (EE.UU.)	272.000 (2013)	-

2.8. Conclusiones sobre el estado del arte actual de los PHAs

La necesidad de reemplazar los plásticos de origen petroquímico por nuevos materiales con mejores propiedades principalmente en términos de biodegradabilidad y biocompatibilidad, le han dado a la ciencia y tecnología de los PHAs significantes avances en los últimos años. En ese sentido, los PHAs ya están siendo vistos e implementados como los plásticos del futuro. Los cuales no sólo reemplazaran polímeros de origen petroquímico, sino que también tendrán una serie de nuevas aplicaciones debidas a sus diferentes propiedades físicas y biológicas.

El crecimiento de la producción de PHAs a nivel industrial muestra su importancia para el desarrollo del medio ambiente y la sociedad. En la última década su producción ha aumentado exponencialmente en comparación con décadas anteriores. Este crecimiento industrial está estrechamente ligado a la investigación y desarrollo de nuevas formas de producción y aplicaciones. Con el principal objetivo de continuar reduciendo sus costos de producción, el desarrollo de nuevos procesos de manufactura de PHAs tendrá que estar basado principalmente en una completa utilización de todos los componentes presentes en fuentes de carbono renovables y subproductos de industrias ya existentes. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas refinerías para la producción de estos bioplásticos. Dicho desarrollo no debe ser enfocado solamente en metodologías experimentales, sino también en metodologías de optimización (teóricas) que permitan la maximización de la productividad reduciendo considerablemente los costos de producción y los efectos nocivos sobre el medio ambiente.

2.9. Objetivos y plan de trabajo

El **objetivo general** de esta tesis es la profundización, tanto a nivel teórico como experimental, en la biosíntesis, el modelado y la optimización de procesos relacionados con la producción de poli(hidroxialcanoato)s con énfasis en mejoras en la producción de estos biopolímeros naturales.

Dentro de los **objetivos específicos** pueden destacarse:

- 1) el aislamiento de cepas nativas productoras de PHB. Se planteó la búsqueda de microorganismos en diferentes muestras de suelos y aguas provenientes de zonas rurales y del Estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina). A partir de las muestras obtenidas se aislaron y caracterizaron bacterias productoras de PHB. Basados en su capacidad para producir y acumular PHB, se eligió el mejor microorganismo para ser usado en etapas posteriores (producción a escala laboratorio del biopolímero, así como a la caracterización de sus propiedades físicas y químicas). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta fase, es necesario decidir la conveniencia de continuar investigaciones futuras relacionadas a la producción de PHAs a partir de la cepa seleccionada.
- 2) la búsqueda de medios de cultivo provenientes de fuentes naturales renovables, así como de subproductos industriales con alto valor nutritivo para ser usados en la producción de plásticos biodegradables a partir de fermentaciones microbianas (tareas desarrolladas comúnmente por microbiólogos, biotecnólogos y agrónomos). Se planteó la obtención, a nivel experimental, de esquemas de biorrefinerías sostenibles para la producción de PHAs: hidrólisis enzimática de las macromoléculas presentes en las materias primas seleccionadas, seguidas del estudio de la producción de PHAs en estos medios. Bajo esta idea se estudiaron dos metodologías diferentes, las cuales no han sido a nuestro conocimiento reportadas previamente en la literatura abierta. La primera está basada en la utilización de topinambur (*Helianthus tuberosus*), un tubérculo abundante en diversas

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

regiones climáticas, para la producción sostenible de bioplásticos. Se evalúa entonces si la inulina y el material proteico presentes en este tubérculo pueden soportar la biosíntesis de PHAs sin la adición de otros nutrientes. Por otro lado, la segunda metodología tiene como base la utilización de los dos principales subproductos provenientes de la industria del biodiesel que usa aceite de canola como materia prima. Estos son, el aglomerado de semillas de canola (*Brassica campestris*) que queda como residuo de la extracción del aceite, y el glicerol que es el residuo del proceso de esterificación para producir el biocombustible. Estas dos materias primas son estudiadas experimentalmente con el objetivo de analizar la capacidad de *C. necator* para producir PHAs a partir del medio hidrolizado sintetizado en base a estos dos subproductos. Al final de cada capítulo se propone un esquema de proceso para la producción de PHAs, en base a los resultados obtenidos.

3) el estudio a nivel teórico de la producción de PHB en biorreactores semicontinuos. Para el desarrollo de este objetivo se aplicaron técnicas de optimización dinámica con el objetivo de encontrar las mejores condiciones operacionales que maximizan la producción de biopolímero. Debido a las dificultades en cuanto a la no disponibilidad de equipos de laboratorio capaces de reproducir los resultados teóricos, estos son analizados teóricamente en base a tendencias experimentales reportadas por otros autores, así como en base al análisis de las rutas metabólicas asociadas a la biosíntesis de PHB en *C. necator*.

4) la caracterización de la estructura química y de las propiedades físicas de los biopolímeros obtenidos en las etapas experimentales anteriormente mencionadas. En esta etapa es posible relacionar la estructura de los PHAs obtenidos y los medios de cultivo y metodologías experimentales implementadas para su producción. Esta combinación entre tecnologías de fermentación y caracterización de materiales permitirá un diseño programado enfocado a la obtención de biopolímeros (PHAs) de interés industrial.

2.10. Referencias

- Ahn, W.S., Park, S.J., Lee, S.Y., 2001. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 23, 235-240.
- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Bacteriology*, 130, 411-421.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, 450-472.
- Archambault, E., 2004. Canadian R&D Biostrategy, towards a Canadian R&D strategy for bioproducts and bioprocesses, Prepared for the National Research Council of Canada, Science-Metrix Canadian R&D Biostrategy, Canada.
- Banard, G.N., Sanders, J.K., 1989. The poly- β -hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 3286-3291.
- Baptist, 1963a. U.S. Patent 3,072,538.
- Baptist, 1963b. U.S. Patent 3,107,172.
- Bonatto, D., Matias, F., Lisboa, M.P., Bogdawa, H.M., Henriques, J.A.P., 2004. Production of short side chain-poly(hydroxyalkanoate) by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 395-403.
- Bormann, E.J., Roth, M., 1999. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *Biotechnology Letters*, 21, 1059-1063.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Braunegg, G., Bona, R., Koller, M., 2004. Sustainable polymer production. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 43, 1779-1793.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K.L., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65, 127-161.
- Bucci, D.Z., Tavares, L.B.B., Sell, I., 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, 24, 564-571.
- Byrom, D., 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnology*, 5, 246-250.
- Cavalheiro, J.M.B.T., de Almeida, M.C.M.D., Grandfils, C., da Fonseca, M.M.R., 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44, 509-515.
- Chanprateep, S., 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 621-632.
- Chen, C.W., Don, T.M., Yen, H.F., 2006. Enzymatic Extruded Starch as A Carbon Source for the Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41, 2289-2296.
- De Andrade Rodrigues, M.F., Vicente, E.J., Steinbüchel, A., 2000. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization. *FEMS Microbiology Letters*, 193, 179-185.
- De Koning, G.J.M., Lemstra, P.J., 1993. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer*, 34, 4089-4094.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- De Koning, G.J.M., Scheeren, A.H.C., Lemstra, P.J., Peters, M., Reynaers, H., 1994. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. 3. Toughening via texture changes. *Polymer*, 35, 4598-4605.
- Delafield, F.P., Doudoroff, M., Paileroni, N.J., Lusty, J., Contropoulos, R., 1965. Decomposition of poly-3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 90, 1455-1466.
- Doi, Y., 1990. Microbial Polyesters. VCH: New York.
- Dorado, M.P., Lin, S.K.C., Koutinas, A., Du, C., Wang, R., Webb, C., 2009. Cereal-based biorefinery development: utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid. *Journal of Biotechnology*, 143, 51-59.
- Doudoroff, M., Stanier, R.Y., 1959. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature*, 183, 1440-1442.
- Fonseca, G.G., Antonio, R.V., 2006. Use of vegetable oils as substrates for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 5, 277-279.
- Fukuki, T., Doi, Y., 1998. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 333-336.
- Grothe, E., Chisti, Y., 2000. Poly(3-hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess Engineering*, 22, 441-449.
- Holmes, P.A., 1985. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physical Technology*, 16, 32-36.
- Huang, T.Y., Duan, K.J., Huang, S.Y., Chen, C.W., 2006. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 701-706.
- Jansen, P.H., Harfoot, C.G., 1990. *Ilyobacter delafield* sp. nov., a metabolically restricted anaerobic bacterium fermenting PHB. *Archives in Microbiology*, 154, 253-259.
- Jayasekara, R., Harding, I., Bowater, I., Lonergan, G., 2005. Biodegradability of a selected range of polymers and polymer blends and standard methods for assesment of biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, 13, 231-251.
- Jendrossek, D., 2001. Microbial degradation of polyesters. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. T. Scheper (Eds). Berlin Heidelberg, Springer - Verlag. 71
- Jendrossek, D., 2007. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1186-1196.
- Jendrossek, D., Frisse, A., Behrends, A., Andermann, M., Kratzin, H.D., Stanislawski, T.E.A., 1995. Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *Journal of Bacteriology*, 177, 596-607.
- Jendrossek, D., Knoke, I., Habibian, R.B., Steinbüchel, A., Schlegel, H.G., 1993. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. *Journal of Environment and Polymer Degradation*, 1, 53-63.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K., Doi, Y., 2004. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 83, 79-86.
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Kasuya, K., Doi, Y., Yao, T., 1994. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *Comamonas testosteroni* ATSU of soil bacterium. *Polymer Degradation and Stability*, 45, 379-386.
- Keenan, T.M., Tanenbaum, S.W., Stipanovic, A.J., Nakas, J.P., 2004. Production and characterization of poly- β -hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnology Progress*, 20, 1697-1704.
- Khanna, S., Srivastava, A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607-619.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K., Woo, S.I., 1994. Production of polyhydroxybutyrate by fed-batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 892-898.
- Kosior, E., Braganca, R.M., Fowler, P., 2006. Lightweight compostable packaging: literature review, The Waste & Resource Action Program, INN003/26. 1-48.
- Koutinas, A.A., Arifeen, N., Wang, R., Webb, C., 2007a. Cereal-based biorefinery development: integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 61-72.
- Koutinas, A.A., Wang, R.H., Webb, C., 2005. Development of a process for the production of nutrient supplements for fermentations based on fungal autolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 629-638.
- Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R., Webb, C., 2007b. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1035-1044.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., 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, 240-245.
- Lee, B., Pometto III, A.L., Fratzke, A., Bailey, T.B., 1991. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 678-685.
- Lee, S.Y., 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14.
- Lee, S.Y., 1996b. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 14, 431-438.
- Lee, S.Y., Choi, J.I., 1998. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 387-393.
- Lee, S.Y., Lee, K.M., Chang, H.N., 1995. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 117-180.
- Lee, W.H., Ching-Yee, Nomura, C.T., Sudesh, K., 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*, 99, 6844-6851.
- Lemoigne, M., 1923. Production de l'acide β -oxybutyrique par certaines bact'eries du groupe du *Bacillus subtilis*. *CR. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 176, 1761.
- Lemoigne, M., 1925. Etudes sur l'autolyse microbie acidification par formation d'acide β -oxybutyrique. *CR. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 180, 1539.
- Lemoigne, M., 1926. Produits de l'hydratation et polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. *Bull. Soc. Chem. Biol. (Paris)*, 8, 770-782.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Lemoigne, M., 1927. Etudes sur l'autolyse microbienne. Origine de l'acide β -oxybutyrique form'e par autolyse. *Annals Institute Pasteur*, 39, 144.
- Lenz, R.W., Marchessault, R.H., 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6, 1-8.
- Liggat, J.J., Brien, G.O., 1996. Melt processing of BiopolTM polymers - Recent advances. International Symposium on Baterial Polyhydroxyalkanoates, Davos, Switzerland, 151-160.
- Liu, W., Chen, G.-Q., 2007. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate with high 3-hydroxytetradecanoate monomer content by fadB and fadA knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1153-1159.
- Loo, C.Y., Lee, W.H., Tsuge, T., Doi, Y., Sudesh, K., 2005. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters*, 27, 1405-1410.
- López, J.A., Bucalá, V., Villar, M.A., 2010. Application of dynamic optimization techniques for poly(β -hydroxybutyrate) production in a fed-batch bioreactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49, 1762-1769.
- Lu, X., Zhang, Q., Wu, Q., Chen, G.-Q., 2003. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 97-101.
- Luzier, W.D., 1992. Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academic of Science. USA*, 89, 839-842.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U., 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 15, 777-793.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Macrae, R.M., Wilkinson, J.F., 1958. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*, 19, 210-222.
- Madison, L.L., Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 21-53.
- Martini, F., Perazzo, L., Vietto, P., 1989. U.S. Patent 4,826,493.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., 1993. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3233-3238.
- Mukai, K., Yamada, K., Doi, Y., 1994. Efficient hydrolysis of polyhydroalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polymer Degradation and Stability*, 43, 319-327.
- Nobes, G.A.R., Marchessault, R.H., Briese, B.H., Jendrossek, D., 1998. Microscopic visualization of the enzymatic degradation of poly(3HB-co-3HV) and poly(3HV) single crystals by PHA depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. *Journal of Polymers and the Environment*, 6, 99-107.
- Noda, I., 2001. U.S. Patent 6,174,990 B1.
- Oliveira, F.C., Dias, M.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2007. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 633-638.
- Oliveira, F.C., Freire, D.M.G., Castilho, L.R., 2004. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology Letters*, 26, 1851-1855.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Ouyang, S.P., Luo, R.C., Chen, S.S., Liu, Q., Chung, A., Wu, Q., Chen, G.-Q., 2007. Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules*, 8, 2504-2511.
- Park, S.J., Ahn, W.S., Green, P.R., Lee, S.Y., 2001. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 81-86.
- Pederson, E.N., Srienc, F., 2004. Mass spectrometry feedback control for synthesis of polyhydroxyalkanoate granule microstructures in *Ralstonia eutropha*. *Macromolecular Bioscience*, 4, 243-254.
- Pessoa Jr., R., Menossi, L.C., Santos, M., Filho, R.R., Penna, T.C.V., 2005. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 59-70.
- Posada, J.A., Naranjo, J.M., López, J.A., Higuera, J.C., Cardona, C.A., 2011. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, 46, 310-317.
- Pötter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Steinbüchel, A., 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 148, 2413-2426.
- Pouton, C.W., Akhtar, S., 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advance Drug Delivery Reviews*, 18, 133-162.
- Preusting, H., Nijenhuis, A., Witholt, B., 1990. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules*, 23, 4220-4224.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Rao, U., Sridhar, R., Sehgal, P.K., 2010. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal*, 49, 13-20.
- Rusendi, D., Sheppard, J.D., 1995. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. *Bioresource Technology*, 54, 191-196.
- Ruth, K.A., Grubelnik, A., Hartmann, R., Egli, T., Zinn, M., Ren, Q., 2007. Efficient production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification. *Biomacromolecules*, 8, 274-286.
- Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22, 261-279.
- Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T., 1992. Uptake of organic substrate and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in biological excess phosphorus removal process. *Water Science and Technology*, 26, 933-942.
- Schirmer, A., Jendrossek, D., Schlegel, H.G., 1993. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1220-1227.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 2006. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 783-789.
- Steinbüchel, A., Fächtenbusch, B., 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*, 16, 419-427.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., Valentin, H.E., 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 103, 217-230.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128, 219-228.
- Sudesh, K., Abei, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25, 1503-1555.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., Ramsay, B.A., 2007. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 69-77.
- Tanio, T., Fukui, T., Shirakura, Y., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T.E.A., 1982. An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *European Journal of Biochemistry*, 124, 71-77.
- Thomsen, M.H., 2005. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 598-606.
- Tian, J., Sinskey, A.J., Stubbe, J., 2005. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 187, 3814-3824.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C., Roy, I., 2007a. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 1-17.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T., Bucke, C., Roy, I., 2007b. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132, 251-258.
- Valentin, H.E., Mitsky, T.A., Mahadeo, D.A., Tran, M., Gruys, K.J., 2000. Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5253-5258.
- Wallen, L.L., Davis, E.N., 1972. Biopolymers of activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 6, 161-164.
- Wallen, L.L., Rohwedder, W.K., 1974. Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 8, 576-579.
- Wang, L., Lee, S.Y., 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3703-3706.
- Wang, P., Schellhorn, H.E., 1995. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 170-176.
- Wiggan, M.I., O'kane, M.J., Harper, R., Atkinson, A.B., Hadden, D.R., Trimble, E.R., Bell, P.M., 1997. Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxybutyrate concentration as the endpoint of emergency management: a randomized controlled study. *Diabetes Care*, 20, 1347-1352.
- Williams, S.F., Peoples, O.P., 1996. Biodegradable plastics from plants. *Chemical Technology*, 26, 38-44.
- Williamson, D.H., Wilkinson, J.F., 1958. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, 19, 198-209.

Capítulo 2: Estado del arte de los PHAs, objetivos y plan de trabajo

- www.theplasticsexchange.com/Public/Public_News.aspx, The Plastic Exchange LLC, 2010.
- Xu, Y., Wang, R.H., Koutinas, A.A., Webb, C., 2010. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45, 153-163.
- Yamane, T., 1993. Yield of poly-D(-)3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 165-170.
- Yu, H., Shi, Y., Yin, J., Shen, Z., Yang, S., 2003. Genetic strategy for solving chemical engineering problems in biochemical engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 283-286.
- Yu, J., Si, Y., 2004. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short chain fatty acids. *Biotechnology Progress*, 20, 1015-1024.
- Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., Dennis, D., 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60.
- Zinn, M., Witholt, B., Egli, T., 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advance Drug Delivery Reviews*, 53, 5-21.

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de una nueva cepa de *B. megaterium* aislada del Estuario de Bahía Blanca

3.1. Introducción

Si bien en la actualidad se conocen más de 300 microorganismos capaces de sintetizar polihidroxicanoatos, sólo algunos de ellos como *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, y algunas cepas recombinantes de *E. coli*, son capaces de sintetizar PHAs con altos niveles de producción (Choi y Lee, 1999). Por ejemplo, Xu y col. (2010) han reportado la obtención de PHB con una producción del orden de 152 g/L usando *C. necator*. Por su parte, *A. latus* es otro microorganismo capaz de producir altos niveles de PHB. Wang y Lee (1997) han reportado la mayor productividad alcanzada en la síntesis de PHB con *A. latus*: 98,7 g/L de biopolímero en tan solo 20 h de fermentación. Por otro lado, Kim y col. (1992) lograron una producción de PHB de 88,8 g/L en 42 h de cultivo usando una cepa recombinante de *E. coli*. Además de tener en común su excelente capacidad para acumular PHB intracelular, estas tres cepas son organismos Gram negativos. La principal característica de las bacterias Gram negativas es que presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Debido a esta característica morfológica, las bacterias Gram negativas tienen endotoxinas en su membrana celular, lo cual causa reacciones inmunogénicas cuando son puestas en contacto directo con seres humanos. Este hecho implica que el PHB producido a

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

partir de microorganismos Gram negativos tiene que ser sometido a drásticos procesos de purificación si es que el producto final va a ser usado en biomedicina o en cualquier tipo de aplicación en organismos vivos (Valappil y col., 2007a).

Sin embargo, los microorganismos Gram positivos como *Bacillus* y *Streptomyces*, carecen de las cadenas de lipopolisacáridos (LPS) que contienen endotoxinas. Por lo tanto, estos microorganismos pueden ser usados con una total confianza en la producción de PHAs destinados especialmente a aplicaciones biomédicas.

Entre todas las bacterias Gram positivas, los géneros que tienen la habilidad para acumular PHAs son: *Bacillus* sp. (Kulpreecha y col., 2009; Macrae y Wilkinson, 1958; Valappil y col., 2007b; Williamson y Wilkinson, 1958), *Clostridium* sp. (Emeruwa y Hawirko, 1973), *Corynebacterium* sp. (Haywood y col., 1991), *Norcadia* sp. (Valentin y Dennis, 1996), *Rhodococcus* sp. (Haywood y col., 1991), *Streptomyces* sp. (Kannan y Rehacek, 1970; Manna y col., 1999; Verma y col., 2002), y *Staphylococcus* sp. (Szewcyk y Mikucki, 1989; Wong y col., 2000), entre otros. Además, es importante mencionar que las bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Norcadia*, *Rhodococcus* y algunas cepas de *Bacillus*, son las únicas bacterias de este grupo capaces de sintetizar de manera natural el copolímero P(3HB-co-3HV) a partir de fuentes de carbono simples como glucosa o glicerol (Alvarez y col., 2000; Haywood y col., 1991; Reddy y col., 2009b). Este hecho reduciría de manera considerable los costos de producción del copolímero, ya que para su manufactura se requieren al menos dos fuentes de carbono diferentes que estimulen la formación del copolímero. En contraste, las bacterias Gram negativas necesitan de fuentes de carbono mucho más costosas como ácido propiónico, ácido valérico, u otros ácidos grasos con un número impar de carbonos, con el objetivo de

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

producir copolímeros de PHAs (Doi, 1990). Por otro lado, es importante mencionar que de todos los microorganismos Gram positivos mencionados anteriormente, los pertenecientes al género *Bacillus* son los que presentan las mejores características y capacidades para la producción de PHAs, ya que los niveles de producción reportados en la literatura son marcadamente mayores que aquellos reportados para el resto de los demás microorganismos Gram positivos (Valappil y col., 2007a).

Durante los primeros años de estudio de los PHAs, estos polímeros fueron obtenidos inicial y particularmente en microorganismos del género *Bacillus* (Doudoroff y Stanier, 1959; Lemoigne, 1923; Williamson y Wilkinson, 1958). Estos estudios sirvieron de base para importantes avances sobre la producción de PHAs alcanzados durante los últimos años principalmente en bacterias Gram negativas. Aunque la ausencia de la membrana LPS en los microorganismos Gram positivos los muestra con excelentes características para la producción de PHAs con fines biomédicos, estos microorganismos tienen en sí un gran problema con miras a la implementación industrial: la esporulación. La formación de esporas en los microorganismos del género *Bacillus* es común en todos sus miembros, éstos forman estas estructuras adaptadas para sobrevivir por prolongados periodos de tiempo cuando encuentran condiciones de cultivo desfavorables como una alta proporción de fuente de carbono a fuente de nitrógeno. Desafortunadamente, las mismas condiciones que conllevan a la esporulación, son las que estimulan la formación de PHAs intracelulares en estos microorganismos. Es por ello que los niveles de PHAs acumulados en *Bacillus* sp. son marcadamente menores que aquellos obtenidos en microorganismos Gram negativos como *C. necator* y *A. latus*.

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

Tabla 3.1. Comparación entre algunas de las bacterias del género *Bacillus* productoras de PHAs en base a las fuentes de carbono que consumen y los copolímeros que producen

Bacteria	Fuente de carbono	PHAs producidos	PHA (% o g/L)	Referencia
<i>B. megaterium</i> DSMZ 50	Glucosa, fructosa, sacarosa	PHB	65 %	Sabra y Aboud-Zeid (2008)
<i>B. megaterium</i> SRKP-3	Fibra de arroz	PHB	6.4 g/L	Pandian y col. (2010)
<i>B. megaterium</i> BA0-19	Melazas de caña	PHB	24 – 62 %	Kulpreecha y col. (2009)
<i>B. cereus</i> SPV	Glucosa	PHB	29 – 31 %	Valappil y col. (2007b)
<i>Bacillus</i> sp. JMa5	Melazas de caña	PHB	25 – 35 %	Wu y col. (2001)
<i>B. cereus</i> M5	Melazas de remolacha	PHB	74 %	Yilmaz y Beyatli (2005)
<i>B. megaterium</i> OU303A	Glucosa, glicerol	P(3HB-co-3HV)	48 – 62 %	Reddy y col. (2009b)
<i>Bacillus</i> sp. 88D	Glucosa, glicerol	P(3HB-co-3HV)	42 – 65 %	Reddy y col. (2009a)
<i>Bacillu</i> sp. 871 y 112A	Lactosa, galactosa, fructosa, glucosa, manitol, sacarosa, maltosa, almidón	PHAs	25 – 70 %	Thirumala y col. (2010)
<i>Bacillus</i> sp. INT005	Glucosa, butirato, hexanoato, valerato, octanoato, decanoato	PHB, P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-3HV-co-4HB)	13 – 64 %	Tajima y col., (2003)

Sin embargo, en los últimos años, los niveles de PHAs acumulados en bacterias del género *Bacillus* se han incrementado notoriamente de valores medios menores a un 50 % hasta valores mayores al 70 % cuando se emplean fuentes de carbono complejas como

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

melazas de remolacha y caña de azúcar. Esto significa que bajo condiciones óptimas de proceso y con una mejora en los medios de cultivo puede incrementarse aún más los niveles de producción de PHAs empleando cepas del género *Bacillus*. Con la idea de mostrar las investigaciones más recientes relacionadas con la producción de PHAs a partir de microorganismos del género *Bacillus*, la Tabla 3.1 reporta los trabajos más representativos en esta área.

Aunque los porcentajes de acumulación de PHAs en cepas *Bacillus* ha mejorado notoriamente en los últimos años y estos microorganismos tienen la capacidad de producir diferentes copolímeros, aún existe un serio problema en miras a la producción industrial: las concentraciones finales de biomasa, y por ende de PHA, son demasiado bajas en comparación con las que se obtienen normalmente en microorganismos Gram negativos. La concentración de biomasa alcanzada por la gran mayoría de los autores reportados en la Tabla 3.1, generalmente no supera los 4 o 5 g/L. Estos valores son extremadamente bajos con miras a la producción industrial de PHAs a partir de *Bacillus*. Sin embargo, el trabajo publicado recientemente por Kulpreecha y col. (2009) ha mejorado el panorama, ya que estos autores lograron concentraciones celulares por encima de 70 g/L usando una cepa de *Bacillus megaterium* en un medio complejo y barato basado en melazas de caña y urea. Este trabajo y el reportado por Sabra y Aboud-Zeid (2008) han demostrado que se pueden alcanzar mejores productividades en cepas *Bacillus* cuando se hace una correcta búsqueda del medio de cultivo y de las condiciones de operación.

El objetivo del presente capítulo es contribuir al estudio de la producción de PHB en cepas del género *Bacillus*, así como a la mejora de dichos niveles de producción en base a diferentes estrategias de biorreactor. En ese sentido fueron desarrolladas diversas técnicas

experimentales con el principal objetivo de aislar cepas productoras de PHB a partir de suelos y aguas de la región de Bahía Blanca. Además, la cepa aislada que presentó las mejores características para la producción de PHB fue usada para estudios posteriores. Con el objetivo de brindar mejores perspectivas a futuro sobre la producción de PHB a partir de cepas del género *Bacillus*, y en base a los resultados obtenidos en este capítulo, el **Capítulo 8** de esta tesis está abocado al análisis y aplicación de nuevas metodologías que podrían ser aplicadas a la mejora de los niveles de producción de biopolímeros a partir de estos microorganismos Gram positivos (López y col., 2011).

3.2. Aislamiento de cepas productoras de PHB

Para el aislamiento de cepas productoras de PHB fueron tomadas dos muestras de suelo diferentes, una proveniente de un cultivo de maíz en Sierra de la Ventana (Buenos Aires, Argentina) y otra de las inmediaciones del Parque de Mayo de la ciudad de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina). También fueron tomadas muestras de sedimentos superficiales del Estuario de Bahía Blanca. En todas las muestras se siguió la misma metodología que se detalla a continuación.

10 gramos de cada muestra fueron suspendidos en 90 mL de una solución salina estéril (1,5 % NaCl, 0,04 % MgCl, 0,01 % KCl) y posteriormente homogeneizadas en un agitador orbital a 200 rpm durante 10 min. Las muestras en suspensión fueron calentadas a 80 °C por 10 min en un baño de agua y posteriormente diluidas en soluciones salinas estériles. Alícuotas de 0,1 mL fueron colocadas en cajas de Petri con medio sólido de Winograski (Pochon y Tardieu, 1962) con las siguientes características: 0,1 % NH₄NO₃, 0,1 % KH₂PO₄, 1 % glucosa y 1.2 % agar, pH: 7.2. Las cajas de Petri fueron incubadas a 30 °C durante 48 h para observar la formación de colonias. En total fueron observadas una

gran cantidad de colonias provenientes de las diferentes muestras analizadas. La capacidad de estas colonias para producir PHB fue analizada en base al método de tinción de Negro Sudan (Kitamura y Doi, 1994). En base a los resultados obtenidos en esta etapa, sólo 5 colonias fueron elegidas en base a su capacidad de producir PHB: dos provenientes del Parque de Mayo (lago 1 y lago 2), 1 proveniente de las muestras de suelo de Sierra de la Ventana y dos de los sedimentos superficiales del Estuario de Bahía Blanca. De los 5 diferentes microorganismos aislados y capaces de acumular gránulos intracelulares de PHB, se destacan principalmente una de las cepas provenientes del Parque de Mayo y otra proveniente de los sedimentos marinos del Estuario de Bahía Blanca.

Estos dos microorganismos fueron caracterizados fenotípicamente por medio de la reacción de Gram, la morfología de sus esporas y por el test de la catalasa. Además, algunas de sus propiedades fisiológicas fueron estudiadas de acuerdo al Manual Bergey's de Bacteriología Determinativa (Buddingh, 1975). En base al análisis de sus características, la cepa proveniente del Parque de Mayo fue identificada como una bacteria del género *Azotobacter*, mientras que la obtenida a partir de los sedimentos marinos del Estuario de Bahía Blanca fue identificada como un microorganismo del género *Bacillus*. Las características microbiológicas de ambas especies son mostradas en la Tabla 3.2.

Luego del proceso de identificación de los dos microorganismos con mejores capacidades para la acumulación de PHB, ambas cepas fueron sometidas a un análisis más profundo sobre su capacidad como productor de PHB. En esta etapa fueron empleados los métodos de tinción por fluorescencia basados en Rojo Nilo (Gorenflo y col., 1999) y Azul Nilo (Takagi y Yamane, 1997). Finalmente, la cepa de *Bacillus* sp. fue seleccionada debido a su mayor capacidad para acumular PHB en tiempos de cultivo relativamente cortos. En la

Figura 3.1 se presentan micrografías de fluorescencia tomadas para la cepa de *Bacillus* en dos tiempos diferentes de cultivo.

Tabla 3.2. Propiedades taxonómicas de las bacterias de *Bacillus* sp. y *Azotobacter* sp. aisladas y caracterizadas como productoras de PHB

Características	<i>Bacillus</i> sp. (Estuario BB)	<i>Azotobacter</i> sp. (Parque de Mayo)
<i>Características morfológicas</i>		
Forma	Bacilos	Bacilos
Tamaño (µm)	1,0 por 2,0-4,0	Hasta 6
Movilidad	+	+
Coloración de Gram	+	-
Formación de esporas	+	-
Formación de quistes	-	+
<i>Características de las colonias</i>		
Forma	Circular	Circular
Color	Blanco opaco	Pardo
Superficie	Sin brillo	Opaca
<i>Características fisiológicas</i>		
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	+
<i>Características nutricionales</i>		
Glucosa	+	+
Almidón	+	-

La fluorescencia temprana, presenciada a 20 h de cultivo, fue uno de los motivos principales para elegir esta cepa como la mejor de entre los 5 microorganismos aislados inicialmente. Adicionalmente, con el objetivo de caracterizar más en detalle la capacidad de esta cepa para producir y almacenar PHB, se analizó la formación de gránulos mediante

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

microscopía electrónica de transmisión a dos tiempos diferentes de cultivo (Figura 3.2). En dicha figura se observa claramente que existe formación de gránulos intracelulares de PHB a 20 h de cultivo. Sin embargo, la mayor acumulación ocurre a las 48 h de cultivo, correspondiente a la segunda etapa metabólica del cultivo: deficiencia en la fuente de nitrógeno y presencia de un exceso de la fuente de carbono.

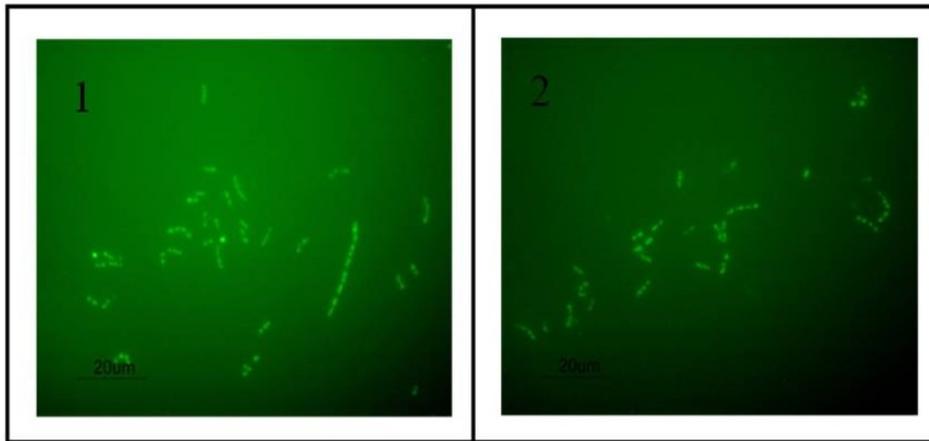


Figura 3.1. Fotografías de microscopía de fluorescencia de la cepa *Bacillus* sp. a dos tiempos diferentes de cultivo: (1) 20 h y (2) 48 h

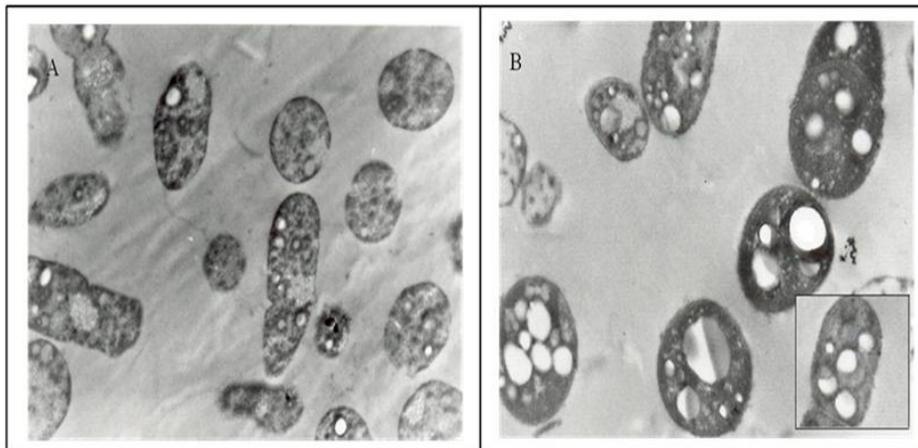


Figura 3.2. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de la cepa *Bacillus* sp. a dos tiempos de cultivo diferentes: A) 20 h y B) 48 h

3.3. Secuenciación y caracterización de la cepa *Bacillus* sp.

Con la idea de identificar totalmente la cepa de *Bacillus* sp., confirmar su género y descifrar su especie, se desarrolló un cultivo celular de esta cepa en medio nutritivo y se extrajo el ADN usando un kit de purificación Wizard Genomic DNA (Promega Corporation, Madison, WI). La secuencia genética 16S rRNA (correspondiente a las posiciones 27-1492 en el gen de *Escherichia coli*) fue purificada de acuerdo a la descripción de DeLong (1992), usando un ciclón térmico Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ). La secuenciación de ambos ramales de los fragmentos de PCR ampliados, fue desarrollada usando el método de terminación de cadena de dideoxi mediante los servicios comerciales del Instituto Nacional de Tecnología Agrícola (INTA, Argentina). Las secuencias genéticas fueron comparadas con las correspondientes a la base de datos de GenBank con BLAST (Altschul y col., 1990) y posteriormente identificadas usando el programa EzTaxon (Chun y col., 2007). Las secuencias genéticas obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bajo el número de acceso HM119600.1.

Los resultados obtenidos de la secuenciación genética (1,411 bp) previamente descrita indicaron que la cepa aislada de sedimentos marinos del Estuario de Bahía Blanca tiene una secuencia de 16S rDNA homologa en un 100 % con *Bacillus megaterium*. Debido a su procedencia, esta bacteria fue denominada en las siguientes etapas de este estudio como *Bacillus megaterium* BBST4.

3.4. Extracción de PHB

Esta sección está destinada a la comparación en cuanto a productividad y capacidad de purificación, de los tres métodos de extracción de PHB descritos en el **Anexo A**. Para

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

este estudio, se usó la cepa comercial *Alcaligenes latus* DSMZ 1123, que debido a sus características morfológicas, es la cepa que más se asemeja a todos los microorganismos usados en esta tesis (Jacquel y col., 2008). Bajo esta idea, el principal objetivo fue encontrar entre los tres métodos propuestos, aquel que brinde la mayor pureza de biopolímero, así como el mayor rendimiento en base a la concentración inicial de PHB.

La cepa de *A. latus* fue cultivada en un medio nutritivo durante 24 h a 30 °C y 200 rpm y el material celular fue recolectado y liofilizado como se describe en el **Anexo A**. El PHB producido por el método de digestión + extracción con soxhlet fue purificado nuevamente por la técnica de dispersión-extracción y el PHB obtenido fue usado como estándar para el cálculo de la pureza del PHB mediante cromatografía gaseosa. El porcentaje de recuperación de PHB fue calculado a partir de la cantidad conocida de PHB en las células, la cual fue medida a partir de cromatografía gaseosa, y del total de PHB recuperado a partir de cada método de extracción. La Figura 3.3 muestra los resultados correspondientes a los tres métodos de extracción estudiados en términos de pureza y rendimiento.

En esta figura se observa claramente una marcada diferencia entre los rendimientos de extracción de los tres métodos estudiados: 43 % para el método de digestión + extracción con soxhlet, 98 % para dispersión con hipoclorito de sodio y cloroformo, y 56 % para el método de extracción directa con soxhlet. Por otro lado, se encontró además que la pureza del PHB obtenido mediante estos métodos fue del 99, 96 y 96 %, respectivamente. En base a estos resultados fue seleccionado el método de dispersión-extracción con cloroformo como el método de extracción para las etapas posteriores, excepto en la extracción a partir de *Bacillus megaterium* BBST4 donde se empleó el método de digestión + extracción con soxhlet debido a la alta pureza del PHB obtenido.

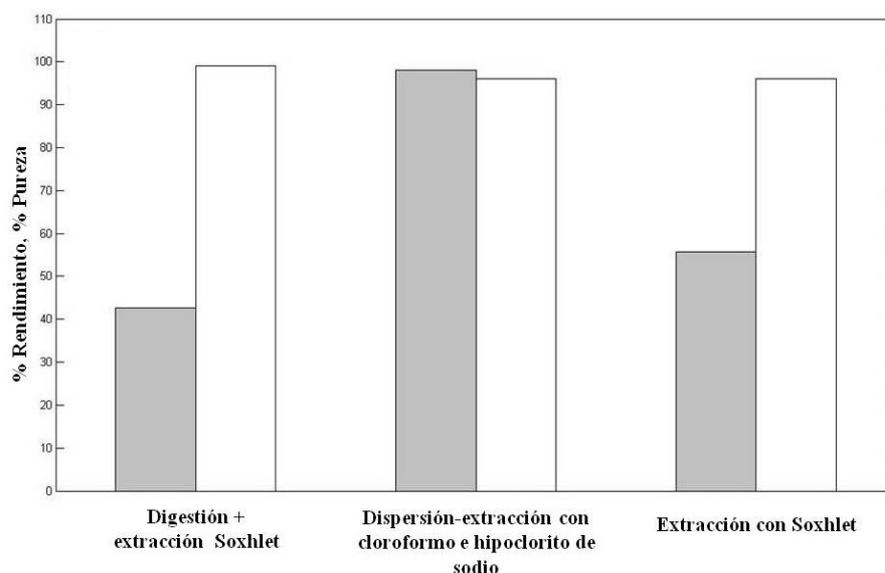


Figura 3.3. (■) % Rendimiento y (□) % pureza del PHB producido a partir de *Alcaligenes latus* obtenido mediante tres métodos de extracción diferentes

3.5. Fermentaciones usando *B. megaterium* BBST4

3.5.1. Fermentaciones en agitador orbital

Las fermentaciones a nivel de agitador orbital fueron desarrolladas con la idea de conocer el rendimiento de *Bacillus megaterium* BBST4 y poder así mejorar los rendimientos de fermentación cuando se realizaran los experimentos a nivel de biorreactor. En términos generales, fueron desarrolladas varias fermentaciones en agitador orbital, pero sólo dos de ellas resultaron totalmente representativas del comportamiento de *B. megaterium* en la producción de PHB. Las Figuras 3.4 y 3.5 muestran dos fermentaciones discontinuas desarrolladas con el medio de cultivo mineral descrito en el **Anexo A** para esta cepa, empleando dos concentraciones iniciales de glucosa diferentes: 10 y 20 g/L. Ambas fermentaciones se intentaron llevar a cabo hasta que la fuente de carbono se agotara por completo. Sin embargo, para la fermentación con una concentración inicial de glucosa de 20 g/L esto no fue posible, ya que después de 50 h de fermentación, la glucosa no fue

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

consumida de manera significativa por la bacteria. Este comportamiento fue atribuido a la esporulación de *B. megaterium*.

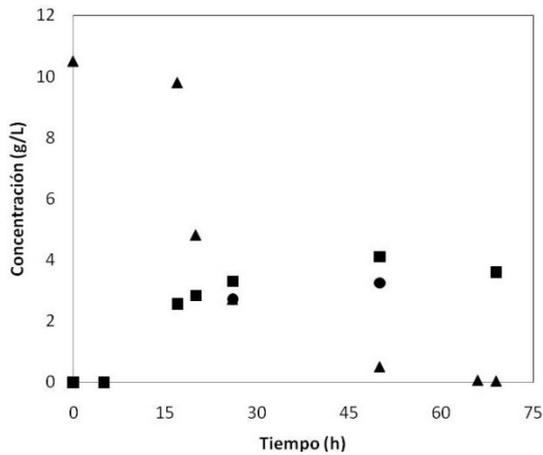


Figura 3.4. Concentración de peso celular seco (■), glucosa (▲) y PHB (●) obtenido a partir de la fermentación de *B. megaterium* BBST4 en Erlen-meyers. (Concentración inicial de glucosa: 10 g/L)

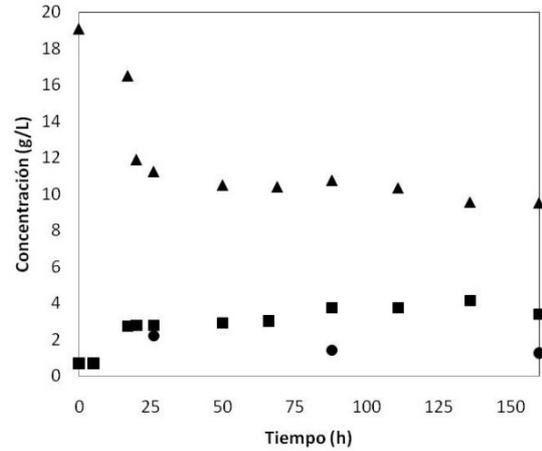


Figura 3.5. Concentración de peso celular seco (■), glucosa (▲) y PHB (●) obtenido a partir de la fermentación de *B. megaterium* BBST4 en Erlen-meyers. (Concentración inicial de glucosa: 20 g/L)

Una concentración inicial de glucosa de 10 g/L lleva al total consumo de la fuente de carbono en casi 50 h de fermentación. Además, la máxima concentración celular (4,1 g/L) fue alcanzada en 50 h, en donde también se alcanzó la máxima acumulación de PHB durante toda la fermentación: 79 %. Este valor de acumulación es muy elevado en comparación con otras cepas de *Bacillus* reportadas en la literatura (Tabla 3.1). Por otro lado, los resultados de la fermentación con una concentración inicial de glucosa de 20 g/L, muestran claramente que una alta relación carbono/nitrógeno estimula la esporulación de *B. megaterium* BBST4. Esto es evidenciado por dos factores que se observan en la Figura 3.5: 1) la máxima concentración de PHB alcanzada durante toda la fermentación a las 25 h., con una posterior disminución en la concentración debido al consumo de PHB durante

el proceso de esporulación y 2) concentraciones de glucosa y biomasa prácticamente constantes, luego de alcanzar la máxima concentración de PHB, evidenciando claramente la inactividad metabólica de la cepa. Estos resultados en conjunto con los obtenidos en biorreactores serán analizados en detalle al final de este capítulo.

3.5.2. Fermentaciones en biorreactor

Se realizaron fermentaciones a nivel de biorreactor con la cepa *B. megaterium* BBST4 bajo dos metodologías diferentes: discontinua (batch) y semicontinua por ajuste de pH (pH-stat fed-batch). Las concentraciones de glucosa y nitrógeno así como la concentración de biomasa y el % PHB acumulado se presentan en la Fig. 3.6. En ambas fermentaciones el pH fue controlado y mantenido en 7 (**Anexo A**). En el transcurso de la fermentación discontinua, el pH fue ajustado por la adición automática de NaOH 1 N y HCl 1 N, mientras que durante el transcurso de la fermentación semicontinua, éste fue controlado usando una solución básica de 40 g/L de glucosa, y una solución ácida de HCl 1N. En este último caso, a medida que disminuía el pH como señal de actividad celular, éste era incrementado por la adición de fuente de carbono con el fin de mejorar las condiciones de cultivo y estimular la producción de PHB.

Las fermentaciones discontinuas fueron desarrolladas durante 34 h, mientras que las fermentaciones semicontinuas se llevaron a cabo durante 32 h. Las productividades obtenidas para las fermentaciones semicontinuas, como comúnmente ocurre en el caso de producción de metabolitos secundarios, fueron mayores que las correspondientes a las fermentaciones discontinuas. En el caso de las fermentaciones discontinuas las productividades de biomasa y PHB fueron 0,139 y 0,082 g/L h, respectivamente; mientras que para las fermentaciones semicontinuas, los valores correspondientes fueron 0,353 y

0,102 g/L h, respectivamente. La máxima acumulación de PHB en ambas fermentaciones fue alcanzada en tiempos similares, sin embargo, la mayor diferencia entre las mismas fue el porcentaje de PHB intracelular acumulado.

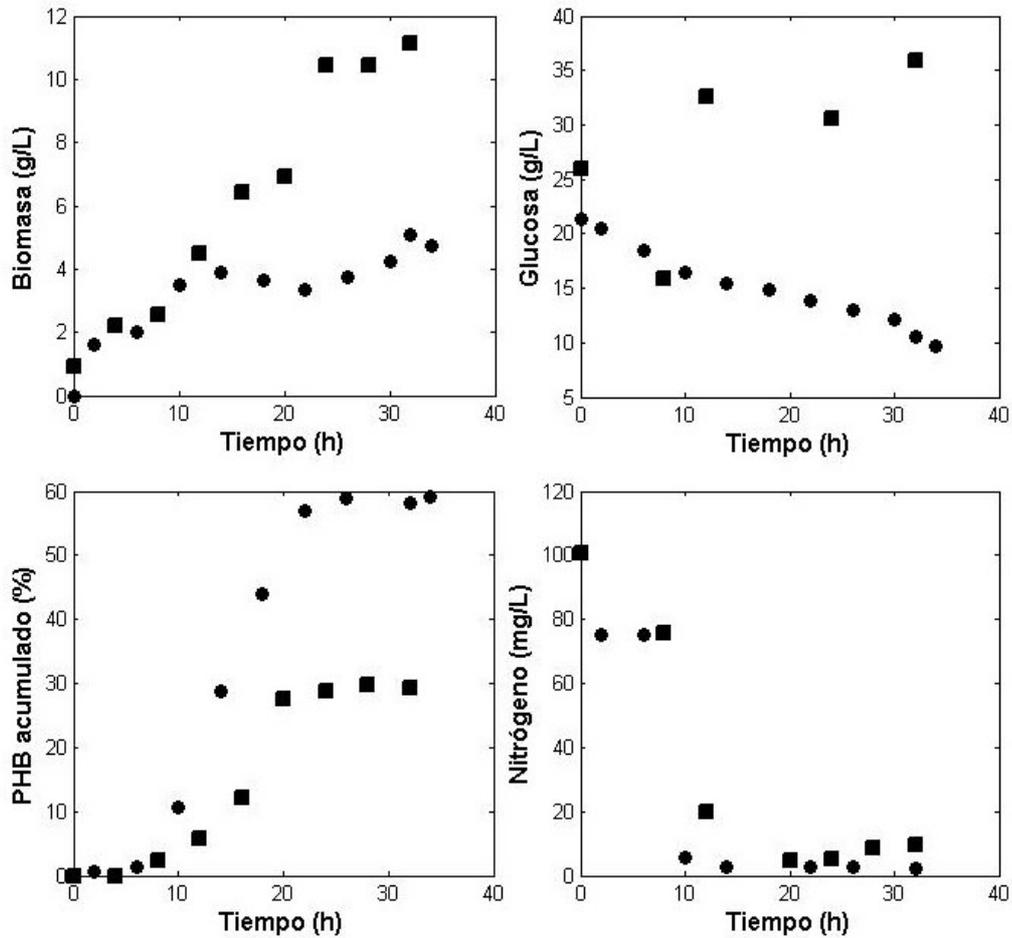


Figura 3.6. Concentraciones de glucosa, nitrógeno y biomasa y %PHB acumulado en función del tiempo para las fermentaciones discontinua (●) y semicontinua (■) empleando *B. megaterium* BBST4

Para casi todos los microorganismos capaces de acumular PHB como *C. necator*, *A. latus* y cepas recombinantes de *E. coli*, se alcanzan las mayores acumulaciones de PHB cuando se realizan fermentaciones semicontinuas en lugar de discontinuas. Las

configuraciones semicontinuas son capaces de estimular las dos etapas metabólicas necesarias para la producción de PHB: crecimiento balanceado con baja producción de polímero, y una alta acumulación de PHB sin producción de biomasa residual. Sin embargo, para el caso de cepas del género *Bacillus*, es típico encontrar resultados opuestos debido a que la energía que es normalmente usada para producir PHB es también empleada para la formación de esporas, lo cual resulta en una disminución de la síntesis de PHB por parte de los microorganismos cuando son impuestas condiciones limitantes en la segunda etapa. Resultados similares fueron reportados por Kulpreecha y col. (2009) usando *Bacillus megaterium* BA-019. Estos autores obtuvieron un 62 % de acumulación de PHB en la operación discontinua en comparación con un 42 % de acumulación en la operación semicontinua. En términos de productividad, el nivel de PHB acumulado en las cepas del género *Bacillus* es el cuello de botella para futuras aplicaciones industriales. Sin embargo, el hecho de que estos microorganismos Gram positivos no posean la capa exterior de LPS les otorga algunas ventajas para la producción de PHB con aplicaciones biomédicas.

3.6. Conclusiones

En esta parte del trabajo se aislaron cepas nativas capaces de almacenar altos contenidos de PHB. De los 5 microorganismos aislados inicialmente fue elegida la cepa que mostró las mejores características para la producción de PHB. Esta cepa fue fenotípicamente identificada como *Bacillus megaterium* y, debido a su procedencia, fue denominada BBST4. Se estudió la capacidad de esta cepa para producir y acumular PHB intracelular en tres esquemas diferentes de fermentación: agitador orbital, biorreactor en modo discontinuo (batch) y en modo semicontinuo (pH-stat fed-batch). En las fermentaciones en agitador orbital, usando una concentración inicial de glucosa de 10 g/L,

se pudo obtener una acumulación de PHB del 78 %. Este valor es uno de los más altos reportados hasta la fecha para cepas del género *Bacillus*. El valor de acumulación obtenido indica además que el nivel de esporulación de la cepa de *Bacillus megaterium* aislada en este trabajo es mucho menor que el que ha sido reportado en otras cepas de este género (Valappil y col., 2007a).

Los valores de productividad alcanzados en las fermentaciones a nivel de biorreactor demuestran que esta cepa es capaz de producir mayores niveles de biomasa celular que los comúnmente encontrados para cepas *Bacillus* en condiciones nutricionales similares. Por ejemplo, en la fermentación semicontinua se alcanzaron niveles de biomasa celular de aproximadamente 12 g/L. Este valor es mucho mayor al valor de entre 4 y 5 g/L reportado por otros autores en los últimos años (Reddy y col., 2009a; b; Wu y col., 2001; Yilmaz y Beyatli, 2005). Por lo tanto, con un trabajo experimental más profundo y enfocado a nuevas técnicas experimentales que han surgido en los últimos años, esta cepa de *Bacillus megaterium* BBST4 podría ser una buena productora de biopolímeros a partir de fuentes de carbono renovables y económicas. En el **Capítulo 8** de esta tesis se mencionan algunas de las técnicas a futuro que pueden ser aplicadas a la producción de PHB a partir de cepas *Bacillus* con el objetivo de maximizar los niveles de producción actuales.

3.7. Referencias

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Alvarez, H.M., Kalscheuer, R., Steinbüchel, A., 2000. Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 218-223.

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

- Buddingh, G.J., 1975. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Eds. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Choi, J., Lee, S.Y., 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 13-21.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W., 2007. EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2259-2261.
- De Long, E.F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 5685-5689.
- Doi, Y., 1990. *Microbial Polyesters*. VCH: New York.
- Doudoroff, M., Stanier, R.Y., 1959. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature*, 183, 1440-1442.
- Emeruwa, A.C., Hawirko, R.Z., 1973. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology*, 116, 989-993.
- Gorenflo, V., Steinbüchel, A., Marose, S., Rieseberg, M., Scheper, T., 1999. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 765-772.
- Haywood, G.W., Anderson, A.J., Williams, R.D., Dawes, E.A., Ewing, D.F., 1991. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 83-88.

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S., Wang, S.S., 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39, 15-27.
- Kannan, L.V., Rehacek, Z., 1970. Formation of poly-3-hydroxybutyrate by *Actinomycetes*. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 126-129.
- Kim, B.S., Lee, S.Y., Chang, H.N., 1992. Production of poly-3-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 14, 811-818.
- Kitamura, S., Doi, Y., 1994. Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnology Techniques*, 8, 345-350.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., 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, 240-245.
- Lemoigne, M., 1923. Production de l'acide β -oxybutyrique par certaines bactéries du groupe du *Bacillus subtilis*. *CR. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 176, 1761.
- López, J.A., Naranjo, J.M., Higuera, J.C., Cubitto, M.A., Cardona, C.A., Villar, M.A., 2011. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from a new *Bacillus megaterium* strain isolated from Bahía Blanca Estuary – Argentina. *Submitted*
- Macrae, R.M., Wilkinson, J.F., 1958. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*, 19, 210-222.
- Manna, A., Banerjee, R., Paul, A.K., 1999. Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. *Current Microbiology*, 39, 153-158.
- Pandian, S.R., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., Gurunathan, S., 2010. Optimization of fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

- sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technology*, 101, 705-711.
- Pochon, J., Tardieu, L., 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle, Paris.
- Reddy, S.V., Thirumala, M., Mahmood, S.K., 2009a. A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 837-843.
- Reddy, S.V., Thirumala, M., Mahmood, S.K., 2009b. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 391-397.
- Sabra, W., Aboud-Zeid, D.M., 2008. Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yield by *Bacillus megaterium*. *Research Journal of Microbiology*, 3, 308-318.
- Szewczyk, E., Mikucki, J., 1989. Poly-3-hydroxybutyric acid in *Staphylococci*. *FEMS Microbiology Letters*, 61, 279-284.
- Tajima, K., Igari, T., Nishimura, D., Nakamura, M., Satoh, Y., Munekata, M., 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxylakanoate (PHA) from gas field soil *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 77-81.
- Takagi, Y., Yamane, T., 1997. Replica technique for screening poly(3-hydroxyalkanoic acid)-producing bacteria by Nile blue staining. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 121-123.

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

- Thirumala, M., Reddy, S.V., Mahmood, S.K., 2010. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 271-278.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C., Roy, I., 2007a. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 1-17.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T., Bucke, C., Roy, I., 2007b. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132, 251-258.
- Valentin, H.E., Dennis, D., 1996. Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia corallina*: inactivation of *mutB* by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 372-379.
- Verma, S., Bhatia, Y., Valappil, S.P., Roy, I., 2002. A possible role of poly-3-hydroxybutyric acid in antibiotic production in *Streptomyces*. *Archives in Microbiology*, 179, 66-69.
- Wang, L., Lee, S.Y., 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3703-3706.
- Williamson, D.H., Wilkinson, J.F., 1958. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxy-butyrates of *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, 19, 198-209.

Capítulo 3: Producción de PHB a partir de *B. megaterium* BBST4

- Wong, A.L., Chua, H., Yu, P.H., 2000. Microbial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria isolated from oil wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 86, 843-857.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K.P., Chen, G.-Q., 2001. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 111-118.
- Xu, Y., Wang, R.H., Koutinas, A.A., Webb, C., 2010. Microbial biodegradable plastics production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45, 153-163.
- Yilmaz, M., Beyatli, Y., 2005. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by a *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses. *Zuckerindustrie*, 130, 109-112.

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur implementando el concepto de biorrefinería

4.1. Introducción

En la actualidad es de vital importancia reducir los elevados costos de producción relacionados con los PHAs. En ese sentido, es necesario reconsiderar las estrategias actuales de síntesis basadas, principalmente, en la utilización de medios sintéticos. El valor de los sustratos empleados en la fermentación para la obtención de poli(3-hidroxi-butarato) bacterial constituye entre el 28 y el 50 % de los costos totales de producción (Braunegg y col., 2004; Lee y Choi, 1998; Lynd y col., 1999). Como consecuencia, se han enfocado los esfuerzos hacia la explotación de materiales renovables económicos y de diversos subproductos comerciales para su aplicación como medios para la producción de PHAs y otros productos químicos (Solaiman y col., 2006; Thomsen, 2005). En los últimos años han sido publicados diversos trabajos basados en la utilización de una gran variedad de fuentes agrícolas y subproductos para la producción de PHAs mediante la implementación de diversas metodologías experimentales. Las oportunidades de uso de materias primas renovables y subproductos industriales en esquemas de biorrefinerías, así como las futuras tendencias en esta área pueden ser perfectamente extendidos y aplicados a una producción sostenible de los PHAs (Solaiman y col., 2006, Kamm y Kamm, 2004; Ramachandran y col., 2007; Thomsen, 2005).

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Como fue mencionado en el **Capítulo 2**, las biorrefinerías buscan el uso integral de todos los componentes presentes en materias primas renovables como lo son los polímeros naturales compuestos por azúcares, las proteínas compuestas por una gran diversidad de aminoácidos, y los demás minerales y vitaminas disponibles en ellas (Kamm y Kamm, 2004). El éxito de estos procesos dependerá de una implementación gradual de los actuales niveles de producción de bienes y servicios reemplazando las materias primas provenientes de fuentes fósiles por otras provenientes de fuentes renovables. Este concepto de biorrefinería es muy reciente y es esperable que se realicen avances significativos en los próximos años.

El topinambur (*Helianthus tuberosus*) es una planta de la familia del girasol, originaria de los valles de los ríos de Ohio y Mississippi en los Estados Unidos, el cual ha sido introducido y adaptado como un cultivo económico alrededor del mundo debido a sus condiciones de cultivo simple (Pan y col., 2009). Esta planta tiene tallos de entre 1,5 y 3 metros de largo con hojas largas y una flor muy semejante a la del girasol. El valor nutritivo de sus tubérculos, tallos y hojas es muy alto. Sin embargo, sus aplicaciones hasta antes del año de 1990, estuvieron abocadas, principalmente, hacia su uso como material de follaje. A principio de los años 90s, los tubérculos de esta planta fueron estudiados, debido a su alto contenido en carbohidratos y proteínas, con el objetivo de producir etanol a partir de la transformación directa de inulina (Barthomeuf y col., 1991; Nakamura y col., 1996). Dichas transformaciones deben ser llevadas a cabo por microorganismos como hongos y levaduras, capaces de producir *in situ* principalmente inulinasas e invertasas que luego hidrolizan la inulina, con el objetivo de generar una solución de azúcares asimilables directamente.

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Los tubérculos del topinambur son muy semejantes a las papas. Al igual que otros tubérculos contienen grandes cantidades de carbohidratos, los cuales son almacenados, en el caso del topinambur, en forma de inulina (Fleming y GrootWassink, 1979). Su porción de carbohidratos es bastante alta, representando aproximadamente el 75 % del peso seco (15 a 25 % de peso húmedo). La inulina es un polisacárido natural que consiste de cadenas lineales de fructosa enlazadas por enlaces β -2,1 (ver Figura 4.1) y es almacenada por la planta como una reserva de energía.

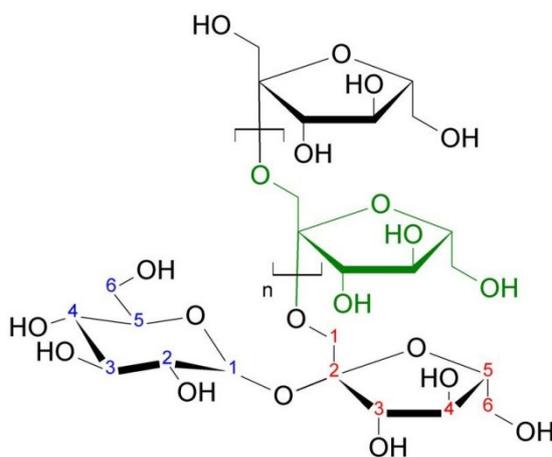


Figura 4.1. Estructura química de la inulina

Además de ser una cadena carbonada de fructosas, la inulina tiene una molécula de glucosa terminal como residuo en extremo y una sacarosa terminal en el otro extremo. El número de fructosas enlazadas a la glucosa terminal puede variar desde unas pocas hasta alrededor de 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros (Ricca y col., 2007). En ese sentido, la hidrólisis completa de la inulina genera unidades de fructosa y glucosa, cuya concentración es proporcional a su grado de polimerización.

Los tubérculos de topinambur tienen una gran facilidad para su cultivo pudiendo crecer bajo condiciones climáticas desfavorables. Estas cualidades convierten al

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

topinambur en una excelente alternativa para la producción de jarabe de fructosa y otros intermediarios para diversas aplicaciones biotecnológicas (López y col., 2011). Debido a su alto contenido en carbohidratos y otros nutrientes, los tubérculos de topinambur han sido usados en diversos procesos biotecnológicos para la producción de una gran variedad de productos como: ácido láctico (Ge y col., 2009; 2010), biodiesel (Cheng y col., 2009), etanol (Barthomeuf y col., 1991; Ge y Zhang, 2005; Nakamura y col., 1996; Szambelan y col., 2004) , butanol (Chen y col., 2010), 2,3-butanodiol (Fages y col., 1986; Li y col., 2010; Sun y col., 2009), lípidos (Zhao y col., 2010) y proteínas (Bajpai y Bajpai, 1991; Gao y col., 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado el uso de topinambur para la producción de PHB microbiano.

En el presente capítulo se estudia la viabilidad del topinambur como única fuente de carbono y nutrientes en la producción de polímeros biodegradables. El desarrollo experimental se basó en el concepto de biorrefinería con las siguientes etapas: 1) utilización de topinambur como medio de cultivo para fermentaciones en estado sólido usando el hongo filamentoso *Aspergillus awamori*, con el objetivo de producir una solución cruda rica en un conjunto de enzimas específicas; 2) utilización del contenido inulínico y proteico del topinambur como materia prima para la hidrólisis a partir de las enzimas crudas producidas en la etapa anterior con el objetivo de producir un medio de cultivo rico en fructosa y nutrientes y 3) producción de PHB empleando *Cupriavidus necator* DSMZ 4058 utilizando Erlenmeyers en un agitador orbital usando el medio de cultivo producido en la etapa anterior.

El proceso global fue realizado en etapas dado que tanto la inulina como las proteínas presentes en el topinambur son macromoléculas no asimilables directamente o metabolizadas por las bacterias. Por lo tanto, los pasos a la fermentación que incluyen la

producción de enzimas y la hidrólisis enzimática son de vital importancia para la producción de un medio de cultivo genérico y totalmente asimilable por *C. necator*.

4.2. Producción de medio de cultivo genérico a partir de topinambur

4.2.1. Producción de enzimas crudas a partir de SSFs

Con el objetivo de desarrollar un proceso sostenible totalmente basado en el uso de materias primas renovables como topinambur, se procedió a la producción de un complejo enzimático a partir de topinambur como única fuente de nutrientes y carbono. El uso de este tubérculo como único medio de cultivo para fermentaciones en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) estuvo basado en el trabajo propuesto por Poorna y Kulkarni (1995), quienes reportaron que la inulina es el mejor sustrato para estimular la producción de inulinasas en cultivos de hongos filamentosos. Esto es debido a la represión catabólica que se genera en los hongos al tener disponibles fuentes de carbono polimerizadas como la inulina. Adicionalmente, debido al alto costo y su marcada selectividad, se evitó el uso de enzimas comerciales. Las enzimas crudas producidas por fermentación en estado sólido usando *A. awamori* fueron identificadas como inulinasas, invertasas, proteasas y fosfatasas debido a su habilidad para hidrolizar las diferentes macromoléculas presentes en el topinambur.

Se llevaron a cabo 5 fermentaciones en estado sólido con el objetivo de encontrar el tiempo óptimo de cultivo que maximice la producción de enzimas crudas a partir de *A. awamori* y topinambur. Se realizaron fermentaciones empleando 24, 36, 48, 60 y 72 horas como tiempo final. Estos resultados son mostrados en la sección siguiente debido a su relación directa con la hidrólisis enzimática. Todas las fermentaciones en estado sólido

fueron realizadas por duplicado o triplicado para analizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

4.2.2. *Hidrólisis enzimática de la harina de topinambur*

Las soluciones ricas en enzimas producidas por las fermentaciones en estado sólido fueron empleadas directamente en diversas hidrólisis de harina de topinambur con el objetivo de producir soluciones ricas tanto en fructosa como en nutrientes. Los rendimientos de fructosa, azúcares reductores, aminoácidos libres y fósforo producidos en la etapa de hidrólisis enzimática en función de los diferentes tiempos de fermentación en estado sólido estudiados son presentados en la Fig. 4.2 y Tabla 4.1. Los rendimientos están expresados como gramos finales de azúcar por gramo de inulina inicial (para el caso de fructosa y azúcares reductores), y miligramos de aminoácidos libres o miligramos de fósforo por gramo de harina de topinambur inicial.

Los rendimientos obtenidos tanto para los azúcares como para los nutrientes presentan un máximo en función de las enzimas producidas luego de 2 días de fermentación en estado sólido. Otro resultado interesante es que el máximo nivel en la biosíntesis de inulinasa coincide con el máximo nivel de producción de proteasas y fosfatasas. Esto significa que el medio de cultivo conteniendo fructosa y nutriente puede ser producida en una sola etapa empleando una única solución de enzimas crudas provenientes de la fermentación en estado sólido de *A. awamori*.

Como fue establecido por Koutinas y col. (2007a; 2007b), para el caso de la hidrólisis enzimática de harina de trigo, haciendo una extensión al caso del topinambur, a nivel industrial es sumamente importante y además favorable que la producción de fructosa y el medio rico en nutrientes se haga simultáneamente en una sola etapa sin la necesidad de

incorporar enzimas comerciales para hidrolizar las macromoléculas presentes en el topinambur. Otra ventaja adicional es que el medio complejo producido a través de la hidrólisis enzimática de topinambur, es una fuente rica no sólo en fructosa, sino también en aminoácidos, péptidos y algunas vitaminas y minerales.

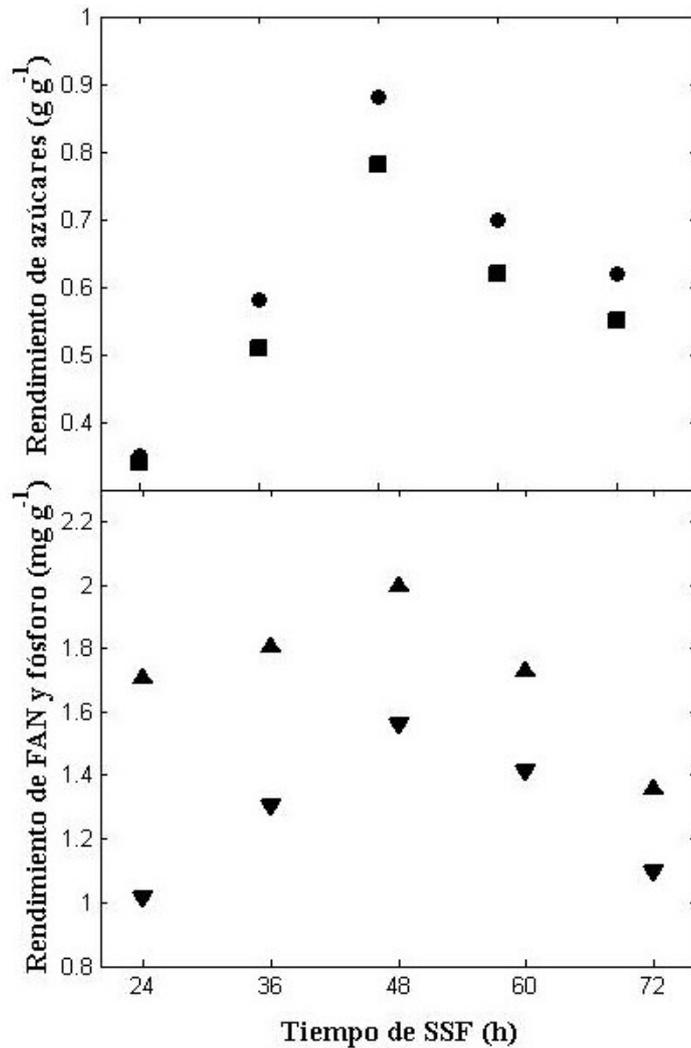


Figura 4.2. Rendimiento de azúcares y nutrientes producidos a partir de la hidrólisis de harina de topinambur empleando las enzimas producidas a diferentes tiempos de fermentación en estado sólido usando *A. awamori*. Símbolos: (●) azúcares reductores, (■) fructosa, (▲) FAN y (▼) fósforo

Tabla 4.1 Rendimiento de la hidrólisis enzimática empleando las enzimas producidas a diferentes tiempos de cultivo de *A. awamori*

Tiempo de SSF (días)	Concentraciones finales						Rendimientos			Inulina hidrolizada (%)
	Azúcares (g/L)			Nutrientes (mg/L)			Fructosa	A. reductores	Y _{R/S} (g/g)	
	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	FAN	Fósforo	Y _{F/S} (g/g)				
1	21,4	2,1	0,6	111,0	66,2	0,34	0,35	0,35	31,4	
1,5	25,7	4,0	0,8	117,3	84,8	0,51	0,58	0,58	45,5	
2	32,6	4,7	1,0	129,8	101,6	0,78	0,88	0,88	70,1	
2,5	27,5	3,8	0,6	100,2	92,0	0,62	0,70	0,70	56,4	
3	26,9	3,6	1,6	100,6	90,9	0,65	0,72	0,72	58,8	

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Otros autores (Albers y col., 1996; Thomas y Ingledew, 1990) han recalcado la importancia de este hecho, ya que los aminoácidos tienen la habilidad de incrementar los rendimientos, haciendo que las productividades aumenten reduciendo los tiempos finales de fermentación. Sin embargo, es necesario optimizar este diseño experimental si se quiere mejorar la hidrólisis de las proteínas presentes en el topinambur. Por otro lado, a un tiempo de 48 h de fermentación en estado sólido, se obtiene la máxima producción de enzimas crudas a partir de *A. awamori* las cuales dan un rendimiento de 0,78 g de fructosa por gramo de inulina, lo cual equivale a un 71 % del máximo rendimiento empírico alcanzable para la producción de fructosa a partir de inulina (Wang y col., 2010).

Las inulinasas son enzimas comúnmente producidas por levaduras diploides como las pertenecientes al género *Kluveromices* sp. y por hongos filamentosos del género *Aspergillus* sp.. Entre las diversas cepas de *Aspergillus*, las de *A. niger* son las más estudiadas para la producción y caracterización de inulinasas. Sin embargo, sólo unos pocos trabajos reportan la producción de inulinasas a partir de *A. awamori* (Arand y col., 2002; Kulminskaya y col., 2003; Nagem y col., 2004). En estos trabajos se ha estudiado la purificación y caracterización bioquímica de las exo-inulinasas producidas por una misma cepa de *A. awamori*. En la literatura abierta no se han encontrado estudios de fermentaciones en estado sólido, producción de enzimas e hidrólisis enzimática para materias agrícolas que contienen inulina, como es el caso del topinambur. Por lo tanto, los resultados presentados en este capítulo constituyen una alternativa nueva y original para la producción de inulinasas e invertasas a partir de *A. awamori* empleando materias primas que contienen inulina.

La Figura 4.3 muestra los perfiles de concentración de azúcares, de conversión de inulina y de concentración de nutrientes para la hidrólisis enzimática donde se obtuvieron

las mayores concentraciones de azúcares y nutrientes (empleando las enzimas producidas luego de 2 días de fermentación en estado sólido).

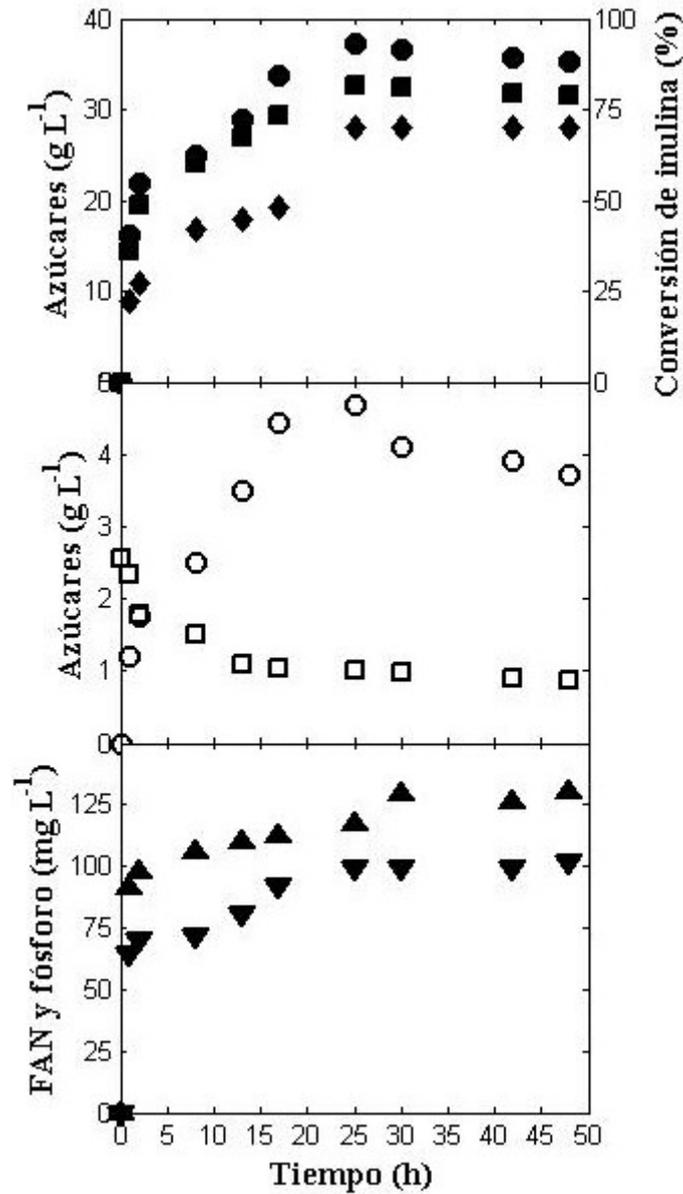


Figura 4.3. Perfiles de concentración obtenidos para la hidrólisis de harina de topinambur empleando las enzimas de *A. awamori* obtenidas luego de 2 días de fermentación en estado sólido. Símbolos: (●) azúcares reductores, (■) fructosa, (◆) inulina, (○) glucosa, (□) sacarosa, (▲) FAN y (▼) fósforo

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Estos resultados confirman que *A. awamori* tiene la capacidad de producir principalmente inulinasas, invertasas, proteasas y fosfatasas. La producción de invertasa durante la fermentación en estado sólido es confirmada por la disminución en la concentración de sacarosa, principalmente durante las primeras 20 h de hidrólisis. Esta sacarosa es convertida a glucosa y fructosa mediante la hidrólisis de los enlaces β -2,6 presentes en este disacárido. Los perfiles de azúcares y de inulina que se presentan en esta figura coinciden con los perfiles reportados por otros autores para la hidrólisis de inulina a partir de inulinasas (Ricca y col., 2009).

Si bien 24 h de hidrólisis es un tiempo suficiente para la conversión de inulina en sus azúcares más simples, este tiempo no es suficiente para la producción de FAN y fósforo a partir de las proteasas y fosfatasas. No obstante, este hecho no es relevante en el proceso global, ya que después de las 24 horas de hidrólisis, las concentraciones de azúcares e inulina se mantienen prácticamente constantes (Figura 4.3).

Algunos autores han estudiado la producción de inulinasas e invertasas crudas a partir de fermentaciones en estado sólido por medio de hongos y levaduras (Öngen-Baysal y Sukan, 1996; Sirisansaneeyakul y col., 2007). Por ejemplo, Öngen-Baysal y Sukan (1996) analizaron la producción de inulinasas e invertasas crudas a partir de *A. niger* y *K. marxianus* y su posterior actividad en la hidrólisis de inulina pura a 50 °C obteniendo un 34,7 % de hidrólisis empleando *A. niger*, un 62,6 % utilizando *K. marxianus* y un 87,2 % para una mezcla de las inulinasas provenientes de ambas especies. Por otro lado, Sirisansaneeyakul y col. (2007) produjeron soluciones enzimáticas a partir de *A. niger* y *C. guilliermondii*. Estas soluciones fueron empleadas en la hidrólisis de inulina a 40 °C obteniendo un 41,3 % y un 35,9 % de hidrólisis a partir de las enzimas crudas de *A. niger* y

C. guilliermondii, respectivamente. Sin embargo, un cultivo con ambas especies produjo enzimas capaces de hidrolizar sólo un 28,4 % de inulina. Comparando estos resultados con los obtenidos en esta tesis (70,1 % de hidrólisis de inulina) puede destacarse la excelente habilidad de *A. awamori* para producir altos niveles de inulinasa e invertasa a partir de la fermentación en estado sólido usando topinambur como única fuente de carbono y nutrientes. Como puede observarse en los resultados obtenidos los niveles de productividad y grado de hidrólisis alcanzados en este trabajo son superiores a los reportados por otros autores empleando *A. niger* A42 (Öngen-Baysal y Sukan, 1996) y *A. niger* TISTR 3570 (Sirisansaneeyakul y col., 2007).

4.3. Fermentaciones bacterianas en Erlenmeyers

En esta sección se presentan los resultados para las bioconversiones microbianas desarrolladas usando el medio de cultivo rico en fructosa y nutrientes producido a partir de topinambur. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo con la bacteria *C. necator* DSMZ 4058 en cultivos discontinuos en un agitador orbital. Las condiciones de operación fueron descritas en el **Anexo A**. En una primera etapa se realizaron tres fermentaciones usando medio nutritivo. Estas fermentaciones fueron desarrolladas con el objetivo de comprobar la capacidad de esta bacteria para metabolizar fructosa, y producir PHB a partir de esta fuente de carbono. Para ello fueron evaluadas tres concentraciones iniciales de fructosa (10, 20 y 30 g/L) con un valor inicial constante de FAN de 500 mg/L.

Los resultados de estas tres fermentaciones se presentan en la Figura 4.4, observándose que la concentración final de biomasa aumenta a medida que se incrementa la concentración inicial de fructosa. Sin embargo, no fue encontrado un comportamiento similar para el PHB acumulado a nivel intracelular. La máxima concentración de PHB,

43 % del peso seco, fue obtenida cuando se usó una concentración inicial de fructosa de 20 g/L. Como se puede observar en la Tabla 4.2, este mismo comportamiento fue encontrado para el caso del rendimiento y la productividad hacia PHB.

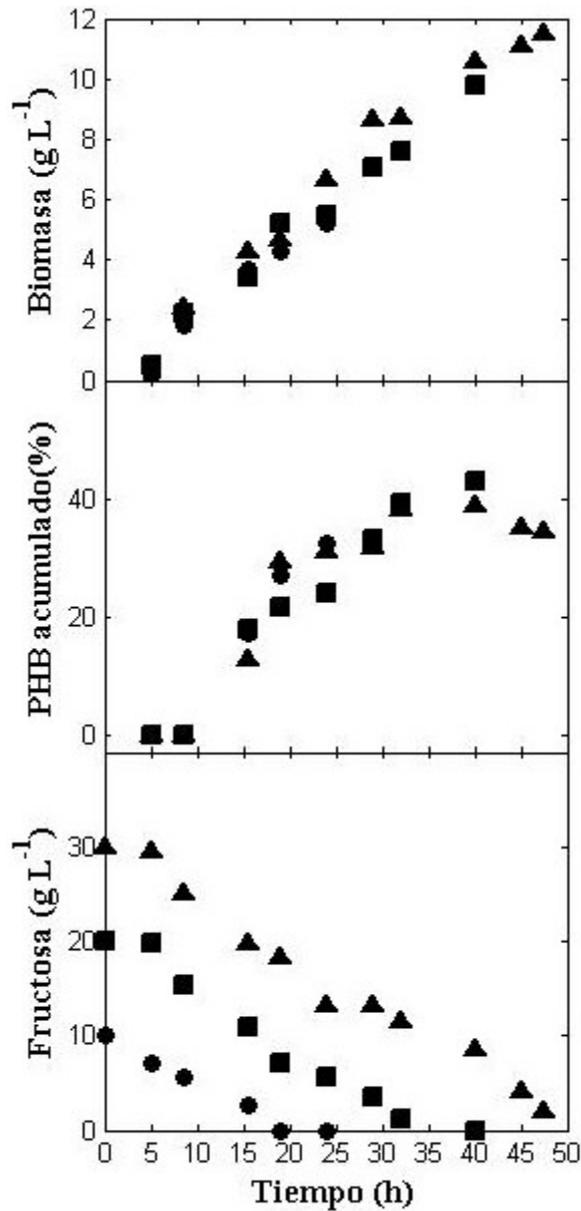


Figura 4.4. Concentraciones de fructosa y biomasa y % de PHB acumulado en la producción de PHB empleando un medio nutritivo y diferentes concentraciones iniciales de fructosa: (●) 10 g/L, (■) 20 g/L y (▲) 30 g/L

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Se obtuvo una productividad de biomasa residual mínima de 0,14 g/L h para la misma concentración inicial de fructosa en la que se obtuvo un valor máximo de productividad hacia PHB de 0,11 g/L h. Por otra parte, el tiempo total de fermentación fue proporcional a la concentración inicial de fructosa en el medio. Es posible concluir que la cepa *C. necator* DSMZ 4058 es capaz de metabolizar fructosa como única fuente de carbono tanto para la producción de biomasa residual como de PHB.

La Tabla 4.2 resume las 13 fermentaciones llevadas a cabo con la cepa *C. necator* DSMZ 4058 utilizando tanto el medio de cultivo nutritivo como el obtenido a partir de topinambur. Los 3 primeros experimentos corresponden a los desarrollados con medio nutritivo mientras que los 10 restantes corresponden al estudio de la capacidad de esta cepa para crecer y producir PHB a partir del medio de cultivo producido a partir de topinambur según se describió en las secciones anteriores. En algunas de las fermentaciones empleando el medio de cultivo obtenido a partir de topinambur se adicionó extracto de levadura para lograr el nivel de aminoácidos requerido al inicio de las mismas. De esta forma, el nivel inicial requerido de FAN fue ajustado en base a los datos reportados por Du y col. (2008).

Los medios de cultivo producidos a partir de harina de topinambur fueron ajustados para obtener dos concentraciones iniciales de fructosa: 14 y 28 g/L. Posteriormente, estos medios fueron acondicionados para obtener medios con cinco niveles iniciales diferentes de FAN. Como puede observarse en la Tabla 4.2 en todas las fermentaciones desarrolladas la concentración final de biomasa fue proporcional a la concentración inicial de FAN e independiente de la concentración inicial de fructosa.

Tabla 4.2 Influencia de la concentración inicial de fructosa y FAN sobre las principales variables en fermentaciones microbianas usando medios de cultivo producidos a partir de topinambur

Fructosa (g/L)	FAN (mg/L)	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Biomasa residual (g/L)	PHB (%)	Rendimiento (g/g)		Productividad (g/L h)	
						Biomasa residual	PHB	Biomasa residual	PHB
10 ^a	500	19	5,2	3,5	32,5	0,35	0,17	0,18	0,09
20 ^a	500	40	9,8	5,6	42,9	0,28	0,21	0,14	0,11
30 ^a	500	47,5	11,5	7,5	34,4	0,25	0,13	0,16	0,08
14	100	32	5,3	3,8	28,3	0,27	0,11	0,12	0,05
14	190	28,5	9,5	6,4	32,0	0,46	0,22	0,23	0,11
14	490	50	8,4	4,5	46,0	0,32	0,28	0,09	0,08
14	560	50	8,2	5,1	38,1	0,36	0,22	0,10	0,06
14	900	49	8,5	7,0	18,0	0,50	0,11	0,14	0,03
28	130	56	5,4	4,0	26,1	0,14	0,05	0,07	0,03
28	340	51,5	7,5	5,3	29,5	0,27	0,11	0,10	0,05
28	430	56	7,8	3,7	52,5	0,28	0,31	0,06	0,07
28	540	54	8,5	6,6	22,6	0,31	0,09	0,13	0,04
28	800	49	9,2	7,8	14,9	0,38	0,07	0,16	0,03

^a Medio nutritivo

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Las fermentaciones realizadas empleando el medio de cultivo obtenido empleando topinambur arrojaron resultados similares a los obtenidos con el medio nutritivo. La concentración final de biomasa fue proporcional a la concentración inicial de fructosa mientras que para ambas concentraciones iniciales de fructosa, los rendimientos de PHB obtenido fueron menores para aquellas fermentaciones en las que se usaron concentraciones mínimas y máximas de aminoácidos libres (FAN).

La Figura 4.5 muestra el efecto de las dos variables principales manipuladas (concentración inicial de fructosa y FAN) sobre la acumulación de PHB. El máximo rendimiento de PHB correspondió a aquellas fermentaciones en las cuales se utilizó una concentración inicial intermedia de FAN: 0,28 gramos de PHB por gramo inicial de fructosa para el caso de concentraciones iniciales de fructosa y FAN de 14 g/L y 490 mg/L, y 0,31 gramos de PHB por gramo inicial de fructosa para el caso de 28 g/L de fructosa y 430 mg/L de FAN. Por otra parte, los mayores niveles de acumulación de PHB coincidieron con los máximos rendimientos hacia el biopolímero. Concentraciones iniciales bajas de FAN dieron bajos rendimientos de PHB y biomasa residual. Por otro lado, a altas concentraciones iniciales de FAN se obtuvieron altos valores de biomasa residual con bajos rendimientos de PHB. En este punto es importante mencionar que la biomasa residual corresponde al material celular diferente del PHB, es decir es igual a la concentración de biomasa menos la concentración de PHB. En base a estos resultados, se puede concluir que el nivel de nutrientes es determinante tanto para la acumulación de PHB como para la producción de biomasa residual en fermentaciones empleando *C. necator*. Por otra parte se puede observar también que bajas concentraciones de FAN no son suficientes para mantener una buena producción de biomasa residual y de PHB.

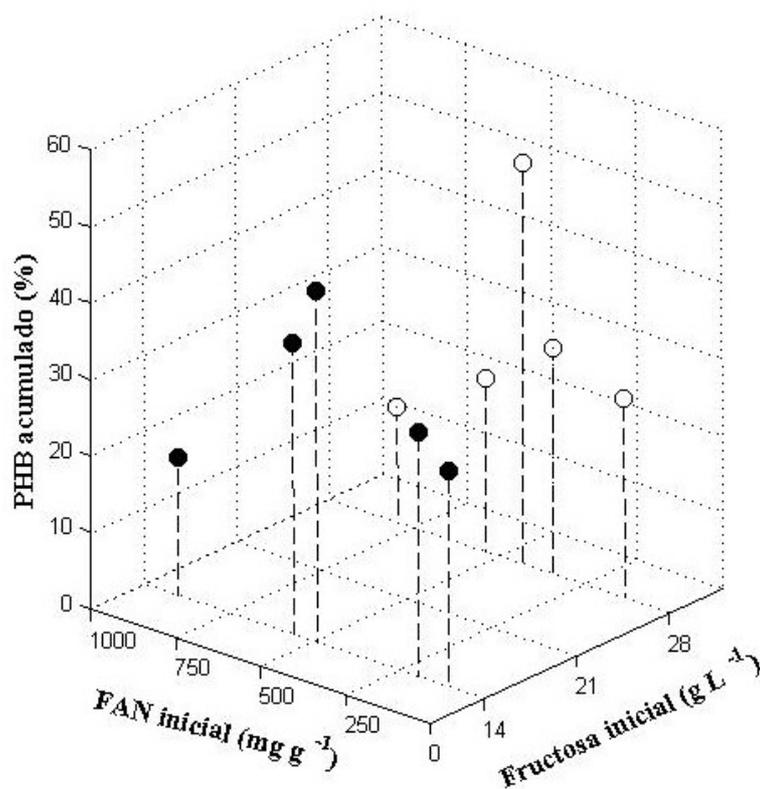


Figura 4.5 Efecto de la concentración inicial de fructosa y FAN sobre los niveles de acumulación de PHB en *C. necator* DSMZ 4058 empleando medios de cultivo producidos a partir de topinambur. Símbolos: (●) 14 g/L fructosa y (○) 28 g/L

Debido a la gran cantidad de nutrientes disponibles a altas concentraciones de FAN, los mismos son destinados al ciclo de Krebs (generación de energía y formación de aminoácidos en aquellos microorganismos que usan oxígeno para respirar). Como consecuencia se producen altas concentraciones de biomasa residual y bajas acumulaciones de PHB. De esta forma, las concentraciones intermedias de FAN son las que maximizan la productividad hacia el PHB. Este tipo de comportamiento puede ser perfectamente mejorado empleando fermentación semicontinuas. De esta forma la biomasa residual

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

puede mantenerse constante, mientras que el aumento de la biomasa total será una consecuencia del incremento de la concentración de PHB intracelular.

La Figura 4.6 presenta los perfiles de concentración de biomasa total, PHB y fructosa en las tres fermentaciones donde se obtuvo la mayor acumulación de PHB. Los perfiles de las fermentaciones donde se obtuvo la mayor acumulación de biopolímero corresponden al del medio nutritivo con 20 g/L de fructosa y 500 mg/L de FAN, hidrolizado de topinambur con 14 g/L de fructosa y 490 mg/L de FAN, e hidrolizado de topinambur con 28 g/L de fructosa y 430 mg/L de FAN. El porcentaje de PHB acumulado en las células y el rendimiento hacia PHB para estas tres fermentaciones bacterianas fueron 43 % y 0,21 g/g, 46 % y 0,28 g/g y 52,5 % y 0,31 g/g, respectivamente. Como puede observarse a partir de la Figura 4.6, los perfiles de biomasa total y PHB tienen la tendencia esperada para todas las fermentaciones. Sin embargo, el tiempo total de cultivo para el experimento con medio nutritivo fue menor que los tiempos correspondientes a las fermentaciones llevadas a cabo con medios obtenidos de hidrolizados de topinambur. A diferencia de las otras dos fermentaciones, en la realizada con 28 g/L de fructosa y 430 mg/L de FAN inicial, el consumo de fructosa no fue total; observándose después de 56 h de fermentación, concentraciones de fructosa y biomasa total prácticamente constantes. Claramente, existe un efecto inhibitorio de algunos de los componentes presentes en el medio hidrolizado que detuvo el crecimiento de *C. necator* y la producción de PHB. Durante el análisis de azúcares mediante HPLC se observaron algunos ácidos orgánicos como acético, propiónico y butírico. Estos ácidos fueron formados por *A. awamori* durante la fermentación en estado sólido.

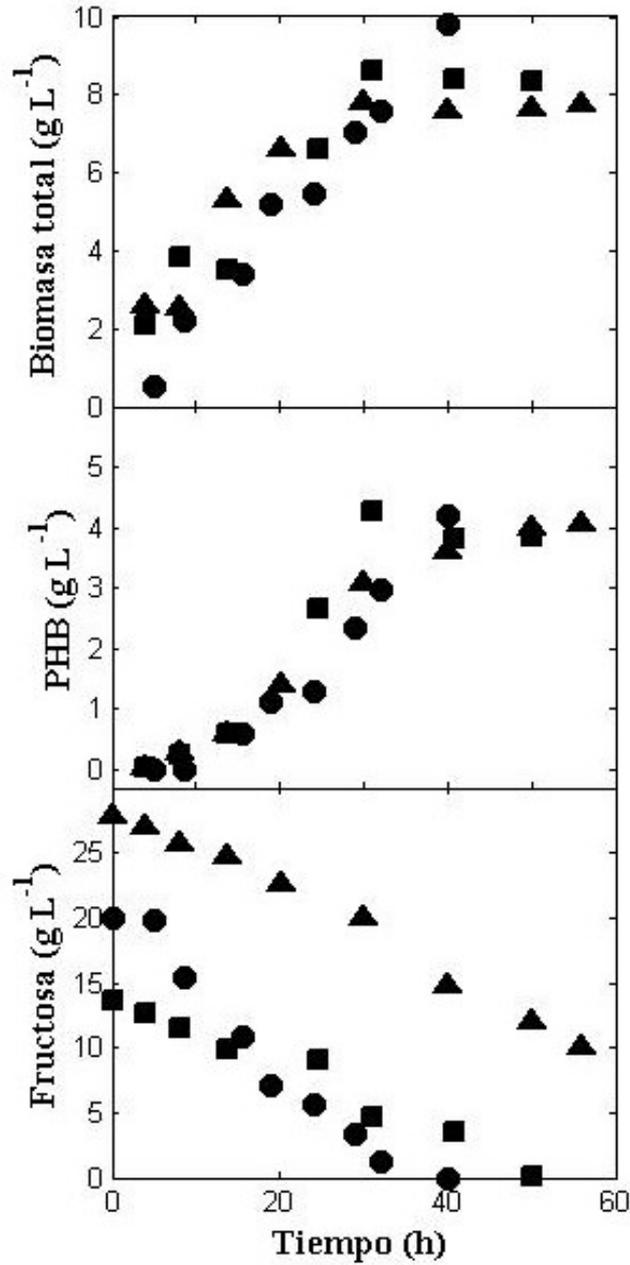


Figura 4.6 Fermentaciones para la producción de PHB con *C. necator* usando hidrolizados de topinambur y medio nutritivo. Símbolos: (●) medio nutritivo con 20 g/L de fructosa y 500 mg/L de FAN inicial, (■) hidrolizado de topinambur con 14 g/L de fructosa y 490 mg/L de FAN y (▲) hidrolizado de topinambur con 28 g/L de fructosa y 430 mg/L de FAN

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

Para las dos fermentaciones con concentración inicial de fructosa igual o menor a 20 g/L, estos ácidos orgánicos no afectaron ni el crecimiento celular ni la producción de PHB. Sin embargo en las fermentaciones llevadas a cabo con una concentración inicial de fructosa de 28 g/L se observaron incrementos en la concentración de ácidos orgánicos cuando la concentración de fructosa en el medio disminuyó por debajo de 10 g/L. Este aumento en la concentración de ácidos puede ser el responsable de la detención en el crecimiento microbiano.

Wang y Yu (2000) estudiaron la inhibición de *C. necator* empleando diferentes concentraciones de ácido acético en el medio. El crecimiento microbiano fue completamente inhibido a altas concentraciones de ácido acético en el medio, mientras que a bajas concentraciones, la bacteria puede consumirlo de manera gradual, reduciendo así su efecto tóxico adicionándolo como fuente de carbono en su ciclo metabólico.

Respecto al efecto inhibitorio por parte de otros ácidos orgánicos sobre *C. necator*, se puede mencionar que el uso de altas concentraciones de fructosa en medios nutritivamente ricos ayudarían a incrementar este efecto debido a la formación de algunos ácidos orgánicos durante la fermentación bacteriana. Este comportamiento no sólo depende de la concentración de fructosa, sino también de la concentración de otros nutrientes en el medio. Este problema podría evitarse mediante el uso de una estrategia de fermentación semicontinua, en la cual es posible alimentar en el tiempo la fuente de carbono y otros nutrientes en forma independiente al medio. Shang y col. (2003) reportaron que al mantener la concentración de glucosa en el medio en aproximadamente 9 g/L en cultivos semicontinuos de *C. necator*, se maximizan tanto la producción de biomasa como la de PHB. Por lo tanto, valores de concentración de fructosa relativamente bajos serían una

mejor opción con el objetivo de optimizar el crecimiento celular, así como la productividad y el rendimiento hacia PHB.

4.4. Conclusiones

En este capítulo se presentó una nueva estrategia de biorrefinería destinada a la producción de PHB microbiano a partir de harina de topinambur como única fuente de carbono y nutrientes. En una primera etapa, se desarrolló un estudio sobre la fermentación en estado sólido empleando harina de topinambur para producir un complejo enzimático capaz de hidrolizar las macromoléculas presentes en este recurso renovable. Los resultados obtenidos en esta etapa correspondieron a altos niveles de hidrólisis de inulina y valores moderados para la hidrólisis de proteínas. Se obtuvieron diferentes medios de cultivo los cuales fueron empleados en la producción de PHB a partir de *C. necator*. Los resultados globales demostraron que el topinambur es una materia prima con la cual se pueden desarrollar biorrefinerías sostenibles destinadas a la producción de bioplásticos biodegradables.

Es importante mencionar que, los trabajos futuros relacionados con biorrefinerías deben combinar este concepto con técnicas de optimización de procesos, los cuales son necesarios para desarrollar nuevos procesos económica y ambientalmente sostenibles. Finalmente, puede destacarse que debido al alto contenido en fuente de carbono y nutrientes, el medio de cultivo producido en este trabajo podría ser aplicado a la producción de otros compuestos de interés sintetizados por una gran variedad de microorganismos.

4.5. Referencias

- Albers, E., Larsson, C., Liden, G., Niklasson, C., Gustafsson, L., 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3187-3195.
- Arand, M., Golubev, A.M., Neto, J.R.B., Polikarpov, I., Wattiez, R., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Shabalin, K.A., Shishliannikov, S.M., Chepurnaya, O.V., Neustroev, K.N., 2002. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori* *Biochemistry Journal*, 362, 131-135.
- Bajpai, P.K., Bajpai, P., 1991. Cultivation and utilization of Jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein, and high-fructose syrup production. *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 359-362.
- Barthomeuf, C., Regerat, F., Pourrat, H., 1991. High-yield ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7, 490-493.
- Braunegg, G., Bona, R., Koller, M., 2004. Sustainable polymer production. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 43, 1779-1793.
- Chen, L., Xin, C., Deng, P., Ren, J., Liang, H., Bai, F., 2010. Butanol production from hydrolysate of Jerusalem artichoke juice by *Clostridium acetobutylicum* L7. *Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology*, 26, 991-996.
- Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., Wu, Q., 2009. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 777-781.

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

- Du, C., Lin, S.K.C., Koutinas, A., Wang, R., Dorado, P., Webb, C., 2008. A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid. *Bioresource Technology*, 99, 8310-8315.
- Fages, J., Mulard, D., Rouquet, J.J., Wilhelm, J.L., 1986. 2,3-Butanediol production from Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus*, by *Bacillus polymyxa* ATCC 12 321. Optimization of k_{La} profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25, 197-202.
- Fleming, S.E., GrootWassink, J.W.D., Murray, E.D., 1979. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12, 1-28.
- Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Ni, X., Wang, L., 2007. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 825-832.
- Ge, X.Y., Qian, H., Zhang, W.G., 2009. Improvement of l-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Lactobacillus* sp. *Bioresource Technology*, 100, 1872-1874.
- Ge, X.Y., Qian, H., Zhang, W.G., 2010. Enhancement of L-lactic acid production in *Lactobacillus casei* from jerusalem artichoke tubers by kinetic optimization and citrate metabolism. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 101-109.
- Ge, X.Y., Zhang, W.G., 2005. A shortcut to the production of high ethanol concentration from jerusalem artichoke tubers. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 241-246.
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145.

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

- Koutinas, A.A., Arifeen, N., Wang, R., Webb, C., 2007a. Cereal-based biorefinery development: integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 61-72.
- Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R., Webb, C., 2007b. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1035-1044.
- Kulminskaya, A.A., Arand, M., Eneyskaya, E.V., Ivanen, D.R., Shabalin, K.A., Shishliannikov, S.M., Saveliev, A.N., Korneeva, O.S., Neustroev, K.N., 2003. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1650, 22-29.
- Lee, S.Y., Choi, J.I., 1998. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 387-393.
- Li, D., Dai, J.Y., Xiu, Z.L., 2010. A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresource Technology*, 101, 8342-8347.
- López, J.A., López, I., Komaitis, M., Papanikolaou, S., Villar, M.A., Koutinas, A.A., 2011. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from Jerusalem artichoke tubers by implementing a biorefinery strategy. *Submitted*.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U., 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 15, 777-793.
- Nagem, R.A.P., Rojas, A.L., Golubev, A.M., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Neustroev, K.N., Polikarpov, I., 2004. Crystal structure of exo-

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

- inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *Journal of Molecular Biology*, 344, 471-480.
- Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S., Ohta, K., 1996. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 564-566.
- Öngen-Baysal, G., Sukan, S.S., 1996. Production of inulinase by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 18, 1431-1434.
- Pan, L., Sinden, M.R., Kennedy, A.H., Chai, H., Watson, L.E., Graham, T.L., Kinghorn, A.D., 2009. Bioactive constituents of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke). *Phytochemistry Letters*, 2, 15-18.
- Poorna, V., Kulkarni, P.R., 1995. Determination of the best inulinase production conditions. *Bioresource Technology*, 54, 315-320.
- Ramachandran, S., Singh, S.K., Larroche, C., Soccol, C.R., Pandey, A., 2007. Oil cakes and their biotechnological applications - A review. *Bioresource Technology*, 98, 2000-2009.
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., Iorio, G., 2009. Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: A kinetic study and reaction mechanism. *Process Biochemistry*, 44, 466-470.
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., Iorio, G., 2007. The state of art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 129-145.

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

- Shang, L., Jiang, M., Chang, H.N., 2003. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, 25, 1415-1419.
- Sirisansaneeyakul, S., Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P., Chisti, Y., 2007. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 543-552.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 2006. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 783-789.
- Sun, L.H., Wang, X.D., Dai, J.Y., Xiu, Z.L., 2009. Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 847-852.
- Szambelan, K., Nowak, J., Czarnecki, Z., 2004. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *Biotechnology Letters*, 26, 845-848.
- Thomas, K.C., Ingledew, W.M., 1990. Fuel alcohol production: Effects of free amino acid nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2046-2050.
- Thomsen, M.H., 2005. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 598-606.
- Wang, H., Zhang, Z., Liang, L., Wen, S., Liu, C., Xu, X., 2010. A comparative study of high-performance liquid chromatography and colorimetric method for inulin determination. *European Food Research and Technology*, 230, 701-706.

Capítulo 4: Producción de PHB a partir de topinambur - Biorrefinería

- Wang, J., Yu, J., 2000. Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions. *Process Biochemistry*, 36, 201-207.
- Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Wang, Q., Hua, Y., Zhao, Z.K., 2010. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 581-585.

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos de la producción industrial de biodiesel

5.1. Introducción

Las economías mundiales actuales son altamente dependientes del petróleo. Este provee muchas de nuestras necesidades energéticas y es además la base de las materias primas de múltiples industrias (Witcoff y Reuben, 1996). Sin embargo, las reservas de petróleo son finitas y están disminuyendo a una velocidad exponencial debido a las demandas energéticas mundiales (Embree y col., 2001; Hatfield, 1997; Leeper y Andrews, 1991; Song, 2006). Por otra parte existe una mayor conciencia relacionada con la conservación del medio ambiente y el impacto ambiental asociado a las industrias petroquímicas. En los últimos años se ha prestado especial atención a las emisiones antropogénicas de CO₂, el calentamiento global y la acumulación de plásticos no degradables en ambientes naturales (Bozell, 2001; Kamm y Kamm, 2004; Reddy y col., 2003). Los países desarrollados y un gran número de países en desarrollo han reconocido que, para sostener nuestra demanda de energía, materias primas y alimentos, es necesaria una reducción sustancial de nuestra dependencia del petróleo, estableciendo una economía basada en la biotecnología (Hardy, 2002; Van Dam y col., 2005). Con el objetivo de alcanzar esta meta se deben establecer estrategias de desarrollo a largo plazo, las cuales pueden explotar el potencial de las fuentes renovables locales tales como los cultivos de plantas ricas en aceite como la canola, el girasol y la soja (Ramachandran y col., 2007), y

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

una gran diversidad de materiales renovables que contienen una importante cantidad de carbohidratos y proteínas como el trigo, la soja, materiales lignocelulósicos y el topinambur, entre otros (Kamm y Kamm, 2004).

Las industrias basadas en productos biotecnológicos son las más indicadas para competir con los productos derivados de la industria del petróleo si todas sus materias primas son óptimamente explotadas a través del concepto de biorrefinería (Annetts y Audsley, 2003; Audsley y Annetts, 2003; Halasz y col., 2005; Kamm y Kamm, 2004). En comparación a las refinerías petroquímicas, las biorrefinerías del futuro estarán fácilmente integradas y podrán convertir materia prima proveniente de fuentes renovables en potencia, calor, productos químicos y otros materiales de alto valor agregado maximizando el valor de la biomasa y minimizando los residuos (Clark y col., 2006). El concepto de biorrefinería ya se ha probado satisfactoriamente en los Estados Unidos donde, por ejemplo, grandes plantas de molienda húmeda de maíz están produciendo ácido láctico y cítrico, aminoácidos, y bioetanol a partir de azúcares derivados del grano de maíz (Kim y Dale, 2005; Min, 2006; Singh y col., 2005; Tembo y col., 2003; Wyman y Goodman, 1993). En Europa por su parte, algunos jóvenes proyectos ya demostraron que biorrefinerías basadas en trigo pueden producir diversos compuestos de alto valor agregado como ácidos orgánicos y polímeros (Dorado y col., 2009; Du y col., 2008; Koutinas y col., 2007a; Koutinas y col., 2007b; Wang y col., 2009; Xu y col., 2010).

Debido al significativo crecimiento en la producción de biodiesel a nivel mundial (Demirbas, 2009; Nogueira, 2011), hay por ende un crecimiento paralelo de los residuos generados en su manufactura. Podemos mencionar como ejemplo el caso de los residuos generados en la producción de biodiesel a partir del aceite de canola. Asumiendo que la

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

producción anual de canola (47 millones de toneladas), como fue reportado en 2006 y 2007 (FAO, 2007) se destinara a la industria de biodiesel y considerando que las semillas de canola contienen entre un 37 y un 42 % de aceite, el volumen anual de residuos sólidos de canola generados sería de alrededor de 25 millones de toneladas (Wang y col., 2010). Por otro lado, la transesterificación de estos aceites vegetales genera biodiesel como producto principal y glicerol (subproducto), en una proporción de 10:1, respectivamente. Es decir, por cada 10 toneladas de biodiesel, se produce una tonelada de glicerol, y más de 15 toneladas de residuos sólidos de canola. En 2007 fueron empleados 4 millones de toneladas de aceite de canola para la producción de biodiesel (Egües y col., 2010) lo cual implica una gran cantidad de residuos generados por la producción de este biocombustible. Sin embargo, estos subproductos pueden ser usados para la síntesis de otros productos de alto valor agregado por medio de nuevas estrategias de biorrefinerías (Ramachandran y col., 2007).

La competitividad de estas biorrefinerías, basadas en materiales oleaginosos como sustitutos de los procesos petroquímicos actuales, depende en gran medida del nivel de explotación de todos los componentes y constituyentes biológicos como: glicerol, proteínas, carbohidratos, y constituyentes menores. La correcta explotación de cada uno de estos nutrientes puede tender a la síntesis de varios productos como biocombustibles, plásticos biodegradables, ingredientes funcionales y productos farmacéuticos. Además, la maximización en el uso de estos componentes implicará mejoras significativas en la economía del proceso y en la minimización de residuos.

Es sabido que el glicerol es una fuente de carbono directamente asimilable por cierta variedad de microorganismos (Bormann y Roth, 1999; Cavalheiro y col., 2009; Posada y

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería col., 2011). Sin embargo, la gran cantidad de nutrientes, proteínas y minerales presentes en las semillas de canola, son materia no asimilable de manera directa por la gran mayoría de bacterias y levaduras comerciales. En ese caso, se deben proponer esquemas de bioprocesos en los cuales se transformen las macromoléculas en materiales directamente asimilables por bacterias y levaduras, que a fin de cuentas, son los microorganismos encargados de la biosíntesis de los principales productos en los esquemas de biorrefinerías.

En base a lo mencionado anteriormente, este capítulo está enfocado hacia la producción de poli(hidroxicanoato)s a partir de esquemas de biorrefinería que incluyen la transformación enzimática de los macronutrientes presentes en los residuos de canola. En forma similar a lo descrito en el capítulo anterior para el topinambur, en este capítulo se llevó a cabo el estudio experimental de las siguientes etapas:

- 1) Fermentaciones en estado sólido usando el hongo *Aspergillus oryzae*, con el objetivo de producir enzimas hidrolíticas.
- 2) Hidrólisis enzimática de la harina de residuos de canola, con las enzimas producidas en la etapa anterior, con el objetivo de producir un medio de cultivo genérico para el crecimiento de *C. necator*.
- 3) Desarrollo de diversas fermentaciones sumergidas enfocadas a la producción de PHB empleando los medios de cultivo obtenidos a partir de harina de residuos de canola y glicerol crudo como única fuente de carbono.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue estudiar de manera experimental la viabilidad de usar hidrolizados de residuos de canola en conjunto con glicerol crudo para la producción de biopolímeros microbianos (PHAs). En ese sentido, la mayor componente experimental de este capítulo no estuvo dedicada al estudio de las fermentaciones en

estado sólido e hidrólisis enzimática de los residuos de canola, sino al estudio de las diferentes condiciones de cultivo que permitan la producción de PHB.

5.2. Producción de PHAs a partir de residuos de canola y glicerol crudo

5.2.1. Producción del medio de cultivo

La producción de un medio de cultivo genérico a partir de los residuos sólidos de canola se basó en la hidrólisis de los principales nutrientes presentes en forma de macronutrientes mediante la acción de enzimas producidas a partir del hongo filamentoso *Aspergillus oryzae* (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Composición parcial del residuo de canola (Wang y col., 2010)

Composición	Contenido
Humedad (%)	10,6
Nitrógeno total (NT) (mg/g bs ^a)	62,2
Proteínas (%; 6,25NT, bs)	38,9
Aceite (%; bs)	2,5
Cenizas (%; bs)	7,5
FAN (mg/g; bs)	0,65
Fosforo total (mg/g; bs)	19,2
Fosforo inorgánico (mg/g; bs)	0,81

^a bs: base seca

A diferencia de lo descrito en el capítulo anterior, en este capítulo no se estudió la fermentación en estado sólido ni la hidrólisis enzimática, debido a que un estudio de este tipo, fue desarrollado recientemente en la Universidad de Manchester en Inglaterra (Wang y col., 2010). Este estudio previo sirvió de base para la producción de medios de cultivo en condiciones experimentales óptimas. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue el

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería
análisis de la utilización de este medio de cultivo para la producción de PHB usando subproductos generados por la producción de biodiesel a partir de canola.

En base a lo anterior, todas las fermentaciones en estado sólido se desarrollaron usando los residuos de canola como única fuente de carbono y nutrientes para el crecimiento de *Aspergillus oryzae*, y su subsecuente producción de enzimas capaces de hidrolizar los principales componentes de éste residuo. Todas las fermentaciones sólidas usando *A. oryzae* se llevaron a cabo a 30 °C durante 24 h como fue descrito en el **Anexo A**.

Luego de las fermentaciones en estado sólido, las esporas producidas por *A. oryzae* fueron extraídas usando agua estéril y un proceso de agitación mecánica. El extracto rico en proteasas y fosfatasas, fue usado posteriormente para la hidrólisis enzimática de 40 g/L de residuos sólidos de canola. Todas las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo mediante la misma metodología a 55 °C durante 48 h en un agitador orbital. La Figura 5.1 muestra una curva típica de la evolución de la concentración de nitrógeno orgánico (FAN) en función del tiempo de hidrólisis. La concentración de FAN alcanzada (aproximadamente 680 mg/L) es mucho mayor que la obtenida en el capítulo anterior para el caso del topinambur. Este resultado manifiesta la mayor concentración proteica de la harina de residuos de canola en comparación con el topinambur.

La concentración de fósforo sólo fue medida al final de cada hidrólisis obteniéndose un valor promedio de 216 mg/L para todas las experiencias realizadas. Se puede concluir que el contenido proteico de la harina de residuos de canola es mayor que el correspondiente a la harina de topinambur, ya que las concentraciones de nitrógeno y fósforo orgánico son mucho mayores a las obtenidas a partir del tubérculo.

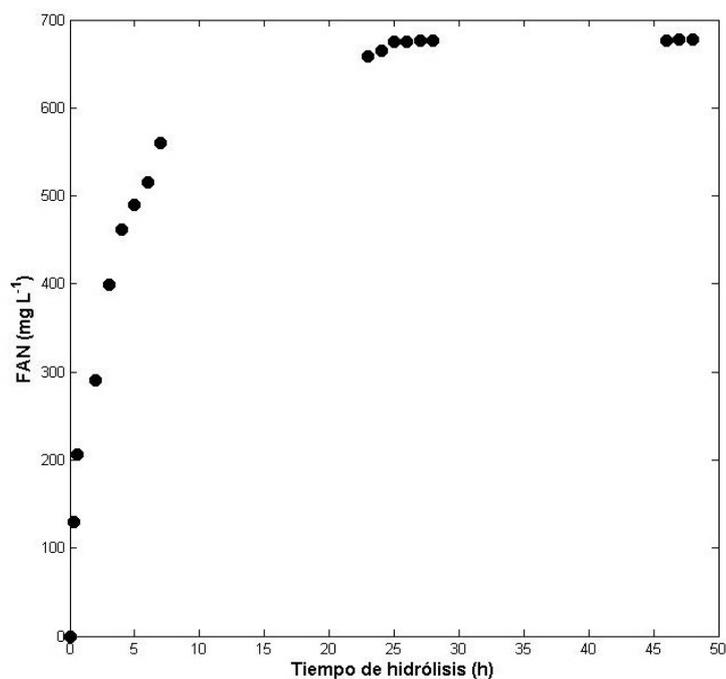


Figura 5.1. Perfil de concentración de nitrógeno orgánico (FAN) obtenido en la hidrólisis de residuos sólidos de canola a partir de las enzimas de *A. oryzae* producidas por fermentación en estado sólido

5.2.2. Análisis de la producción de PHB a nivel de agitador orbital usando medio nutritivo y glicerol puro

Para la producción de PHB a partir de glicerol fue empleada la cepa *Cupriavidus necator* DSMZ 545. Esta cepa fue adaptada a metabolizar glicerol utilizando fermentaciones sumergidas en las cuales se aumentó gradualmente la concentración de glicerol en el medio desde 2 g/L hasta 40 g/L. Es decir, una vez que la cepa creció en un medio nutritivo con 2 g/L de glicerol, ésta fue transferida a un medio con una concentración poco mayor de glicerol. Este procedimiento se desarrollo sucesivas veces hasta llegar a la concentración máxima de 40 g/L.

Tabla 5.2 Efecto de la concentración inicial de glicerol puro sobre el crecimiento de *C. necator* y sobre la acumulación de PHB en medio nutritivo a concentración constante de nutrientes (500 mg FAN/L)

Glicerol (g/L)	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Biomasa residual (g/L)	PHB (%)	Rendimiento (g/g)		Productividad (g/L h)	
					Biomasa residual	PHB	Biomasa residual	PHB
7	26	5,4	3,6	34,1	0,51	0,26	0,14	0,07
10	28	7,7	4,9	35,9	0,49	0,28	0,18	0,10
14	30	9,4	4,9	47,6	0,35	0,32	0,16	0,15
20	44	10,3	4,6	55,2	0,23	0,28	0,11	0,13
26	73	12,8	3,7	71,3	0,14	0,35	0,05	0,13

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

Luego de este proceso de adaptación, se estudió la capacidad de esta cepa para producir PHB a partir de glicerol puro. Para ello se desarrollaron 5 fermentaciones a nivel de agitador orbital con una concentración inicial de nitrógeno (FAN) constante de 500 mg/L y diferentes concentraciones iniciales de glicerol: 7, 10, 14, 20 y 26 g/L. Los resultados de este conjunto de fermentaciones son presentados en la Tabla 5.2 y Figura 5.2. Como puede observarse, *C. necator* DSMZ 545 puede almacenar altas concentraciones de PHB cuando la concentración inicial de glicerol es alta. En ese sentido, los resultados muestran que la acumulación de PHB es proporcional a la concentración inicial de fuente de carbono empleada.

Tanto los rendimientos como las productividades obtenidas para el PHB muestran que el glicerol es una excelente alternativa para la producción de PHB a partir de la cepa empleada. La máxima acumulación de PHB, 71,3 %, indica que el glicerol es perfectamente asimilable para la producción de biopolímero. A nivel general, los rendimientos obtenidos son altamente satisfactorios, ya que ellos representan en promedio, alrededor de un 60% del máximo rendimiento teórico alcanzable (Yamane, 1993).

Los resultados presentados en la Figura 5.2 muestran la capacidad de *C. necator* DSMZ 545 para producir PHB durante la fase de crecimiento celular. Este hecho es sumamente importante, ya que bajo las condiciones de trabajo desarrolladas la cepa no necesita condiciones de estrés importantes para producir el biopolímero. Los resultados obtenidos en esta etapa son altamente satisfactorios, ya que la cepa mostró excelentes habilidades para la producción de PHB a partir de una fuente de carbono poco común en su metabolismo. Debido a que los resultados obtenidos fueron satisfactorios, la siguiente etapa del trabajo experimental se llevó a cabo empleando como medio de cultivo el obtenido a partir de la hidrólisis de los residuos sólidos de canola y glicerol crudo, obtenido como

subproducto de la industria de biodiesel, con el objetivo de estudiar la producción de PHB usando la cepa *C. necator* DSMZ 545.

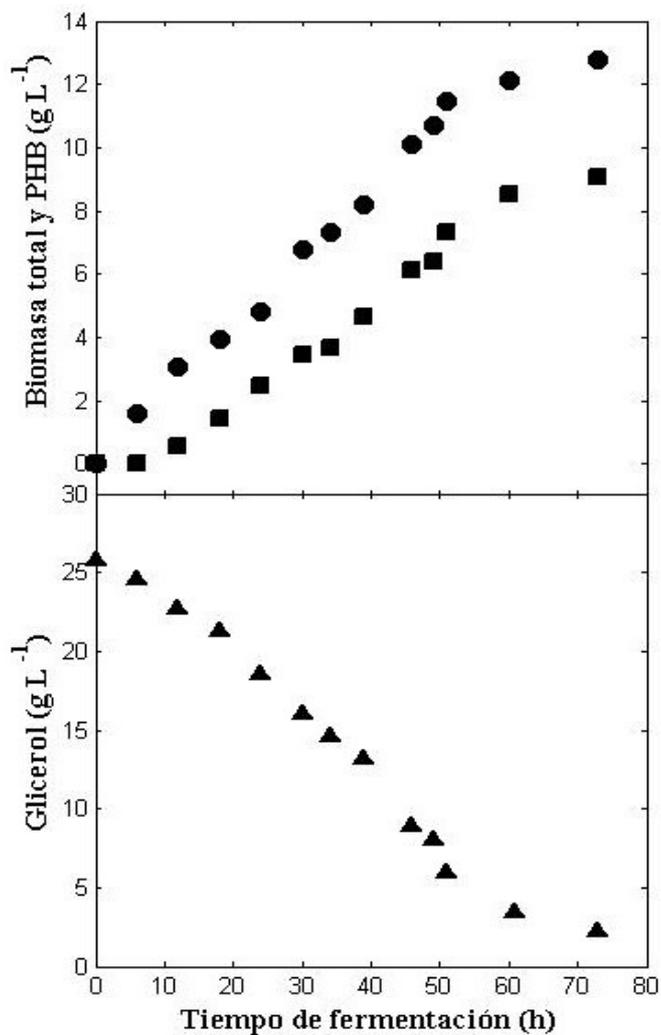


Figura 5.2. Concentraciones de biomasa, PHB acumulado, y glicerol en la producción de PHB a partir de glicerol puro empleando un medio con una concentración inicial de glicerol de 26 g/L y una concentración inicial de FAN de 500 mg/L.

Símbolos: (●) biomasa total, (■) PHB y (▲) glicerol

5.2.3. Efecto de las impurezas presentes en el glicerol crudo sobre la producción de PHB

En esta etapa se analizó el efecto del principal contaminante presente en el glicerol crudo sobre el crecimiento microbiano y la producción de PHB a partir de *C. necator*. El glicerol crudo es aquella corriente rica en glicerol proveniente, en nuestro caso, de la producción de biodiesel a partir del proceso de esterificación del aceite de canola. La composición de dicha corriente se muestra en la Tabla 5.3. Los principales constituyentes del glicerol crudo son las sales de potasio, las cuales son un residuo de su aplicación como catalizadores durante la producción de biodiesel. La presencia de metanol es debida principalmente a su utilización en el proceso de transesterificación y la formación de metil ésteres, y la presencia de ácidos grasos libres proviene de su liberación durante el prensado de las semillas de canola con el objetivo de extraer su aceite (Chatzifragkou y col., 2010).

Tabla 5.3. Composición del glicerol crudo usado en el presente estudio

Componente	% (p/p)
Glicerol	81
Agua	10 – 12
Sales de potasio	5 – 6
Ácidos grasos libres	0.1
Metanol	1

Debido a que las sales de potasio fueron las que se encontraron en mayor proporción en el glicerol crudo usado, los estudios subsiguientes fueron desarrollados con K_2SO_4 , el catalizador usado durante el proceso de producción de biodiesel a partir de aceite de canola. En ese sentido, se estudió el efecto de la concentración de esta sal sobre el crecimiento microbiano de *C. necator* y su respectiva producción de PHB intracelular. El

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

principal objetivo fue determinar, si esta sal es capaz de afectar la producción de PHB, y por consiguiente concluir si el glicerol crudo es apto o no para su implementación en la producción de PHB. Con este objetivo se realizaron fermentaciones con 5 concentraciones iniciales diferentes de K_2SO_4 (2, 6, 10, 15 y 20 g/L) empleando el medio de cultivo genérico producido a partir de los residuos de canola y glicerol crudo como fuente de carbono. Para poder comparar los resultados se empleó en todos los casos concentraciones iniciales constantes de glicerol crudo (14 g/L) y de FAN (570 mg/L). Este medio de cultivo corresponde a un medio producido completamente a partir de los residuos de la producción de biodiesel, y fue preparado por la dilución de cantidades medidas de glicerol crudo en los hidrolizados de residuos sólidos de canola previamente obtenidos. Los resultados correspondientes a este conjunto de experimentos se presentan en la Figura 5.3.

En la Figura 5.3 sólo se muestran los resultados más representativos (2, 10 y 20 g/L de K_2SO_4) ya que la inclusión de las fermentaciones conteniendo 6 y 15 g/L de sal generaba una gráfica menos entendible. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de K_2SO_4 en el medio de cultivo genera una leve inhibición sobre el crecimiento celular y la producción de PHB. Por ejemplo, las concentraciones de biomasa y PHB alcanzadas en presencia de 2 g/L de K_2SO_4 fueron 11,9 y 4,1 g/L, respectivamente, mientras que los mismos valores de concentración en presencia de 20 g/L de sal fueron 10,2 y 3,1 g/L, respectivamente. Estos valores indican una reducción del 14 % en la concentración de biomasa total y un 24 % en la concentración de PHB cuando se usó una concentración de sal de 20 g/L. Si bien a mayores concentraciones de sal se obtienen mayores índices de inhibición, en términos prácticos los niveles de glicerol en una fermentación destinada a la producción de PHB pueden variar entre 10 y 60 g/L (Cavalheiro y col., 2009). Esto significa que los máximos niveles de K_2SO_4 que se

alcanzarían durante fermentaciones de este tipo empleando glicerol crudo, serían del orden de 5 g/L (dado que la concentración de glicerol es al menos 13 veces mayor a la concentración de K_2SO_4 en una solución de glicerol crudo, Tabla 5.3).

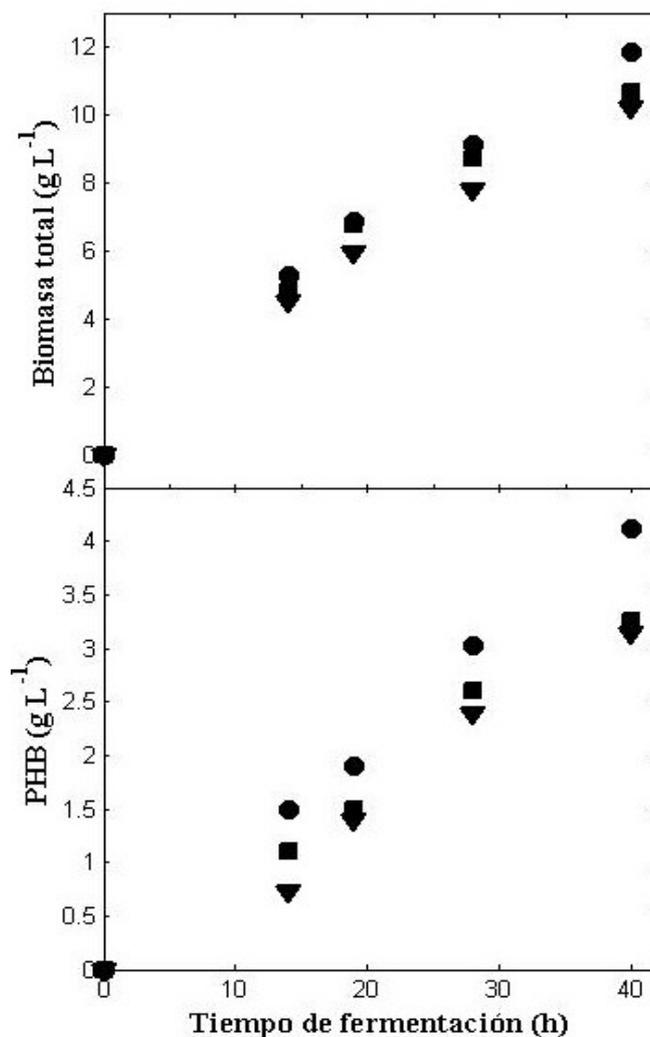


Figura 5.3. Efecto de la concentración de K_2SO_4 sobre el crecimiento celular y la producción de PHB a partir de *C. necator* DSMZ 545 empleando como medio de cultivo hidrolizados de residuos de canola y glicerol crudo.

Símbolos: (●) 2 g/L, (■) 10 g/L y (▼) 20 g/L de K_2SO_4

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

En base a este análisis se puede concluir que la influencia de la concentración de K_2SO_4 sobre el crecimiento de *C. necator* y su producción de PHB es pequeña por lo que los niveles de sal presentes en el glicerol crudo no representan una amenaza con miras a futuras implementaciones industriales de este proceso. Por lo tanto, estos resultados demuestran que es totalmente viable la producción de PHB a partir de un esquema de biorrefinería que involucra los principales subproductos del proceso de producción industrial de biodiesel.

Si bien algunos trabajos publicados recomiendan la purificación del glicerol crudo por medio de un proceso de evaporación (Posada y col., 2011; Wang y col., 2010), los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la cepa *C. necator* DSMZ 545 puede tolerar concentraciones de hasta 5 g/L de K_2SO_4 (principal contaminante de las corrientes de glicerol crudo). Por lo tanto, puede destacarse como una ventaja para la síntesis de PHB empleando como medio de cultivo y fuente de carbono subproductos de la producción de biodiesel.

5.3. Conclusiones

En el empleo de canola como materia prima para la producción industrial de biodiesel se generan anualmente cantidades importantes de dos subproductos: glicerol y residuos sólidos de canola. En este capítulo se ha demostrado, a nivel experimental, que estos residuos pueden ser convertidos satisfactoriamente a productos de alto valor agregado como son los poli(hidroxialcanoato)s. Por otra parte, el procesamiento de los residuos de canola puede llevar a la generación de un medio de cultivo altamente rico en nutrientes, vitaminas y minerales (sin la presencia de ninguna fuente de carbono), el cual puede ser genérico para la producción de diferentes metabolitos en procesos

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería biotecnológicos. En este trabajo se llevó a cabo la producción de PHB mediante el uso del medio de cultivo obtenido de residuos de canola empleando glicerol crudo como fuente de carbono. Los niveles de biopolímero obtenidos fueron altamente satisfactorios mostrando la viabilidad para implementar esta metodología a nivel industrial.

En el último capítulo de esta tesis se presenta y analiza un posible esquema de biorrefinería para la producción de PHAs a partir de los residuos generados en la producción industrial de biodiesel.

5.4. Referencias

- Annetts, J.E., Audsley, E., 2003. Modelling the value of a rural biorefinery - Part II: Analysis and implications. *Agricultural Systems*, 76, 61-76.
- Audsley, E., Annetts, J.E., 2003. Modelling the value of a rural biorefinery - Part I: The model description. *Agricultural Systems*, 76, 39-59.
- Bormann, E.J., Roth, M., 1999. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *Biotechnology Letters*, 21, 1059-1063.
- Bozell, J.J., 2001. Chemicals and materials from renewable resources, Oxford University Press, U.K.
- Cavalheiro, J.M.B.T., de Almeida, M.C.M.D., Grandfils, C., da Fonseca, M.M.R., 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44, 509-515.
- Chatzifragkou, A., Dietz, D., Komaitis, M., Zeng, A.P., Papanikolaou, S., 2010. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

- production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnology and Bioengineering*, 107, 76-84.
- Clark, J.H., Budarin, V., Deswarte, F.E.I., Hardy, J.J.E., Kerton, F.M., Hunt, A.J., Luque, R., Macquarrie, D.J., Milkowski, K., Rodriguez, A., Samuel, O., Tavener, S.J., White, R.J., Wilson, A.J., 2006. Green chemistry and the biorefinery: A partnership for a sustainable future. *Green Chemistry*, 8, 853-860.
- Demirbas, A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50, 14-34.
- Dorado, M.P., Lin, S.K.C., Koutinas, A., Du, C., Wang, R., Webb, C., 2009. Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid. *Journal of Biotechnology*, 143, 51-59.
- Du, C., Lin, S.K.C., Koutinas, A., Wang, R., Dorado, P., Webb, C., 2008. A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid. *Bioresource Technology*, 99, 8310-8315.
- Egües, I., Gonzales-Alriols, M., Herseczki, Z., Marton, G., Labidi, J., 2010. Hemicelluloses obtaining from rapeseed cake residue generated in the biodiesel production process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16, 293-298.
- Embree, H.D., Chen, T., Payne, G.F., 2001. Oxygenated aromatic compounds from renewable resources: motivation, opportunities, and adsorptive separations. *Chemical Engineering Journal*, 84, 133-147.
- FAO, 2007. FAO food outlook global market analysis (June).
- Halasz, L., Povoden, G., Narodoslowsky, M., 2005. Sustainable processes synthesis for renewable resources. *Resources, Conservation and Recycling*, 44, 293-307.
- Hardy, R.W.F., 2002. Trends in new crops and new uses, ASHS Press, Alexandria.

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

- Hatfield, C.B., 1997. Oil back on the global agenda. *Nature*, 387, 121-121.
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145.
- Kim, S., Dale, B.E., 2005. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: Nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass and Bioenergy*, 28, 475-489.
- Koutinas, A.A., Arifeen, N., Wang, R., Webb, C., 2007a. Cereal-based biorefinery development: integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 61-72.
- Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R., Webb, C., 2007b. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1035-1044.
- Leeper, S.A., Andrews, G.F., 1991. A critical review and evaluation of bioproduction of organic chemicals. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29, 499-511.
- Min, E., 2006. Developing biorefinery by utilizing agriculture and forestry biomass resources: Striding forward the "carbohydrate" era. *Progress in Chemistry*, 18, 131-141.
- Nogueira, L.A.H., 2011. Does biodiesel make sense? *Energy*, In Press.
- Posada, J.A., Naranjo, J.M., López, J.A., Higuera, J.C., Cardona, C.A., 2011. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, 46, 310-317.
- Ramachandran, S., Singh, S.K., Larroche, C., Soccol, C.R., Pandey, A., 2007. Oil cakes and their biotechnological applications - A review. *Bioresource Technology*, 98, 2000-2009.

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, 137-146.
- Singh, V., Wang, P., Johnston, D.B., Rausch, K.D., Tumbleson, M.E., 2005. Converting corn into ethanol and valuable coproducts using the enzymatic dry grind process AICHE Annual Meeting, Conference Proceedings, pp. 12037.
- Song, C., 2006. Global challenges and strategies for control, conversion and utilization of CO₂ for sustainable development involving energy, catalysis, adsorption and chemical processing. *Catalysis Today*, 115, 2-32.
- Tembo, G., Epplin, F.M., Huhnke, R.L., 2003. Integrative Investment Appraisal of a Lignocellulosic Biomass-to-Ethanol Industry. *Journal of Agricultural and Resource Economics*, 28, 611-633.
- Van Dam, J.E.G., De Klerk-Engels, B., Struik, P.C., Rabbinge, R., 2005. Securing renewable resource supplies for changing market demands in a bio-based economy. *Industrial Crops and Products*, 21, 129-144.
- Wang, R., Godoy, L.C., Shaarani, S.M., Melikoglu, M., Koutinas, A.A., Webb, C., 2009. Improving wheat flour hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 223-228.
- Wang, R., Shaarani, S.M., Godoy, L.C., Melikoglu, M., Vergara, C.S., Koutinas, A.A., Webb, C., 2010. Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 77-83.
- Witcoff, H.A., Reuben, B.G., 1996. Industrial Organic Chemicals, Willey, New York.
- Wyman, C.E., Goodman, B.J., 1993. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39-40, 41-59.

Capítulo 5: Producción de PHAs a partir de subproductos del biodiesel. Biorrefinería

Xu, Y., Wang, R.H., Koutinas, A.A., Webb, C., 2010. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45, 153-163.

Yamane, T., 1993. Yield of poly-D(-)-3 hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 165-170.

Capítulo 6:

Caracterización de los PHAs obtenidos

6.1. Introducción

A finales de la década de 1950, había suficientes evidencias que manifestaban la capacidad que tenían las bacterias del género *Bacillus* para acumular PHB como fuente de carbono y energía (Doudoroff y Stanier, 1959; Macrae y Wilkinson, 1958; Williamson y Wilkinson, 1958). Durante estos mismos años Forsyth y col. (1958) demostraron que los microorganismos Gram negativos también tenían la capacidad de almacenar este biopolímero como reserva de energía. Sin embargo, en esa época se creía que el 3-hidroxi butirato (3HB) era el único miembro hidroxialcanoato (HA) que formaba parte de la cadena principal de este biopolímero natural. Años después, Wallen y Rohwedder (1974) reportaron la identificación de otro miembro de los hidroxialcanoatos diferente al 3HB. Estos autores identificaron 3-hidroxi valerato (3HV) y 3-hidroxi hexanoato (3HHx) como constituyentes menores en copolímeros de 3HB obtenidos de extractos de cloroformo provenientes de lodos activados.

La identificación de otras unidades de HAs diferentes al 3HB en bacterias ha tenido un mayor impacto sobre sus investigaciones y su interés comercial. Mientras que el PHB es un material con ciertas propiedades físicas que limitan sus aplicaciones, la incorporación de un segundo monómero puede mejorar considerablemente sus propiedades y por ende sus aplicaciones (Sudesh y col., 2000). Por ejemplo, un copolímero de 3HB y algún otro 3HA de cadena más larga con un alto contenido de 3HB, P(94 mol% 3HB-co-3HA), tiene

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

propiedades mecánicas muy similares al polietileno de baja densidad (Matsusaki y col., 2000). Esta flexibilidad en propiedades físicas, mecánicas y químicas de los PHAs se incrementa notablemente si se tiene en cuenta las posibles combinaciones entre monómeros de cadena corta (SCL: 3-5 átomos de carbono) y de cadena media (MCL: 6-14 átomos de carbono) (Tabla 2.1, **Capítulo 2**). Los PHAs de cadena corta tienen propiedades muy similares a los plásticos convencionales, mientras que los PHAs de cadena media se asemejan más a los elastómeros y gomas. Por otra parte, con el objetivo de mejorar las propiedades de estos bioplásticos se han experimentado modificaciones funcionales en sus unidades monoméricas como la introducción de cadenas insaturadas y de grupos halógenos (Suriyamongkol y col., 2007).

Las últimas revisiones bibliográficas sobre la diversidad de PHAs que han sido descubiertos hasta la fecha (Anderson y Dawes, 1990; Chanprateep, 2010; Steinbüchel y Lutke-Eversloh, 2003; Steinbüchel y Valentin, 1995), reportan más de 100 unidades monoméricas diferentes de HAs. Los polímeros más comunes son, además del poli(3-HB), el poli(3HB-*co*-3HV), poli(3HB-*co*-4HV), poli(3HB-*co*-3HHx), poli(3HB-*co*-4HB), entre otros. Lo más destacable en esta área es que existe un amplio rango de propiedades que ya han sido demostradas con los nuevos PHAs que se han descubierto (Dai y col., 2008). Por lo tanto, la gran ventaja de estos materiales biodegradables es el amplio espectro de aplicaciones en diversos campos de la vida diaria. A la fecha, estos copolíesteres son producidos, principalmente, en cultivos puros los cuales involucran alguna manipulación genética en las rutas metabólicas de los microorganismos usados, y en los que es necesario el uso de medios de cultivo estériles de alto costos (Dai y col., 2008).

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

A pesar de esta tendencia, los resultados obtenidos en la caracterización de los PHAs producidos por la cepa *C. necator* DSMz 545 demuestran que es posible producir copolímeros de interés a partir de un esquema de biorrefinería basado en el empleo de residuos de la industria del biodiesel como harina de semillas de canola y glicerol (**Capítulo 5**). Estos resultados hacen que tanto el esquema de biorrefinería propuesto como los PHAs obtenidos sean totalmente novedosos y de gran interés para una posible aplicación industrial.

En el presente capítulo se aplicaron técnicas de caracterización de polímeros para la obtención de la composición química, así como de las propiedades térmicas de los poli(hidroxicanoato)s producidos experimentalmente a partir de *Bacillus megaterium* BBST4 (usando glucosa como fuente de carbono), *Cupriavidus necator* DSMZ 545 (usando los residuos de la producción industrial del biodiesel) y *Alcaligenes latus* DSMZ 1123 (a partir de sacarosa). Con este objetivo se emplearon las siguientes técnicas: Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno y carbono, (^1H - y ^{13}C -NMR); espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR); calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Estas técnicas sirvieron de base para la identificación de los grupos funcionales presentes en cada biopolímero particular y de sus propiedades térmicas como temperatura de fusión, grado de cristalinidad y temperatura de degradación.

6.2. Estructura química a partir de FTIR y ^1H - y ^{13}C -NMR

6.2.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Mediante la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier se estudiaron las vibraciones de los enlaces presentes en las moléculas de los PHAs obtenidos

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

a partir *B. megaterium* BBST4, *A. latus* y *C. necator*. Los enlaces químicos de cada biopolímero fueron identificados en base a sus bandas características. Espectros FTIR representativos de las muestras de biopolímeros obtenidos se presentan en la Figura 6.1.

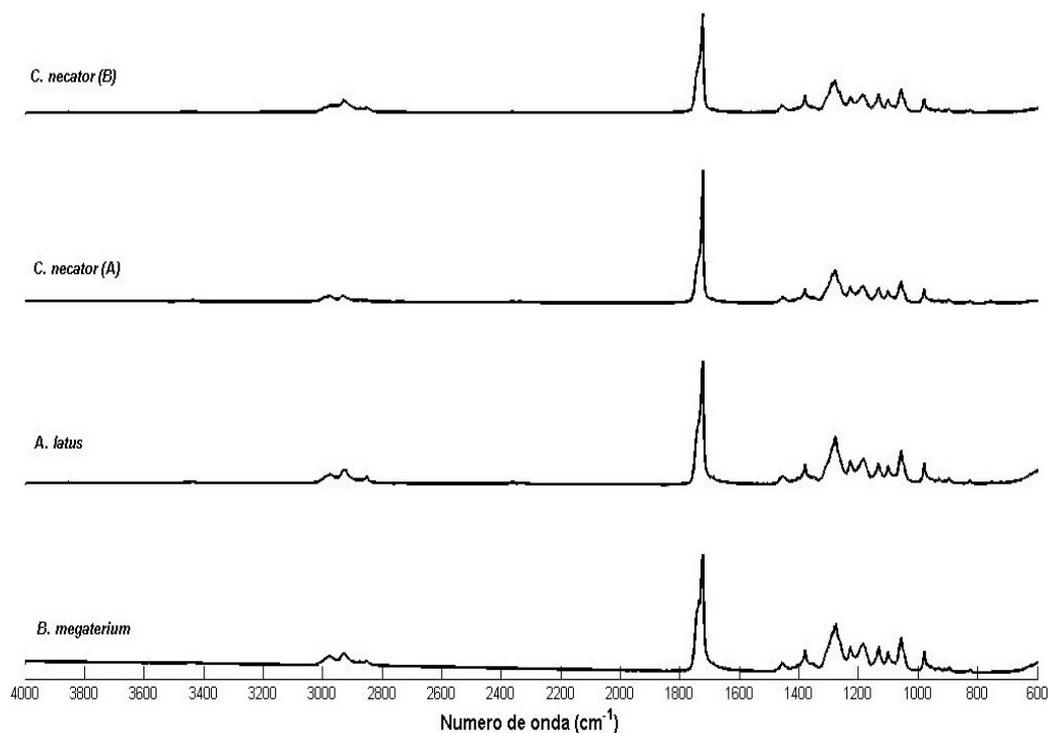


Figura 6.1. Espectros FTIR de muestras de PHAs obtenidos a partir de diferentes microorganismos y medios de cultivo

Las muestras obtenidas empleando *B. megaterium* y *A. latus* corresponden a los biopolímeros descritos en el **Capítulo 3**, mientras que las muestras obtenidas empleando *C. necator* (A y B) corresponden a dos muestras de biopolímeros extraídas luego de las fermentaciones descritas en el **Capítulo 5**. Es importante aclarar que no se tomaron muestras del biopolímero producido a partir del esquema de biorrefinería basado en topinambur como materia prima, dado que los volúmenes empleados durante las fermentaciones no fueron suficientes para desarrollar una extracción adecuada.

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

Los espectros FTIR para todas las muestras fueron casi idénticos. Además, estos coincidieron prácticamente con los obtenidos por otros autores para el caso del PHB producido a partir de *C. necator* (Oliveira y col., 2007) y *Bacillus cereus* (Valappil y col., 2007). Las bandas encontradas a 1724 y 1278 cm^{-1} corresponden al grupo carbonilo de la unión éster y al grupo $-\text{CH}$, respectivamente. Hong y col. (1999) demostraron que estas dos bandas son completamente características de los PHAs. La banda observada a 1452 cm^{-1} corresponde a la deformación asimétrica del enlace C–H en los grupos CH_2 , mientras que la banda a 1380 cm^{-1} es asignada al movimiento simétrico de los grupos CH_3 . La banda a 1230 cm^{-1} es la correspondiente a conformaciones de cadenas helicoidales, mientras que las bandas a 1186 y 1133 cm^{-1} son características de la vibración asimétrica y simétrica del grupo C–O–C, respectivamente. Las bandas restantes localizadas entre 1000 y 1300 cm^{-1} corresponden a la vibración del enlace C–O del grupo éster presente en los PHAs. Las bandas a 3444 cm^{-1} son originadas por los grupos OH terminales o por la absorción de agua por parte de la muestra (Bayari y Severcan, 2005). No es posible la identificación de diferentes monómeros usando la técnica de espectroscopia infrarroja debido a la similitud de los grupos químicos que los componen (Bayari y Severcan, 2005). Por lo tanto, esta técnica de caracterización fue empleada para confirmar la producción de PHAs a partir de estos microorganismos, pero no para una identificación de la composición química de los copolímeros.

6.2.2. Resonancia magnética nuclear

En la Figura 6.2 se presentan los espectros de ^{13}C -NMR de los biopolímeros obtenidos a partir de *B. megaterium* BBST4 y *A. latus*. Los picos observados coinciden con

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

los diferentes tipos de átomos de carbono presentes en la estructura del PHB: grupo carbonilo (C=O), metino (CH), metileno (CH₂), y metilo (CH₃).

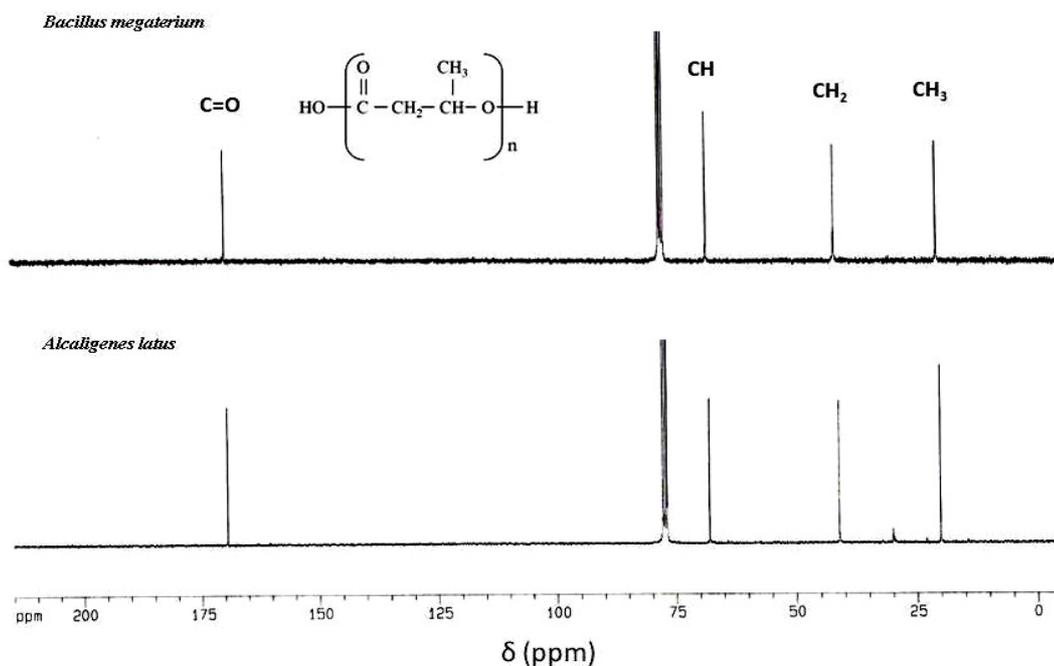


Figura 6.2. Espectros de ¹³C-NMR a 125 MHz del PHB producido a partir de

B. megaterium y *A. latus*

Los desplazamientos químicos obtenidos para ambas muestras de PHAs coinciden con los reportados por Doi y col. (1986) para el PHB: 169,2 ppm para el carbonilo; 67,6 ppm para el metino; 40,8 ppm para el metileno; y 19,8 ppm para el metilo. En base a estos resultados se puede concluir que el PHA producido a partir de *B. megaterium* y *A. latus* empleando medios sintéticos es 100% coincidente con el PHB. Se descarta la incorporación de cualquier otra unidad monomérica de hidroxialcanoato por parte de estos microorganismos con la fuente de carbono y los medios empleados.

Los espectros de ¹³C-NMR para las dos muestras de PHA producido a partir del esquema de biorrefinería planteado a partir de los residuos de la producción de biodiesel

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

son presentados en las Figuras 6.3 y 6.4. Es importante aclarar que las dos muestras corresponden a dos fermentaciones llevadas a cabo bajo condiciones iniciales diferentes. La muestra A corresponde a un biopolímero producido a partir de concentraciones iniciales de glicerol, nitrógeno (FAN) y fósforo de 20 g/L, 680 mg/L y 180 mg/L, respectivamente (Figura 6.3). Mientras que la muestra B corresponde a biopolímero producido empleando 20 g/L de glicerol, 500 mg/L de FAN y 180 mg/L de fosforo (Figura 6.4). Según los resultados que se muestran a continuación, las muestras de biopolímero producido son diferentes. Estos resultados son analizados a lo largo de este capítulo.

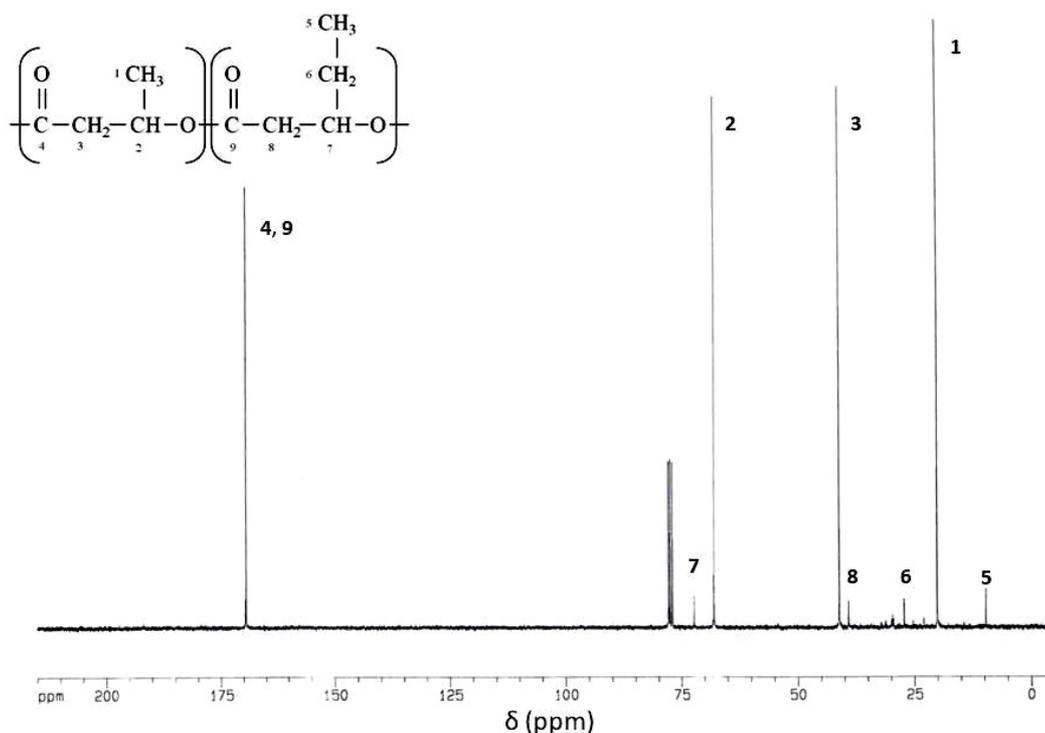


Figura 6.3. Espectro de ¹³C-NMR a 125 MHz del P(3HB-co-3HV) producido a partir de *C. necator* empleando los residuos de la producción de biodiesel (Muestra A)

Las señales de los carbonos presentes en la muestra A (Figura 6.3) indican que además de 3-hidroxibutirato el biopolímero contiene también 3-hidroxisvalerato. Los

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

valores de desplazamiento químico del carbono en esta muestra coinciden con los valores reportados para este copolímero por Kamiya y col. (1989).

El espectro de ^{13}C -NMR correspondiente a la muestra B se presenta en la Figura 6.4. Aquí, además de 3HB, 3HV y 3-hidroxiocetanoato (3HO), es posible observar la presencia de otras estructuras monoméricas más complejas. Debido a lo novedoso de los resultados obtenidos para los PHAs producidos empleando residuos de la producción de biodiesel (Capítulo 5) se realiza, a continuación, un análisis más detallado de los mismos.

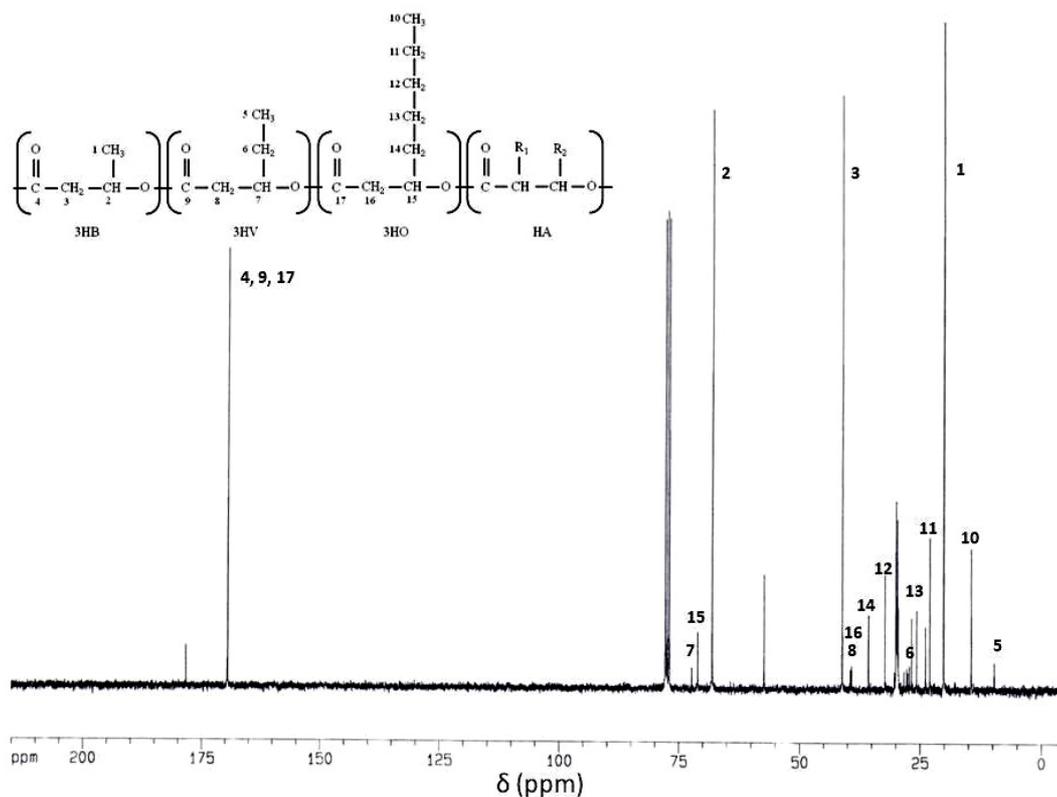


Figura 6.4. Espectro de ^{13}C -NMR a 125 MHz del PHA producido a partir de *C. necator* empleando residuos de la producción de biodiesel (Muestra B)

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

En primer lugar es posible concluir que existe una diferencia en los biopolímeros producidos, utilizando como medio de cultivo el hidrolizado de residuos de canola y glicerol crudo como fuente de carbono (muestras A y B), debido a las diferentes condiciones iniciales empleadas en cada fermentación, y a la complejidad química y biológica del sistema de biorrefinería planteado. La formación de PHAs diferentes al PHB es debida principalmente a dos factores:

- 1) La presencia de una gran cantidad de aminoácidos en el medio de cultivo producido a partir de la hidrólisis enzimática de los residuos sólidos de la canola mediante la acción de las enzimas producidas por *A. oryzae*. Estos aminoácidos son normalmente consumidos por *C. necator* durante el proceso fermentativo, y dependiendo de sus PHA sintetasas y de la estructura del aminoácido, la bacteria será capaz de producir diferentes hidroxialcanoatos como unidades monoméricas.
- 2) La presencia de pequeñas fracciones de lípidos y metanol en la corriente de glicerol crudo. Dado que esta corriente fue usada como fuente de carbono en este esquema de biorrefinería, además del glicerol, *C. necator* también podría haber incorporado lípidos y metanol como fuente de carbono, lo cual podría haber estimulado la formación de estas nuevas estructuras de PHAs.

En base a estas dos hipótesis se estableció el origen de la formación de estos PHAs en *C. necator*. Actualmente se están llevando a cabo nuevas caracterizaciones con el objeto de conocer la composición del medio de cultivo producido (identificar los aminoácidos y lípidos presentes) y de la corriente de glicerol crudo empleada. Además, se llevarán a cabo nuevas determinaciones como NMR en dos dimensiones y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para identificar exactamente los monómeros presentes

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

en el PHA correspondiente a la muestra B. No se encontraron publicaciones en la literatura abierta que puedan aportar información para la identificación exacta de los PHAs producidos. Sin embargo, algunos trabajos cuyo objetivo era diferente al perseguido en este capítulo, pueden aportar información que soporta los resultados obtenidos. En un trabajo reciente, Aider y Barbara (2011) hicieron una recopilación de diferentes estudios en la que reportan los aminoácidos que son producidos a partir de la canola. Entre los aminoácidos más representativos y que se producen en una mayor proporción, se destacan principalmente: ácido glutámico (C₅), tirosina (C₉), metionina (C₅), cisteína (C₃), ácido erúxico (C₂₂), valina (C₅), leucina (C₆), fenilalanina (C₉), arinina (C₆), e isoleucina (C₆). Una mezcla de estos aminoácidos, como la producida a partir de la hidrólisis enzimática de la harina de canola, estimularía la formación de copolímeros de hidroxialcanoatos complejos por medio del proceso de consumo de aminoácidos complejos conocido como oxidación β (Höfer y col., 2011). Este proceso metabólico fue identificado en otras especies bacterianas productoras de PHAs de cadena media y cadena larga como las pertenecientes al género *Pseudomonas* (Anderson y Dawes, 1990). Sin embargo, Dennis y col. (1998) demostraron que este tipo de metabolismo también está presente en *C. necator*. Por lo tanto, se puede establecer una vinculación entre los PHAs producidos y los aminoácidos metabolizados durante el proceso fermentativo. En ese sentido, los aminoácidos con menos de 6 carbonos en su estructura principal fueron los responsables de la formación de 3HV, mientras que los aminoácidos que contienen 6 o más carbonos en su estructura principal como: tirosina (C₉), ácido erúxico (C₂₂), leucina (C₆), fenilalanina (C₉), arinina (C₆), e isoleucina (C₆), serían los principales responsables de la formación de PHAs de cadena media como el 3HO presente en la muestra B.

6.3. Propiedades térmicas

6.3.1. Calorimetría diferencial de barrido

El comportamiento térmico de las muestras fue estudiado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la Figura 6.5 se presentan los termogramas correspondientes al segundo calentamiento para el PHB obtenido a partir de *A. latus* y *B. megaterium*. Por otra parte, los datos más relevantes correspondientes al segundo calentamiento, como temperatura y entalpía de fusión, son presentados para todas las muestras en la Tabla 6.1.

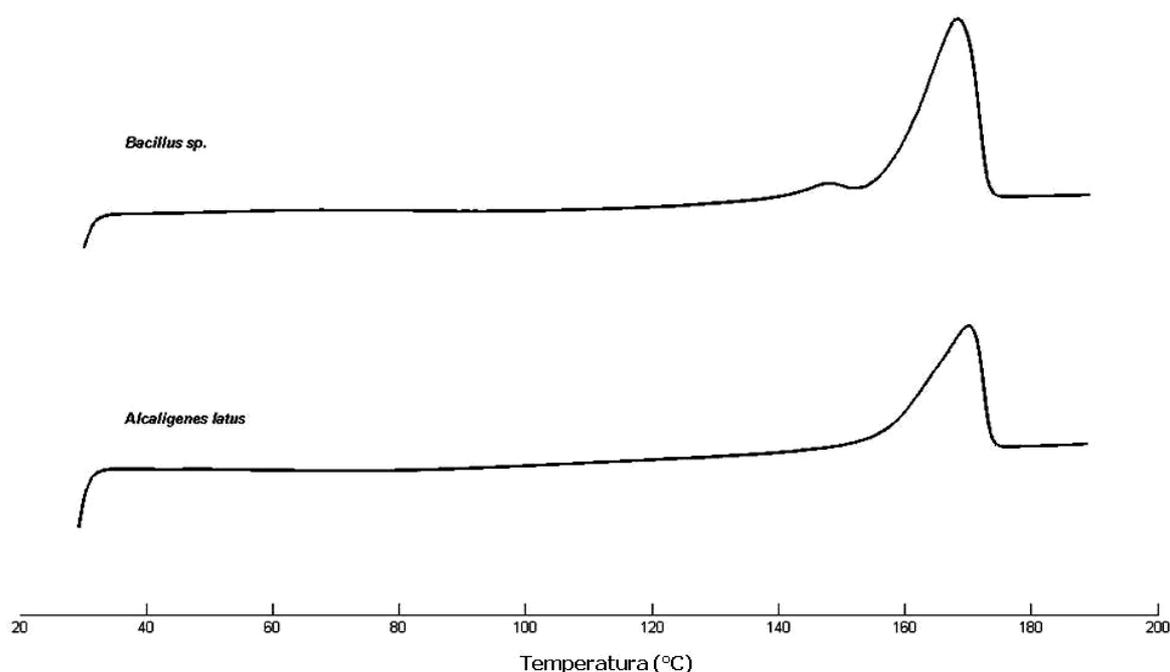


Figura 6.5. Termogramas correspondientes al PHB producido a partir de *B. megaterium* y *A. latus*

Las propiedades térmicas del PHB obtenido a partir de *B. megaterium* y *A. latus* coinciden con los valores reportados por Doi (1990) para este homopolímero. La menor temperatura y entalpía de fusión mostrada por el PHB obtenido a partir de *A. latus*, en

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

comparación por el producido por *B. megaterium*, puede ser atribuida a las condiciones de extracción del polímero. Aunque para ambas bacterias se desarrolló un proceso de extracción similar (**Capítulo 3**), la ausencia de membrana celular en *A. latus* (microorganismo Gram negativo) generó una acción más fuerte de los solventes usados durante el proceso de extracción sobre las propiedades térmicas del PHB final. Por otro lado, la Tabla 6.1 también presenta las propiedades térmicas de los PHAs obtenidos a partir del esquema de biorrefinería desarrollado a partir de los residuos de la producción de biodiesel. El grado de cristalinidad de todos los biopolímeros fue calculado en base a la entalpía de fusión de cristales perfectos de PHB: 149,37 J/g (Barham y col., 1984). La muestra A, la cual corresponde a P(3HB-co-3HV), mostró una temperatura de fusión y un grado de cristalinidad considerablemente menor a las del PHB. Por otra parte, la muestra B, la cual contiene los monómeros 3HB, 3HV y otros HA de longitud de cadena mayor, posee una temperatura y entalpía de fusión menores aún que el P(3HB-co-3HV).

A menores temperaturas de fusión se incrementa considerablemente la capacidad técnica de procesar el biopolímero sin degradarlo. Por lo que la reducción de la temperatura de fusión de los PHAs producidos representa una importante ventaja. Adicionalmente, un menor grado de cristalinidad, como los obtenidos, facilitan de manera considerable la implementación de estos biopolímeros en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, entre otras. Por otra parte, bajos porcentajes de cristalinidad facilitan también la degradación del polímero, dado que las regiones amorfas se degradan más fácilmente que las regiones cristalinas (Valappil y col., 2007).

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

Tabla 6.1. Propiedades térmicas de los PHAs producidos por diferentes micro-organismos y medios de cultivo

Bacteria	Fuente de carbono	T_f (°C) ^a	ΔH_f (J/g) ^b	X_c (%) ^c	$T_{d(50\%)}$ (°C) ^c
<i>B. megaterium</i> BBST4	Glucosa	170,6	91,83	61,5	281,5
<i>A. latus</i> DSMZ 1123	Sacarosa	166,8	86,14	57,7	283,5
<i>C. necator</i> DSMZ 545 (A)	Glicerol crudo	155,0	72,61	48,6	271,5
<i>C. necator</i> DSMZ 545 (B)	Glicerol crudo	140,9	44,11	29,5	231,2

^a Temperatura del pico de fusión; ^b Entalpía de fusión; ^c Grado de cristalinidad; ^c Temperatura de descomposición.

Algunos autores (Bluhm y col., 1986; Pearce y Marchessault, 1994) demostraron que la disminución en la temperatura de fusión del copolímero P(3HB-*co*-3HV) es proporcional al contenido de 3HV en la estructura del biopolímero (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Variación de la temperatura de fusión del P(3HB-*co*-3HV) en función de la composición molar de 3HV (Pearce y Marchessault, 1994)

P(3HB- <i>co</i> -3HV) (mol% HV)	T_f (°C)
3	170
9	162
14	150
20	145

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

En base a los resultados reportados en la literatura y considerando la temperatura de fusión determinada experimentalmente para el copolímero (muestra A), se puede estimar que el mismo posee aproximadamente un 12 mol% de 3HV en su estructura. Los resultados obtenidos a partir de DSC mostraron que tanto la temperatura como la entalpía de fusión son variables proporcionales al contenido de 3HB en la estructura del PHA. Por otra parte, la incorporación de monómeros de cadena más larga en la estructura modifica considerablemente sus propiedades obteniéndose biopolímeros con propiedades específicas para ciertas aplicaciones como biomedicina (Lenz y Marchessault, 2005; Nobes y col., 1998).

6.3.2. *Análisis termogravimétrico*

El análisis termogravimétrico de las muestras de PHAs obtenidas fue llevado a cabo con el objetivo de estudiar la estabilidad térmica de los biopolímeros en función de la temperatura. Las curvas de pérdida de peso en función de la temperatura son presentadas en la Figura 6.6. A partir de los resultados experimentales se calculó la temperatura de descomposición ($T_{d(50\%)}$) de los diferentes biopolímeros estudiados (Tabla 6.1). Las curvas de pérdida de peso obtenidas para las dos muestras de PHB (*B. megaterium* y *A. latus*) y para la muestra de copolímero P(3HB-co-3HV) (muestra A), presentan las características de los PHAs de cadena corta (Doi, 1990; Höfer y col., 2011). Por el contrario, el perfil de pérdida de peso obtenido para el PHA obtenido a partir de *C. necátor* (muestra B), es similar a los reportados para PHAs de cadena media (5 a 16 átomos de carbono) y cadena larga (más de 16 átomos de carbono) (Sin y col., 2010). La menor temperatura de degradación en este tipo de biopolímeros puede ser atribuida a las interacciones entre las cadenas adyacentes más largas (Höfer y col., 2011). En el perfil de degradación térmica se

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

observa la presencia de dos etapas de degradación. Una primera etapa entre 175 y 245 °C y una segunda etapa entre 245 y 420 °C. Este tipo de degradación térmica en dos etapas ha sido reportada por otros autores para PHAs conteniendo monómeros de cadena media y cadena larga (Carrasco y col., 2006; Eroğlu y col., 2005).

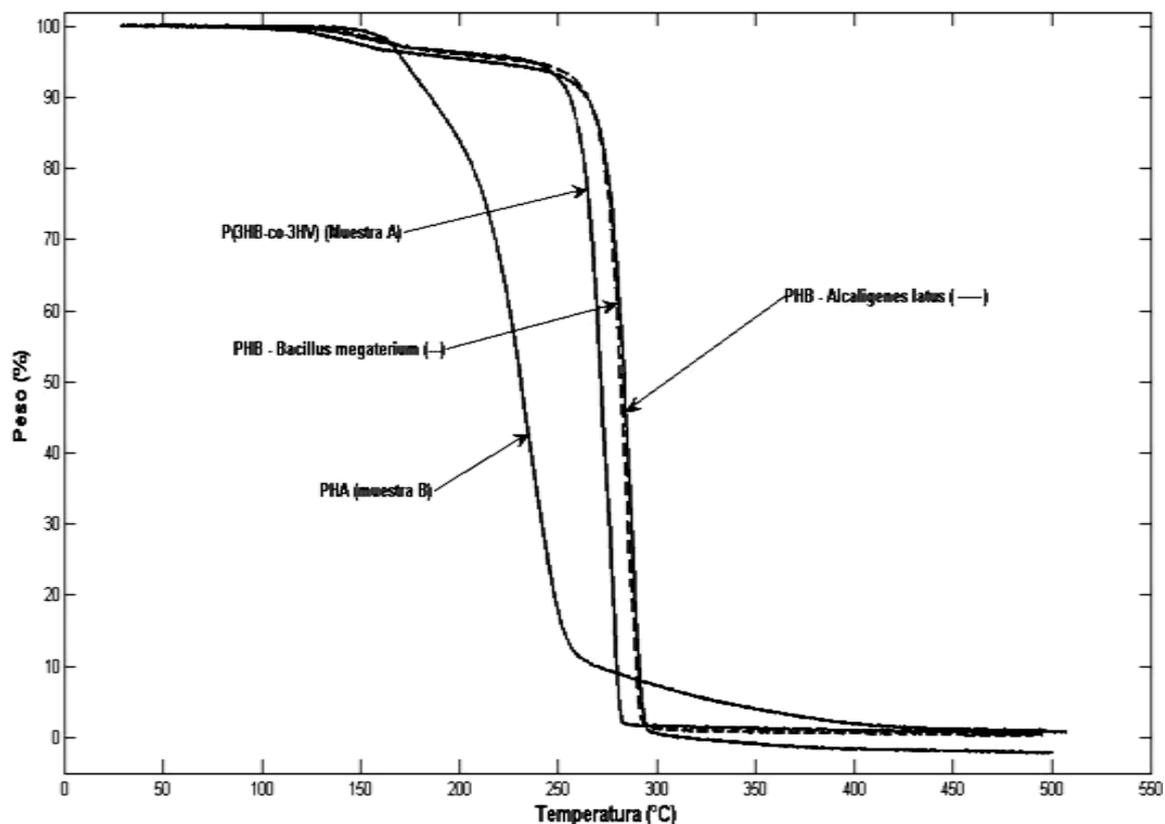


Figura 6.6. Análisis termogravimétrico (TGA) de los diferentes PHAs obtenidos

Tanto los resultados de espectroscopia (^{13}C -NMR) como de análisis térmico (DSC, TGA) indican que el PHA obtenido empleando el medio de cultivo generado a partir de residuos de canola y glicerol crudo como fuente de carbono corresponde a un copolímero que contiene 3HB, 3HV, 3HO y otros monómeros de cadena media o larga. Este hecho revela algo no reportado hasta el momento para la cepa *C. necátor* indicando que la misma

posee enzimas capaces de transformar diferentes aminoácidos en PHAs complejos de cadena media y cadena larga. El consumo de aminoácidos por parte de *C. necator* ha sido reportado en la literatura (Ren y col., 2010; Steinbüchel y Hein, 2001), sin embargo, la formación de PHAs complejos a partir de este medio de cultivo complejo y glicerol crudo es un resultado totalmente novedoso ya que la cepa usada no posee ningún tipo de modificación genética que estimule la formación de estos PHAs. En conclusión, el medio complejo producido a partir de la hidrólisis de los residuos sólidos de canola produjo los precursores carbonados necesarios para la obtención de estos nuevos biopolímeros.

6.4. Conclusiones

En este capítulo se emplearon diferentes técnicas de caracterización de polímeros con el objetivo de identificar la estructura de los PHAs producidos a partir tres microorganismos diferentes: *Bacillus megaterium* BBST4, *Alcaligenes latus* DSMZ 1123 y *Cupriavidus necator* DSMZ 545. Los resultados obtenidos indican que los primeros dos microorganismos produjeron sólo PHB cuando se emplearon medios sintéticos y fuentes de carbono como glucosa y sacarosa. Por otro lado, se encontró que *C. necator* es capaz de producir diferentes copolímeros de PHAs si se emplea un medio complejo como el producido a partir de los residuos de la producción industrial de biodiesel. Uno de los biopolímeros producidos por esta bacteria fue identificado como P(3HB-co-3HV) con una concentración de aproximadamente 12 mol% de HV. El otro PHA producido empleando *C. necator* posee, además de los monómeros 3HB, 3HV y 3HO, otros monómeros de cadena más larga lo cual fue confirmado por ^{13}C -NMR, DSC y TGA. En principio los resultados obtenidos por las técnicas de caracterización empleadas son compatibles con la incorporación de HA de cadena media empleando *C. necator*. Estos resultados son más

que alentadores respecto del esquema de biorrefinería propuesto en el **Capítulo 5** ya que, además de usar subproductos industriales generados anualmente en importantes cantidades, este bioproceso produce polímeros con propiedades mejoradas respecto al PHB.

6.5. Referencias

- Aider, M., Barbara, C., 2011. Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 21-39.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, 450-472.
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L., Holmes, P.A., 1984. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19, 2781-2794.
- Bayari, S., Severcan, F., 2005. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *Journal of Molecular Structure*, 744-747, 529-534.
- Bluhm, T.L., Hamer, G.K., Marchessault, R.H., Fyfe, C.A., Veregin, R.P., 1986. Isodimorphism in bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 19, 2871-2876.
- Carrasco, F., Dionisi, D., Martinelli, A., Majone, M., 2006. Thermal stability of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 2111-2121.
- Chanprateep, S., 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 621-632.

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

- Dai, Y., Lambert, L., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Characterisation of polyhydroxyalkanoate copolymers with controllable four monomer composition. *Journal of Biotechnology*, 134, 137-145.
- Dennis, D., McCoy, M., Stangl, A., Valentin, H.E., Wu, Z., 1998. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 64, 177-186.
- Doi, Y., 1990. Microbial Polyesters. VCH: New York, USA.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., 1986. Proton and carbon-13 NMR analysis of poly(β -hydroxybutyrate) isolated from *Bacillus megaterium*. *Macromolecules*, 19, 1274-1276.
- Doudoroff, M., Stanier, R.Y., 1959. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature*, 183, 1440-1442.
- Eroğlu, M.S., Hazer, B., Ozturk, T., Caykara, T., 2005. Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. *Journal of Applied Polymer Science*, 97, 2132-2139.
- Forsyth, W.G.C., Hayward, A.C., Roberts, J.B., 1958. Occurrence of poly-3-hydroxybutyric acid in aerobic Gram-negative bacteria. *Nature*, 182, 800-801.
- Höfer, P., Vermette, P., Groleau, D., 2011. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Methylobacterium extorquens*: Combining desirable thermal properties with functionality. *Biochemical Engineering Journal*, In Press, published on line.
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G.Q., Huang, W., 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 523-526.

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

- Kamiya, N., Yamamoto, Y., Inoue, Y., Chujo, R., 1989. Microstructure of bacterially synthesized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 22, 1676.
- Lenz, R.W., Marchessault, R.H., 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6, 1-8.
- Macrae, R.M., Wilkinson, J.F., 1958. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*, 19, 210-222.
- Matsusaki, H., Abe, H., Doi, Y., 2000. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. *Biomacromolecules*, 1, 17-22.
- Nobes, G.A.R., Marchessault, R.H., Briese, B.H., Jendrossek, D., 1998. Microscopic visualization of the enzymatic degradation of poly(3HB-co-3HV) and poly(3HV) single crystals by PHA depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. *Journal of Polymers and the Environment*, 6, 99-107.
- Oliveira, F.C., Dias, M.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2007. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 633-638.
- Pearce, R.P., Marchessault, R.H., 1994. Melting and crystallization in bacterial poly(β -hydroxyvalerate), PHV, and blends with poly(β -hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 27, 3869-3874.
- Ren, Q., Ruth, K., Thony-Meyer, L., Zinn, M., 2010. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: Current approaches and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 41-52.

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

- Sin, M.C., Gan, S.N., Annuar, M.S.M., Tan, I.K.P., 2010. Thermodegradation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from oleic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 2334-2342.
- Steinbüchel, A., Hein, S., 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 71, 81-123.
- Steinbüchel, A., Lutke-Eversloh, T., 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 81-96.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128, 219-228.
- Sudesh, K., Abei, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25, 1503-1555.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah, S., 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. *Biotechnology Advances*, 25, 148-175.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T., Bucke, C., Roy, I., 2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132, 251-258.
- Wallen, L.L., Rohwedder, W.K., 1974. Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science Technology*, 8, 576-579.

Capítulo 6: Caracterización de los PHAs obtenidos

Williamson, D.H., Wilkinson, J.F., 1958. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxy-butyrate inclusions of *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, 19, 198-209.

Capítulo 7:

Aplicación de técnicas de optimización dinámica para la producción de PHB y otros metabolitos secundarios

7.1. Introducción

La fermentación representa uno de los pasos más importantes en una gran diversidad de procesos biotecnológicos. A pesar de los importantes avances a nivel laboratorio y de la aplicación industrial de muchos procesos de este tipo, existen aún mejoras por realizar con el objetivo de tener un rendimiento óptimo en muchos procesos fermentativos. Esto es debido, principalmente, al carácter empírico impuesto inicialmente en la biotecnología y a la complejidad matemática asociada a este tipo de procesos. En la actualidad muchas de las técnicas de control empleadas en fermentaciones industriales están basadas en mantener dentro de un rango operacional variables como pH, temperatura y oxígeno disuelto, sin tener en cuenta otros factores que pueden afectar directamente las rutas metabólicas asociadas a la producción del metabolito deseado. Por consiguiente, un conocimiento adecuado de las diferentes variables del proceso, así como sus límites de aplicación y las rutas metabólicas asociadas al crecimiento celular y a la producción de metabolitos, permitirían elegir una configuración de biorreactor adecuada, y más importante aún, las técnicas de optimización adecuadas para mejorar su rendimiento operacional (López y col., 2011).

Los biorreactores semicontinuos son la configuración más usada en procesos biotecnológicos. En estos equipos, el sustrato es alimentado al biorreactor durante la

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

fermentación mientras que la extracción del producto se lleva a cabo al final de la operación. Los cultivos semicontinuos tienen la gran ventaja de prevenir la sobrealimentación de sustrato, lo cual puede inhibir completamente el crecimiento celular (Rani y Rao, 1999) o alguna ruta metabólica específica. Además, los biorreactores tanto discontinuos como semicontinuos son más estériles que otras configuraciones debido a que no existe extracción de corrientes durante su operación (Chen y col., 1995). En una operación semicontinua convencional, una subalimentación del sustrato puede producir la muerte celular, mientras que una sobrealimentación puede ocasionar bajas velocidades metabólicas y la formación de productos indeseados (Chaudhuri y Modak, 1998). La optimización dinámica (OD) de biorreactores semicontinuos permite el correcto cálculo de los flujos de alimentación en el tiempo con el objetivo de lograr un proceso óptimo, es decir, los perfiles de alimentación que maximizan la productividad de la fermentación o un índice económico específico. Además, dado que existen varios perfiles de alimentación posibles, la optimización dinámica puede encontrar el más adecuado con el objetivo de obtener el mayor rendimiento posible del proceso fermentativo. La OD consiste en maximizar (o minimizar) una función objetivo (productividad) en un horizonte de tiempo. Para hacer esto, este horizonte de tiempo es dividido en varios intervalos de tiempo, sobre los cuales se calculan las variables de control que optimizan cada intervalo particular. Una vez que son determinados los perfiles óptimos, la política operacional obtenida puede implementarse experimentalmente mediante el uso de diferentes técnicas como control adaptativo (Smets y col., 2004) o control predictivo (Mahadevan y Doyle, 2003), entre otros. Por otro lado, la búsqueda experimental de los mejores perfiles de alimentación es un ejercicio económicamente costoso y puede convertirse en un esfuerzo extremadamente grande debido la gran cantidad de reactivos y de tiempo que se debería emplear. Es por eso

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

que las técnicas de optimización dinámica se han convertido en una herramienta de optimización muy valiosa, debido a que se pueden alcanzar altas productividades con ligeros cambios operacionales. El estudio de la OD en biorreactores semicontinuos puede desarrollarse cuando se dispone de un modelo cinético que representa correctamente el crecimiento celular, consumo de sustratos y biosíntesis de productos. Generalmente, este modelo cinético debe incluir las restricciones operacionales sobre las variables de control y de estado, y debe representar correctamente las diferentes etapas metabólicas en las cuales está involucrado el metabolito de interés (López y col., 2011).

Varios autores han aplicado técnicas de OD en biorreactores semicontinuos (Banga y col., 2005; Mekarapiruk y Luus, 2000; 2001; Rani y Rao, 1999; Wlaschin y Hu, 2006). En estos trabajos se destaca que, además de las ventajas ya mencionadas, los biorreactores semicontinuos pueden promover y eliminar los efectos indeseados obteniéndose un mejor control sobre las principales desviaciones del crecimiento celular. Además, la OD tiene la enorme ventaja de mejorar considerablemente las condiciones operativas en biorreactores semicontinuos, en comparación con otras configuraciones operacionales como la discontinua y continua.

En general es posible aplicar OD en las fermentaciones en las cuales existe una competencia directa entre la producción de metabolitos primarios y/o secundarios con el crecimiento celular. La competencia entre un metabolito primario y el crecimiento celular está marcada por el hecho de que este metabolito está directamente vinculado al crecimiento celular. El nivel de producción de estos metabolitos dependerá de cómo son administrados los nutrientes por parte del microorganismo para crecer y sintetizar el metabolito de manera simultánea. Por el contrario, debido a que la producción de un metabolito secundario no está directamente asociada a la fase de crecimiento celular, no

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

hay una competición directa por los nutrientes disponibles en el medio. En este caso, es posible separar ambas etapas y optimizarlas separadamente. Sin embargo, el nivel de producción de metabolito, que ocurre en la segunda fase, depende directamente del nivel de crecimiento celular que se alcanzó durante la primera fase (López y col., 2011).

Los principales procesos biotecnológicos en los cuales se ha aplicado la OD son: etanol (Banga y col., 1997; Banga y col., 2005; Chen y Hwang, 1990; Hong, 1986; Luus, 1993), ácido láctico (Ding y Tan, 2006; Roy y col., 2001), penicilina (Banga y col., 1997; Banga y col., 2005; Mekarapiruk y Luus, 2001; Skolpap y col., 2005) y recientemente PHB (López y col., 2010). Sin embargo, existe una gran diversidad de metabolitos, especialmente secundarios, de los cuales se sabe que un biorreactor semicontinuo es la configuración más adecuada para su producción. En esos casos, la OD sería la herramienta más adecuada para aumentar considerablemente la productividad. Estos metabolitos son productos de alto valor comercial como: astaxantina (Liu y Wu, 2008), ácido propiónico (Blanc y Goma, 1987; Goswani y Srivastava, 2000), ácido araquidiónico (Zhu y col., 2006), lacasas (Gianfreda y col., 1999), invertasas (Valencia y col., 2007), células del hibridoma (Dhir y col., 2000) o suero recombinante (Kobayashi y col., 2000), entre otros.

En este capítulo se implementaron técnicas de OD en biorreactores semicontinuos destinados a la producción de poli(hidroxibutirato), PHB y otros dos metabolitos secundarios: penicilina y astaxantina. En una primera etapa el único objetivo era estudiar la optimización de la producción de PHB. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que las políticas operacionales que arroja la OD eran coincidentes con las estrategias de control metabólico que emplea el microorganismo para crecer y sintetizar PHB. En base a

estos resultados y con el objetivo de confirmar la validez de los mismos en otros procesos se aplicó OD a la producción de otros dos metabolitos secundarios: penicilina y astaxantina. Los resultados obtenidos confirmaron nuevamente lo que se observó para el caso del PHB: las políticas operacionales obtenidas a partir de la OD coinciden totalmente con las estrategias de control metabólico asociadas a la producción de metabolitos secundarios.

7.2. Método de parametrización del vector de control

La técnica de OD que se implementó en este estudio se conoce como parametrización del vector de control (PVC). Usando esta técnica, reportada originalmente por Vassiliadis y col. (1994a; b), fueron analizados tres casos de estudio: producción de PHB, penicilina y astaxantina. En este método, el horizonte de tiempo o tiempo final de fermentación es dividido en un número de elementos constantes o variables. Las variables de control, que en el caso de biorreactores semicontinuos son los flujos de alimentación, son aproximadas usando funciones de base predefinidas (tamaño constante, tiempo invariante, etc.). Posteriormente, el proceso de parametrización transforma el problema original de OD (infinito y dimensional) en un problema de programación no lineal (PNL) donde la dinámica del sistema debe ser integrada para cada evaluación de la función objetivo. Esta aproximación es llamada estrategia directa secuencial ya que la técnica de PVC transforma el problema original en un problema de programación no lineal con un problema de valor inicial interno. Debido a que en este capítulo sólo se estudian configuraciones semicontinuas se eligió como variable de control los perfiles de alimentación, los cuales fueron de tamaño constante. De esta forma, dichos flujos, podrían aplicarse experimentalmente mediante una bomba de laboratorio acoplada a un

controlador. Esto significa que los resultados pueden ser perfectamente programados en un modo de control predictivo, el cual implica que los perfiles de alimentación pueden ser introducidos al controlador antes del comienzo de la fermentación.

7.3. Casos de estudio

En primera estancia este estudio estaba dirigido exclusivamente a la OD del proceso de producción de PHB. Sin embargo, en función de los resultados obtenidos, se extendió el análisis a otros dos metabolitos secundarios: penicilina y astaxantina. En todos los casos son bien conocidos los modelos cinéticos y los límites de aplicación y éstos fueron seleccionados con el objetivo de demostrar las ventajas de la aplicación de la OD en configuraciones semicontinuas.

7.3.1. Caso de estudio I: Producción de PHB

El objetivo en este caso particular es obtener los perfiles óptimos de alimentación (F_1 y F_2) que maximizan la productividad final hacia el PHB. El modelo cinético usado (López y col., 2010) corresponde a una extensión del modelo inicialmente presentado por Khanna y Srivastava (2006). Este modelo posee cinco variables de estado y es descrito por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dx_1}{dt} = \left(h_1 - \frac{1}{x_5} (F_1 + F_2) \right) x_1 \quad (7.1)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = (0.008h_1 + 0.034)x_1 - \left(\frac{x_2}{x_5} \right) (F_1 + F_2) \quad (7.2)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = -(0.48h_1 + 0.0348)x_1 + \left[\frac{F_1 S_1}{x_5} \right] - \left(\frac{x_3}{x_5} \right) (F_1 + F_2) \quad (7.3)$$

$$\frac{dx_4}{dt} = - \left[\frac{h_1}{16.7} + 0.0000045 \right] x_1 + \left[\frac{F_2 S_2}{x_5} \right] - \left(\frac{x_4}{x_5} \right) (F_1 + F_2) \quad (7.4)$$

$$\frac{dx_5}{dt} = F_1 + F_2 \quad (7.5)$$

Con:

$$h_1 = 0.302 \left[\frac{x_4^{3.5938}}{x_4^{3.5938} + 76315} \right] \left[\frac{x_5^{2.213}}{x_5^{2.213} + 0.0402} \right] \left[1 - \left(\frac{x_4}{90.11} \right)^{3.19} \right] \left[1 - \left(\frac{x_5}{10.11} \right)^{0.97} \right] \quad (7.6)$$

Donde las variables de estado son: biomasa residual (x_1), PHB (x_2), fructosa (x_3), urea (x_4), y volumen del biorreactor (x_5). S_1 y S_2 son las concentraciones de fructosa y urea en las corrientes F_1 y F_2 , y sus valores son 529,8 y 34,4 g/L, respectivamente (López y col., 2010). El estado inicial del sistema está dado por:

$$x(t_0) = [2 \quad 0.3 \quad 42.5 \quad 1 \quad 4]^T \quad (7.7)$$

Los valores límite mínimo y máximo sobre las dos variables de control son:

$$0 \leq F_1, F_2 \leq 2 \quad (7.8)$$

Las concentraciones máximas posibles para fructosa (x_3), urea (x_4), y biomasa total (X) son:

$$x_3(t) \leq 90.11 \quad (7.9)$$

$$x_4(t) \leq 10.11 \quad (7.10)$$

$$X(t) = x_1(t) + x_2(t) \leq 280 \quad (7.11)$$

El volumen del biorreactor está limitado por:

$$x_5(t) \leq 10 \quad (7.12)$$

Mientras que la función objetivo (I) busca maximizar la productividad hacia el PHB:

$$I = x_2(t_f) x_5(t_f) \quad (7.13)$$

7.3.2. Caso de estudio II: Producción de penicilina

El modelo matemático usado corresponde al reportado por Cuthrell y Biegler (1989).

El principal objetivo es encontrar los perfiles de alimentación (F) que maximicen la

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

producción de penicilina en el tiempo total de fermentación. Para este caso deben resolverse las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dx_1}{dt} = h_2 x_1 - F \left(\frac{x_1}{500 x_4} \right) \quad (7.14)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = h_3 x_1 - 0.01 x_2 - F \left(\frac{x_2}{500 x_4} \right) \quad (7.15)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = - \left(\frac{h_2}{0.47} \right) x_1 - \left(\frac{h_3}{1.2} \right) x_1 - x_1 \left(\frac{0.029 x_3}{0.0001 + x_3} \right) + \frac{F}{x_4} \left(1 - \frac{x_3}{500} \right) \quad (7.16)$$

$$\frac{dx_4}{dt} = \frac{F}{500} \quad (7.17)$$

Con

$$h_2 = 0.11 \left(\frac{x_3}{0.006 x_1 + x_3} \right) \quad (7.18)$$

$$h_3 = 0.0055 \left(\frac{x_3}{0.0001 + x_3 (1 + 10 x_3)} \right) \quad (7.19)$$

Las variables de estado son: biomasa (x_1), penicilina (x_2), sustrato (x_3), y volumen del biorreactor (x_4). El estado inicial está dado por:

$$x(t_0) = [1.5 \quad 0 \quad 0 \quad 7]^T \quad (7.20)$$

Los límites inferior y superior para las variables de control y de estado son:

$$0 \leq F \leq 50 \quad (7.21)$$

$$0 \leq x_1(t) \leq 40 \quad (7.22)$$

$$0 \leq x_3(t) \leq 25 \quad (7.23)$$

$$0 \leq x_4(t) \leq 10 \quad (7.24)$$

La función objetivo a ser maximizada es, en este caso, la productividad de penicilina:

$$I = x_2(t_f)x_4(t_f) \quad (7.25)$$

7.3.3. Caso de estudio III: Producción de astaxantina

El modelo matemático usado para la biosíntesis de astaxantina fue reportado recientemente por Liu y Wu (2008). Como en los casos previos, el principal objetivo se basó en encontrar los perfiles óptimos de alimentación (F) que maximicen la producción de astaxantina. Para este caso deben resolverse las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dx_1}{dt} = x_1(h_4 + h_5 - 0.00114) - F \left(\frac{x_1}{x_5} \right) \quad (7.26)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \left(\frac{F}{x_5} \right) (750 - x_2) - 0.843x_1h_4 - \left(\frac{x_1h_4}{0.372} \right) \quad (7.27)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = 0.273x_1h_4 - \left(\frac{h_5}{0.324} \right) x_1 - F \left(\frac{x_3}{x_5} \right) \quad (7.28)$$

$$\frac{dx_4}{dt} = 0.342x_1(h_4 + h_5 - 0.00114) + 0.00698x_1 - F \left(\frac{x_4}{x_5} \right) \quad (7.29)$$

$$\frac{dx_5}{dt} = F \quad (7.30)$$

Con

$$h_4 = \left(\frac{0.129x_2}{0.0872 + x_2} \right) \left(\frac{178}{178 + x_2} \right) \left(\frac{7.64}{7.64 + x_3} \right) \quad (7.31)$$

$$h_5 = \left(\frac{0.0184x_3}{1.42 + x_3} \right) \left(\frac{x_3}{x_3 + 1.95x_2} \right) \left(\frac{7.64}{7.64 + x_3} \right) \quad (7.32)$$

Las variables de estado son: biomasa (x_1), glucosa (x_2), etanol (x_3), astaxantina (x_4) y volumen del biorreactor (x_5). El estado inicial del sistema es el siguiente:

$$x(t_0) = [0.6 \quad 50 \quad 0 \quad 0 \quad 1]^T \quad (7.33)$$

Los límites inferior y superior sobre las variables de control y de estado son:

$$0 \leq F \leq 0.3 \quad (7.34)$$

$$0 \leq x_2(t) \leq 178 \quad (7.35)$$

$$0 \leq x_3(t) \leq 7.64 \quad (7.36)$$

$$0 \leq x_5(t) \leq 1.3 \quad (7.37)$$

La función objetivo está expresada por:

$$I = x_4(t_f) x_5(t_f) \quad (7.38)$$

7.4. Resultados y análisis

La biosíntesis de PHB, penicilina y astaxantina fue analizada mediante la aplicación de técnicas de OD en bioreactores semicontinuos. En todos los casos se seleccionaron 20 etapas en total. Los tiempos totales de fermentación fueron fijados de acuerdo a valores reportados experimentalmente (Cuthrell y Biegler, 1989; Khanna y Srivastava, 2006; Liu y Wu, 2008). Todos los cálculos fueron desarrollados en una computadora Pentium IV,

operando con un procesador de 3 GHz. En términos generales, para cada caso se desarrollaron aproximadamente unas 30 iteraciones de PNL y cerca de 45 búsquedas lineales de PNL. Bajo esta metodología, se emplearon aproximadamente 7 segundos para alcanzar la solución óptima de cada problema dinámico. Adicionalmente, las variables de control fueron limitadas en base a las ecuaciones 7.8, 7.21 y 7.34. En las siguientes secciones se presentan y discuten los resultados obtenidos para cada sistema particular. Se analizan además las tendencias de los resultados obtenidos en la OD, y su coincidencia con las rutas metabólicas asociadas a la producción de cada metabolito particular.

7.4.1. Caso de estudio I: Producción de PHB a partir de *C. necator*

Para el caso del PHB, el máximo valor de la función objetivo alcanzado fue de 1405. Este valor correspondió a una productividad de 2,87 g PHB/L h. La concentración de biopolímero alcanzada es aproximadamente 19 veces mayor que la concentración alcanzada en modo discontinuo (Khanna y Srivastava, 2006). Por otro lado, los resultados obtenidos son muy similares a los obtenidos por Kim y col. (1994). Los perfiles de concentración y los perfiles de alimentación de las variables de control que maximizan la producción de PHB son presentados en la Figura 7.1, mientras que en la Figura 7.2 se muestra la velocidad específica de crecimiento, la producción de PHB y la ruta metabólica para la biosíntesis de PHB a partir de *C. necator*. Como puede observarse en ambas figuras, existen dos etapas operacionales relacionadas a la producción de PHB: alto crecimiento celular con bajos niveles de producción de PHB y alta biosíntesis de PHB sin producción de biomasa residual.

Durante la primera etapa, bajo condiciones de crecimiento balanceado, todos los nutrientes son destinados al ciclo TCA (ciclo del ácido tricarbóxico). Allí, toda la acetil-

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

CoA producida a partir de la glicólisis es destinada a dicho ciclo, lo cual genera altas concentraciones de coenzima libre (CoA). Estas altas concentraciones de CoA inhiben a la enzima 3-ketiolasa que controla el ciclo de producción de PHB. Por lo tanto, en esta etapa inicial se obtienen muy bajas productividades de PHB (Figura 7.2a y b). Posteriormente, luego del máximo crecimiento celular se inicia la segunda etapa. Aquí, la alta concentración de fructosa y la baja concentración de nitrógeno inhiben el ciclo TCA y por ende el crecimiento celular. Entonces, disminuye el nivel de CoA y aumenta la actividad de la 3-ketiolasa, activando así la ruta metabólica del PHB (Anderson y Dawes, 1990; Doi, 1990; Steinbüchel y Lutke-Eversloh, 2003).

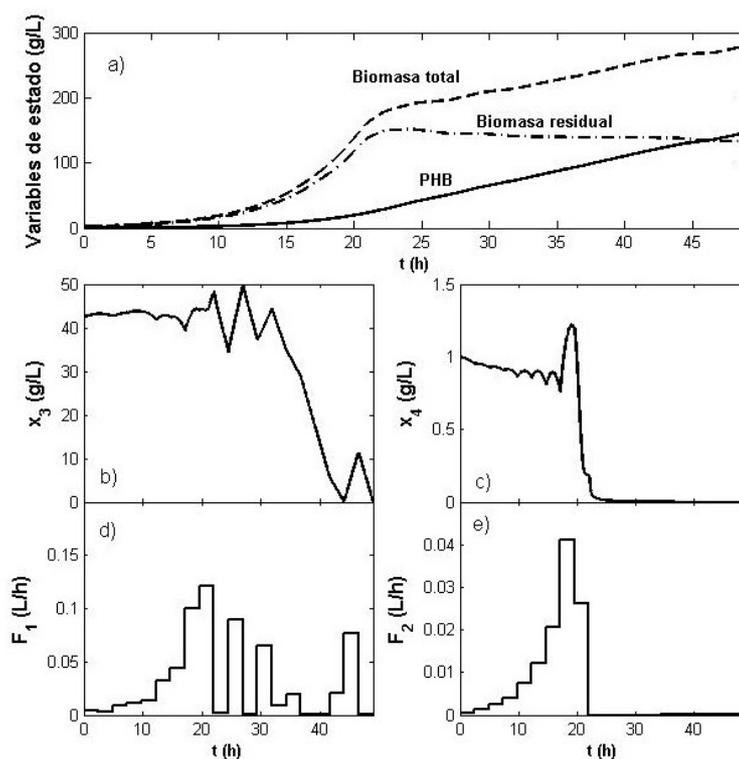


Figura 7.1. a) Concentraciones de biomasa total, residual, y PHB, b) concentración de fructosa, c) concentración de urea, d) perfil de alimentación de fructosa y e) perfil de alimentación de urea en función del tiempo de fermentación

Se puede concluir que los resultados arrojados por la OD coinciden con las diferentes etapas metabólicas empleadas por *C. necator* para la biosíntesis del PHB. Además, es importante mencionar que, aunque en este trabajo no se reportan resultados experimentales obtenidos a partir de la aplicación de los presentes resultados, existen evidencias experimentales publicadas por otros autores que validan y soportan estos resultados (Kim y col., 1994; Wang y Lee, 1997).

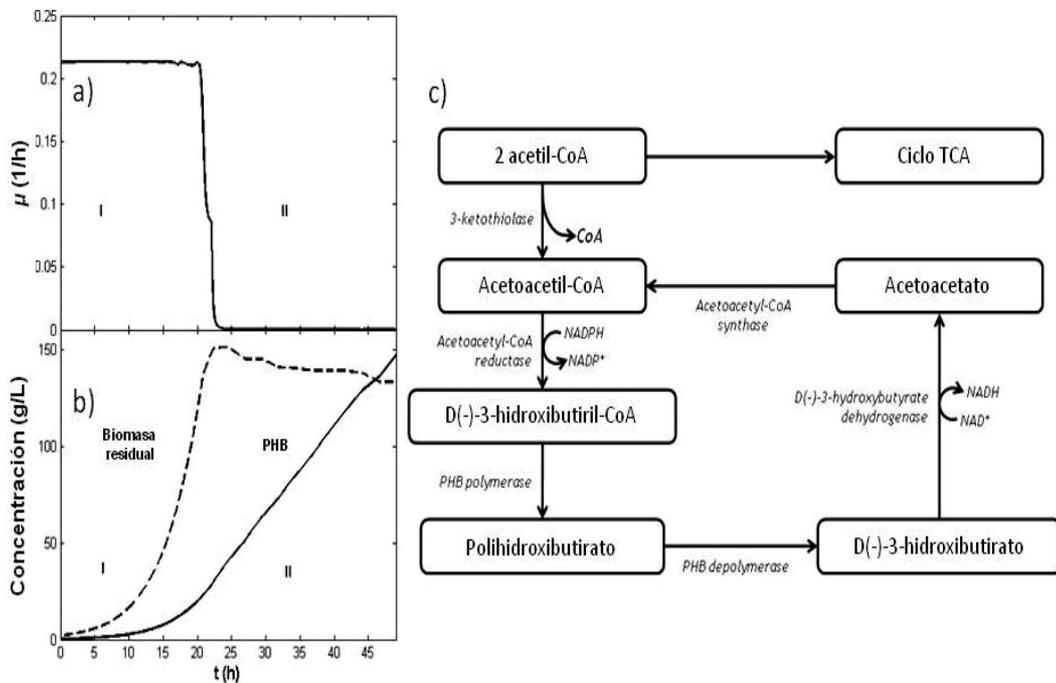


Figura 7.2. a) Velocidad específica de crecimiento (μ), b) concentraciones de PHB y biomasa residual en función del tiempo de fermentación, y c) ruta metabólica del PHB (Anderson y Dawes, 1990)

Algunos autores han obtenido altas concentraciones de biomasa y altas concentraciones de PHB empleando una metodología semicontinua con un control en línea a nivel experimental. Por ejemplo, Kim y col. (1994) basaron su trabajo en dos

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

metodologías diferentes: el uso de la evolución de la concentración de CO₂ medida por espectroscopia de masas para estimar la concentración de glucosa y el uso de un medidor de glucosa en línea para medir de manera directa la concentración en el fermentador. Basado en ello, estos autores obtuvieron perfiles con una tendencia similar a los encontrados por OD, reportando también la presencia de las dos fases obtenidas en este trabajo. En conclusión, se propone una nueva estrategia de control para la producción de PHB (control predictivo). Por otra parte, los perfiles óptimos de alimentación son completamente aplicables mediante bombas y controladores tanto a nivel laboratorio como industrial. Por lo tanto, si se dispone de la cinética adecuada, la técnica de OD propuesta puede ser una herramienta útil para mejorar los niveles actuales de producción de PHB.

*7.4.2. Caso de estudio II: Producción de penicilina a partir de *P. chrysogenum**

Los resultados para este caso de estudio son presentados en las Figuras 7.3 y 7.4. El valor óptimo alcanzado para la función objetivo fue de 87,9, el cual correspondió a una productividad de 0,067 g penicilina/L h en un tiempo total de fermentación de 132 horas. En este caso la concentración final de penicilina fue al menos cinco veces mayor que el valor correspondiente para el caso discontinuo (Samad y Ahmad, 2006). Para este caso de estudio, los perfiles óptimos de alimentación usando la metodología de tamaño de paso constante mostraron que en 29 horas existía una caída drástica del crecimiento celular, después de la cual se activa la biosíntesis de penicilina.

Basado en lo anterior se cambió el problema de OD con el objetivo de verificar exactamente dicha inflexión. En este caso se usados 15 intervalos de igual tamaño entre 0 y

37,5 h, y los restantes 5 intervalos entre 37,5 y el tiempo final de fermentación, encontrándose nuevamente que el punto de inflexión estaba localizado en 29 h.

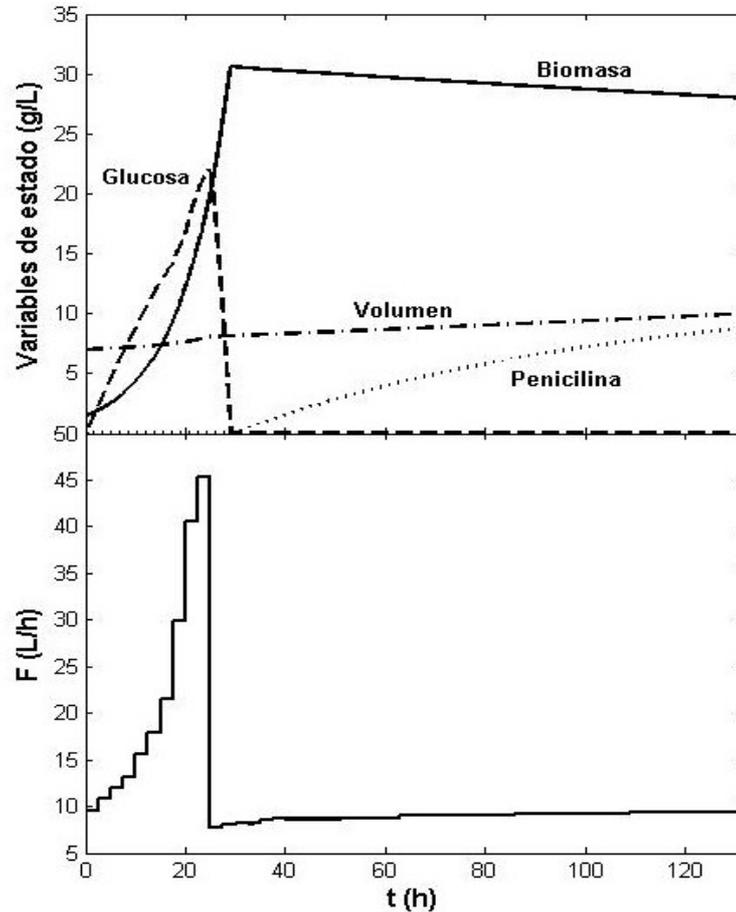


Figura 7.3. a) Evolución de la concentración de penicilina, de biomasa y de glucosa y volumen de biorreactor y b) perfil óptimo de alimentación de glucosa en función del tiempo de fermentación

Los perfiles mostrados en la Figura 7.3 son similares a los reportados por otros autores con el mismo sistema (Cuthrell y Biegler, 1989; Dadebo y McAuley, 1995). Sin embargo, el análisis de este capítulo está enfocado en la coincidencia entre los resultados de la OD y los mecanismos de control metabólico asociados a la biosíntesis de la

penicilina. Como puede observarse en la Figura 7.3, hay un marcado consumo de glucosa durante la fase de crecimiento de *Penicillin chrysogenum*. Una vez alcanzado el máximo crecimiento, el perfil de alimentación de glucosa se mantiene casi constante. Nuevamente se verifica la presencia de dos fases de producción que, en este caso, corresponden a crecimiento celular bajo una completa inhibición de la síntesis de penicilina, seguido de la biosíntesis de penicilina bajo inhibición del crecimiento celular (Figura 7.4).

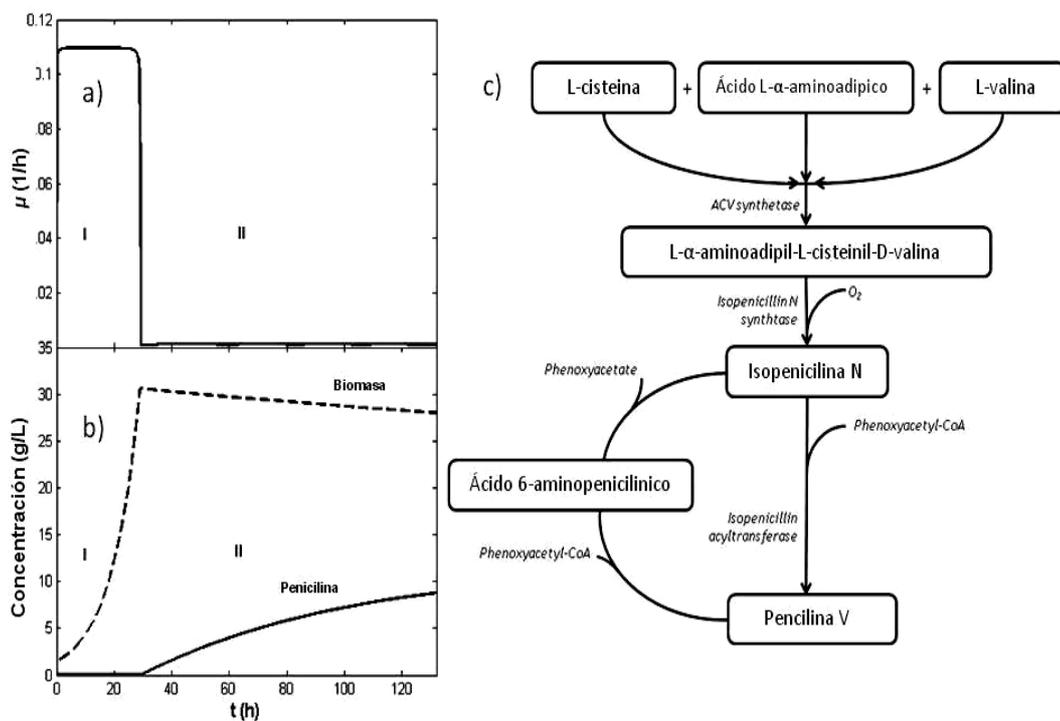


Figura 7.4. a) Velocidad específica de crecimiento (μ), b) concentraciones de penicilina y biomasa en función del tiempo de fermentación y c) ruta metabólica de la penicilina

(Nielsen y Jørgensen, 1996)

Zhang y Demain (1991) y Nielsen y Jørgensen (1996) han reportado que el mecanismo de biosíntesis de penicilina es controlado por la enzima ACV sintetasa, la cual es responsable de condensar tres aminoácidos: ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-

valina (Figura 7.4c). Bajo condiciones normales de crecimiento, esta enzima es inhibida por la glucosa y por el gliceraldehido 3-fosfato (G3P, un intermediario de la glicolisis). La inhibición por parte de la glucosa es debida a la competencia por fuente de energía (ATP), mientras que la inhibición del G3P es debida a la ausencia de L-cisteína, dado que reacciona químicamente con la misma (Zhang y Demain, 1991).

Durante las primeras horas de fermentación toda la glucosa que entra en las células es usada, exclusivamente, para la síntesis de biomasa (zona I Figura 7.4a y b y Figura 7.3a) y no hay biosíntesis de penicilina debido a las altas concentraciones de glucosa. Una vez que se alcanza un adecuado crecimiento celular, la concentración de glucosa cae a valores muy bajos (Figura 7.1a, aprox. 29 h), disminuyendo con ella la concentración de G3P. Esta combinación de factores genera la activación de la ACV sintetasa iniciándose la biosíntesis de penicilina. Simultáneamente es inhibido el ciclo TCA debido a las bajas concentraciones de glucosa y al consumo de oxígeno para la síntesis de la isopenicilina (Figura 7.4c). Estos factores son representados en la Figura 7.4a y b donde, después de 29 h, es inhibido el crecimiento de *P. chrysogenum* y se activa la producción de penicilina. Puede concluirse que los resultados obtenidos de la OD muestran nuevamente una gran coincidencia con los mecanismos de control metabólico para la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*

7.4.3. Caso de estudio III: Producción de astaxantina a partir de *X. dendrorhous*

La biosíntesis de astaxantina fue estudiada en un biorreactor semicontinuo empleando técnicas de OD. Para este caso se obtuvo un valor óptimo de función objetivo de 75,6, el cual correspondió a una concentración final de astaxantina de 58,14 mg/L, y a

una productividad de astaxantina de 0,48 mg/L h. Tanto los perfiles de concentración como el perfil de la variable de control que maximiza la productividad del carotenoide son presentados en la Figura 7.5.

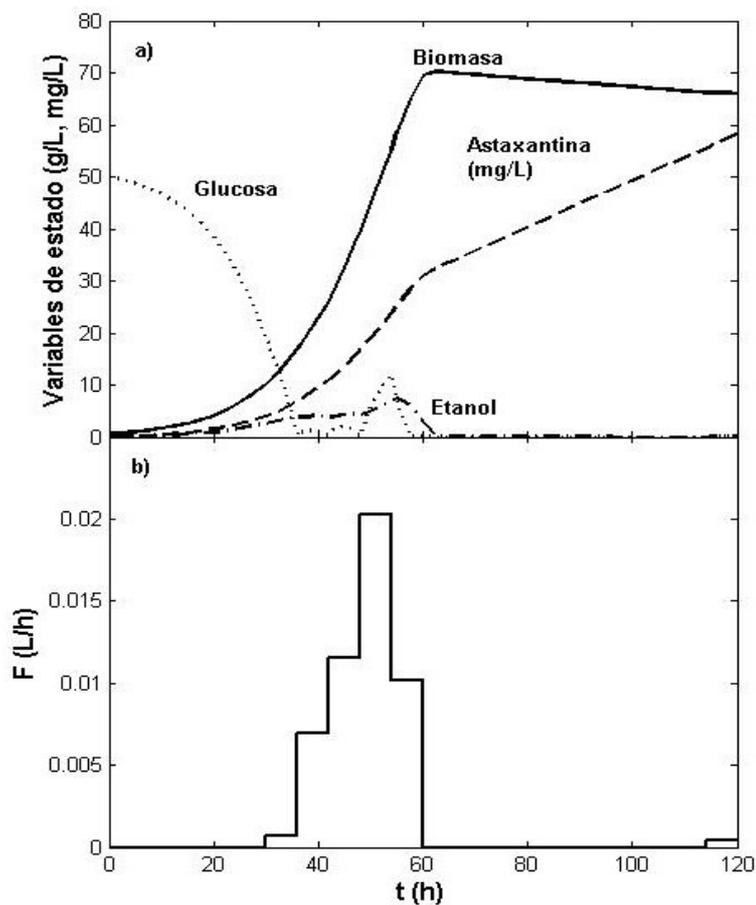


Figura 7.5. a) Concentraciones de biomasa, astaxantina, etanol y glucosa y b) perfil de alimentación de glucosa en función del tiempo de fermentación

Como puede observarse en la Figura 7.5 en forma similar a lo encontrado en los otros casos, los resultados de la OD muestran la presencia de dos etapas metabólicas: una primera etapa de crecimiento celular y baja producción de astaxantina, seguida de una segunda etapa donde el carotenoide es producido bajo la ausencia de crecimiento celular.

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

Es importante notar que la astaxantina no es estrictamente un metabolito secundario, debido a que su síntesis está asociada tanto a la fase de crecimiento como a la estacionaria. Sin embargo, es absolutamente necesaria la maximización de su producción mediante una metodología semicontinua. En este sentido, los perfiles de alimentación que se obtuvieron a partir de la OD inhibieron la producción de etanol, y maximizaron la síntesis de carotenoide durante el transcurso de ambas etapas metabólicas.

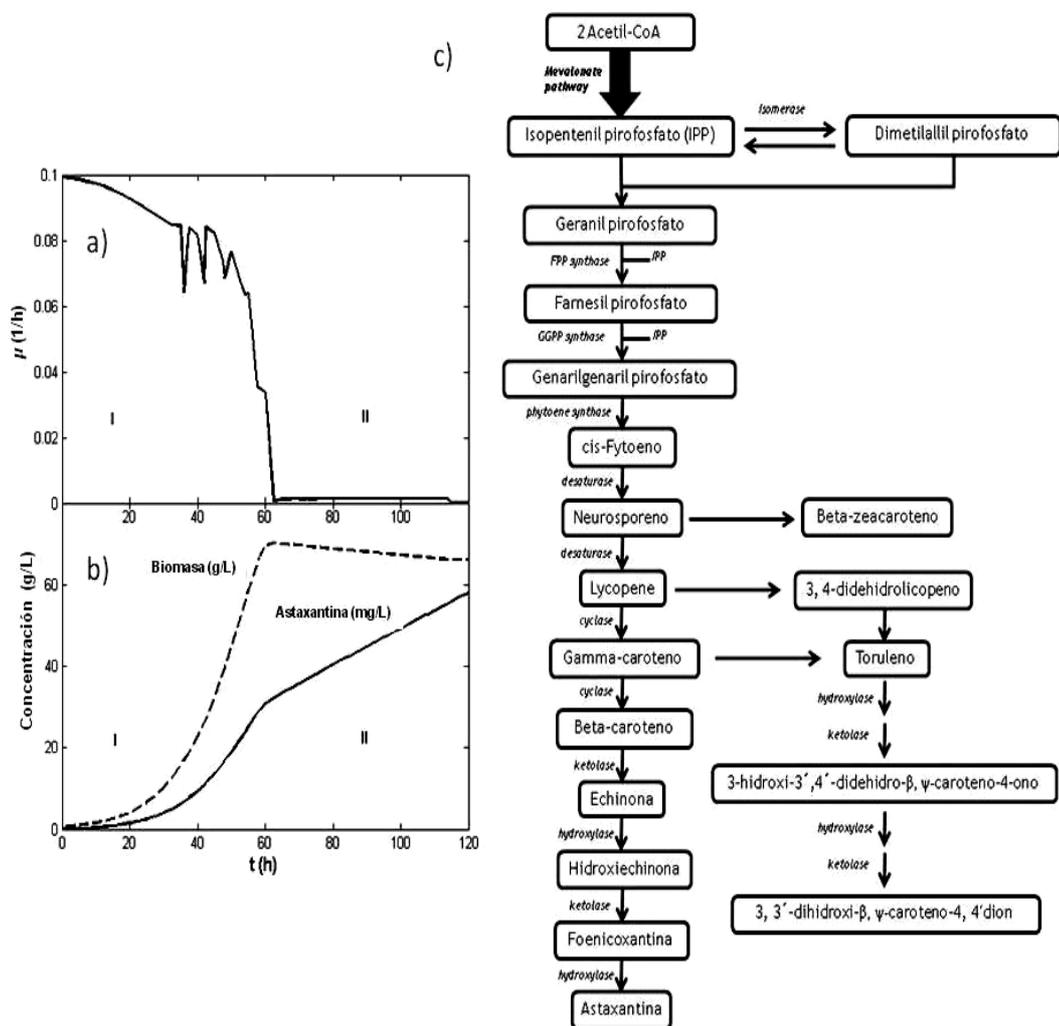


Figura 7.6. a) Velocidad específica de crecimiento (μ), b) concentraciones de astaxantina y biomasa en función del tiempo de fermentación y c) ruta metabólica de la astaxantina (Goldstein y Brown, 1990)

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

Con el objetivo de explicar la relación entre los resultados teóricos obtenidos y las rutas metabólicas asociadas a la producción de astaxantina, la Figura 7.6 presenta la velocidad de crecimiento específico de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, los perfiles de biomasa y astaxantina, y la ruta metabólica de la astaxantina en este microorganismo.

El mecanismo de control metabólico de astaxantina en *X. dendrorhous*, como en muchos productores de carotenoides, tiene una relación directa con la concentración de oxígeno y carbono/nitrógeno bajo dos etapas diferentes: crecimiento celular y producción de carotenoide en ausencia de crecimiento celular. El punto clave de la regulación es la ruta metabólica del mevalonato (primera ruta metabólica mostrada en la Figura 7.6), la cual corresponde a un paso anterior a la síntesis del terpenoide (Goldstein y Brown, 1990). Bajo condiciones balanceadas de crecimiento, o relativamente altas concentraciones de glucosa y nitrógeno, casi toda la acetil-CoA producida durante la glicolisis es destinada al ciclo TCA. Durante esta etapa, la ruta metabólica del mevalonato es parcialmente inhibida obteniéndose una baja producción de carotenoide. Estos dos factores se confirman a partir de los resultados obtenidos en la OD (Figura 7.6a y b, sección I), donde se observa un alto nivel de crecimiento celular y una baja síntesis de carotenoide. Cuando se alcanza el máximo crecimiento celular, los resultados de OD muestran que la concentración de glucosa disminuye a valores muy bajos, lo cual activa completamente la ruta metabólica del mevalonato, haciendo que toda la acetil-CoA disponible sea destinada a la biosíntesis de astaxantina (Figura 7.6a y b, sección II).

7.5. Conclusiones

En este capítulo se revisaron y evaluaron algunos procesos biotecnológicos en los que son usadas fermentaciones semicontinuas con la idea de producir metabolitos

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

secundarios de alto valor agregado. Se aplicó optimización dinámica a la producción de tres productos de interés: PHB, penicilina y astaxantina. Con estos casos de estudio, se demostró la importancia de la aplicación de técnicas de OD en biorreactores semicontinuos. Para todos los casos, los resultados obtenidos fueron analizados y comparados con las estrategias de control usadas por cada microorganismo para sintetizar el correspondiente metabolito secundario. De esta forma, las operaciones semicontinuas mostraron considerables incrementos de la producción en esta clase de bioproductos. Sin embargo, aunque los biorreactores semicontinuos generan buenas condiciones operacionales, se encontró que estas condiciones pueden ser optimizadas mediante la implementación de técnicas de OD en combinación con un modelo cinético adecuado. En ese sentido, la OD permite que los nutrientes que se alimentan al biorreactor sean aquellos que los microorganismos necesitan, en un tiempo particular de fermentación, con el objetivo de crecer o sintetizar el metabolito deseado. Como resultado, la OD garantiza una óptima síntesis de producto mientras que previene subalimentaciones y sobrealimentaciones de sustrato, lo que podría ocasionar la formación de productos secundarios. Los resultados obtenidos mostraron que la OD es una excelente herramienta de control predictivo que ayuda a reducir tanto el tiempo como los costos de experimentación, mientras incrementa el rendimiento y la productividad de metabolitos secundarios como el PHB, la penicilina y la astaxantina, entre otros.

7.6. Nomenclatura

F	Flujo de la variable de control (L/h)
I	Función objetivo
N	Número de intervalos de control

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

t Tiempo (h)

Caso de estudio I

h_1 Velocidad específica de crecimiento (1/h)
 S Concentración en la corriente alternativa (g/L)
 X Concentración de biomasa total (g/L)
 x_1 Concentración de biomasa residual (g/L)
 x_2 Concentración de PHB (g/L)
 x_3 Concentración de fructosa (g/L)
 x_4 Concentración de urea (g/L)
 x_5 Volumen de biorreactor (L)

Caso de estudio II

h_2 Velocidad específica de crecimiento (1/h)
 h_3 Velocidad de crecimiento referida a la penicilina (g/g h)
 x_1 Concentración de biomasa (g/L)
 x_2 Concentración de penicilina (g/L)
 x_3 Concentración de glucosa (g/L)
 x_4 Volumen de biorreactor (L)

Caso de estudio III

h_4 Velocidad específica de crecimiento (1/h)
 h_5 Velocidad específica de crecimiento referida al etanol (1/h)
 x_1 Concentración de biomasa (g/L)
 x_2 Concentración de glucosa (g/L)
 x_3 Concentración de etanol (g/L)

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

x_4 Concentración de astaxantina (mg/L)

x_5 Volumen de biorreactor (L)

Subíndices

$1, 2$ Fructosa y urea, respectivamente (caso de estudio II)

F Estado final

0 Estado inicial

Superíndices

T Transpuesto

Acrónimos

ACV Ácido L- α -aminoadípico-L-cisteína-L-valina

PHB Poli(hidroxibutirato)

PNL Programación no lineal

PVC Parametrización del vector de control

OD Optimización dinámica

G3P Gliceraldehido-3-fosfato

TCA Ciclo del ácido tricarboxílico

7.7. Referencias

- Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, 450-472.
- Banga, J.R., Alonso, A.A., Singh, R.P., 1997. Stochastic dynamic optimisation of fed-batch and semicontinuos bioprocess. *Biotechnology Progress*, 13, 326-335.

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

- Banga, J.R., Balsa-Canto, E., Moles, C.G., Alonso, A.A., 2005. Dynamic optimization of bioprocesses: Efficient and robust numerical strategies. *Journal of Biotechnology*, 117, 407-419.
- Blanc, P., Goma, G., 1987. Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation. *Bioprocess Engineering*, 2, 175-179.
- Chaudhuri, B., Modak, J.M., 1998. Optimization of fed-batch bioreactor using neural network model. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 19, 71-79.
- Chen, C., Hwang, C., 1990. Optimal control computation for differential-algebraic process systems with general constraints. *Chemical Engineering Communications*, 97, 9-26.
- Chen, L., Bastom, V.V., Breusegem, A., 1995. A case study of adaptive nonlinear regulation of fed-batch biological reactors. *Automatica*, 31, 55-65.
- Cuthrell, J., Biegler, L., 1989. Simultaneous optimization and solution methods for batch reactor control profiles. *Computers and Chemical Engineering*, 13, 49-62.
- Dadebo, S.A., McAuley, K.B., 1995. Dynamic optimization of constrained chemical engineering problems using dynamic programming. *Computers and Chemical Engineering*, 19, 513-525.
- Dhir, S., Morrow, J.K., Rhinerhart, R.R., Wiesner, T., 2000. Dynamic optimization of Hybridoma growth in a fed-batch bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 67, 197-205.
- Ding, S., Tan, T., 2006. L-Lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41, 1451-1454.
- Doi, Y., 1990. Microbial Polyesters. VCH: New York, USA.
- Gianfreda, F., Xu, J.M., Bollag, J.M., 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1-26.

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343, 425-430.
- Goswami, V., Srivastava, A.K., 2000. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 121-128.
- Hong, J., 1986. Optimal substrate feeding policy for fed batch fermentation with substrate and product inhibition kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1421-1431.
- Khanna, S., Srivastava, A.K., 2006. Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly(β -hydroxybutyrate). *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1145-1151.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K., Woo, S.I., 1994. Production of polyhydroxybutyrate by fed-batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 892-898.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Tomomitsu, K., 2000. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylophilic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 280-288.
- Liu, Y.S., Wu, J.Y., 2008. Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 996-1004.
- López, J.A., Bucalá, V., Villar, M.A., 2010. Application of dynamic optimization techniques for poly(β -hydroxybutyrate) production in a fed-batch bioreactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 1762-1769.

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

- López, J.A., Gianoglio-Pantano, I., Villar, M.A., 2011. Dynamic optimization of biotechnological processes involving the biosynthesis of secondary metabolites. *Submitted*.
- Luus, R., 1993. Application of dynamic programming to differential-algebraic process systems. *Computers and Chemical Engineering*, 17, 373-377.
- Mahadevan, R., Doyle, F.J., 2003. On-line optimization of recombinant product in a fed-batch bioreactor. *Biotechnology Progress*, 19, 639-646.
- Mekarapiruk, W., Luus, R., 2000. Optimal control by iterative dynamic programming with deterministic and random candidates for control. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39, 84-91.
- Mekarapiruk, W., Luus, R., 2001. On solving optimal control problems with free initial condition using iterative dynamic programming. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 79, 777-784.
- Nielsen, J., Jørgensen, H.S., 1996. A kinetic model for the penicillin biosynthetic pathway in *Penicillium chrysogenum*. *Control Engineering Practice*, 4, 765-771.
- Rani, K.Y., Rao, V.S.R., 1999. Control of fermenters: a review. *Bioprocess Engineering*, 21, 71-77.
- Roy, S., Gudi, R.D., Venkatesh, K.V., Shah, S.S., 2001. Optimal control strategies for simultaneous saccharification and fermentation of starch. *Process Biochemistry*, 36, 713-722.
- Samad, N.A.F.A., Ahmad, A., 2006. Comparison product optimization performance of fed-batch fermentation processes for penicillin G production. *Proceedings of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering and Technology*, 562-575.

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

- Skolpap, W., Scharer, J.M., Douglas, P.L., Moo-Young, M., 2005. Optimal feed rate profiles for fed-batch culture in penicillin production. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27, 1057-1064.
- Smets, I.Y., J.E., C., November, E.J., Bastin, G.P., Van Impe, J.F., 2004. Optimal adaptative control of (bio)chemical reactors: past, present and future. *Journal of Process Control*, 14, 795-805.
- Steinbüchel, A., Lutke-Eversloh, T., 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 81-96.
- Valencia, C., Espinosa, G., Giralt, J., Giralt, F., 2007. Optimization of invertase production in a fed-batch bioreactor using simulation based dynamic programming coupled with a neural classifier. *Computers and Chemical Engineering*, 31, 1131-1140.
- Vassiliadis, V.S., Sargent, R.H.W., Pantelides, C.C., 1994a. Solution of a class of multistage dynamic optimization problems. 1. Problems without path constraints. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 33, 2111-2122.
- Vassiliadis, V.S., Sargent, R.H.W., Pantelides, C.C., 1994b. Solution of a class of multistage dynamic optimization problems. 2. Problems with path constraints. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 33, 2123-2133.
- Wang, L., Lee, S.Y., 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3703-3706.
- Wlaschin, K.F., Hu, W.S., 2006. Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 101, 43-74.

Capítulo 7: Optimización dinámica de biorreactores semicontinuos

Zhang, J., Demain, A.L., 1991. Regulation of ACV synthetase in penicillin and cephalosporin-producing microorganisms. *Biotechnology Advances*, 9, 623-641.

Zhu, M., Yu, L.-J., Li, W., Zhou, P.P., Li, C.Y., 2006. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 735-740.

Capítulo 8:

Conclusiones finales y trabajos futuros

8.1. Diferentes bioprocesos para la producción de PHAs

A lo largo de esta tesis se estudió a nivel experimental la producción de PHB a través de tres alternativas diferentes: 1) empleando una nueva cepa de *Bacillus megaterium* (BBST4) en un medio sintético formulado, 2) a partir de un bioproceso que incluye la transformación de las macromoléculas naturales presentes en el topinambur (principalmente inulina y proteínas), usando el hongo *Aspergillus awamori* y la bacteria *Cupriavidus necator* DSMZ 4058 y 3) a partir de un bioproceso basado en el uso de los principales residuos provenientes de la producción de biodiesel a nivel industrial, usando el hongo *Aspergillus oryzae* y la bacteria *Cupriavidus necator* DSMZ 545. En las siguientes secciones se plantean diferentes bioprocesos para una producción sostenible de PHAs en base a los resultados obtenidos en esta tesis.

8.1.1. Producción sostenible de PHAs a partir de cepas *Bacillus*

Motivado por el “cuello de botella” que representa la formación de esporas en cepas del género *Bacillus*, lo cual fue confirmado en el **Capítulo 3** de esta tesis, esta sección está dedicada al análisis de la viabilidad de la producción de PHAs a partir de estos microorganismos Gram-positivos. Debe mencionarse que las metodologías de investigación que están siendo actualmente desarrolladas en microorganismos Gram-negativos, pueden ser perfectamente aplicadas a *Bacillus* y otros microorganismos Gram-positivos con el objetivo de mejorar sus niveles actuales de productividad y rendimiento. En ese sentido, se proponen tres áreas o metodologías, que al ser combinadas, podrían

Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros

reducir de manera considerable los costos de producción de PHAs, así como mejorar tanto la productividad como algunas propiedades físicas: 1) desarrollo de estrategias de bioproceso/biorrefinería usando cepas *Bacillus* como productoras de PHB, incluyendo materias primas renovables y subproductos industriales, 2) aplicación de técnicas de optimización de biorreactores, como optimización dinámica (OD), empleando modelos cinéticos que contemplen el fenómeno de esporulación presente en *Bacillus* sp. y 3) mejoramiento de las estructuras de los PHAs en base a la capacidad de *Bacillus* para producir diversos copolímeros de PHAs, ampliando así su espectro de aplicaciones a áreas como la biomedicina, entre otras. Aunque esta clase de metodologías conjugadas no ha sido desarrollada hasta el momento, en los siguientes párrafos se describen técnicas ya publicadas que apoyan la hipótesis anterior y que podrían ser combinadas con el objetivo de alcanzar mejores niveles de producción de PHAs a partir de cepas *Bacillus*.

Algunos trabajos recientes han mostrado la viabilidad de producir altas concentraciones de PHB usando estrategias de biorrefinería (Koutinas y col., 2007b; Xu y col., 2010). Previo al proceso fermentativo, el medio de cultivo puede ser producido no sólo a partir de trigo (Koutinas y col., 2007a; Koutinas y col., 2003; Koutinas y col., 2005), sino también a partir de subproductos industriales como residuos oleaginosos (Solaiman y col., 2006; Wang y col., 2010). De esta forma, en lugar de *C. necator*, se podrían usar cepas del género *Bacillus* como productoras de PHAs. Además de reducirse el costo de producción de los PHAs debido al uso de materias primas económicas, esta metodología disminuiría los niveles de esporulación debido a que estos medios de cultivo son muy ricos en una gran variedad de nutrientes (Koutinas y col., 2007a; Wang y col., 2010). En tal sentido, los resultados reportados por Kulpreecha y col. (2009) y por Yilmaz y Neyatli (2005) confirman esta hipótesis. Estos autores han obtenido altos rendimientos celulares y

Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros

de PHB empleando cepas del género *Bacillus* y residuos industriales como melaza de caña y de remolacha. Lógicamente, las mejoras en la producción de PHB que reportan estos autores son inducidas principalmente por los complejos nutricionales (ricos en nitrógeno y fósforo) normalmente presentes en las melazas (Thomsen, 2005).

Sin embargo, una implementación hipotética del concepto de biorrefinería no significa resultados óptimos en términos de productividad y rendimiento hacia el PHB. En ese caso, deben aplicarse técnicas de optimización que permitan mejorar dichos factores. En el **Capítulo 7** (López y col., 2010; 2011), se mostró que la OD es una poderosa herramienta para predecir y optimizar las dos etapas metabólicas asociadas a la biosíntesis de PHB. Para el caso de cepas de género *Bacillus* y en base a datos experimentales disponibles, se deben desarrollar modelos cinéticos más detallados que contemplen la esporulación. Esto mejoraría los niveles de producción de PHB mientras se reduce simultáneamente el fenómeno de esporulación. Esta hipótesis es soportada por los resultados experimentales presentados por Sabra y Aboud-Zeid (2008), quienes mejoraron las estrategias de alimentación en biorreactores semicontinuos destinados a la producción de PHB a partir de una cepa de *Bacillus megaterium*. Estos autores obtuvieron, mediante la optimización de los perfiles de alimentación en fermentaciones semicontinuas, hasta un 65 % de acumulación de PHB minimizando los niveles de esporulación.

Finalmente, otra ventaja importante que brindan las cepas del género *Bacillus*, y que por ende debe tenerse en cuenta, es que éstas poseen diferentes PHA sintetas, es decir, tienen la habilidad de producir una gran variedad de PHAs de cadena corta y media (Reddy y col., 2009; Tajima y col., 2003; Valappil y col., 2007). Estos copolímeros con diferentes composiciones monoméricas tienen un gran espectro de aplicaciones comerciales. El PHB,

Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros

el cual está constituido solamente por 3-hidroxi butirato, tiene temperaturas de fusión y de transición vítrea relativamente altas. Además, es más duro y quebradizo que algunos plásticos sintéticos, como el polipropileno. La incorporación de 3-hidroxi valerato (3HV) en la cadena genera un copolímero con mejores propiedades finales. Cuando se incrementa la fracción de 3HV entre un 0 y 25% se mejoran considerablemente la flexibilidad y la dureza del copolímero en comparación con el PHB (Bauer y Owen, 1988; Owen, 1985), mientras se reduce considerablemente la temperatura de fusión a valores en los cuales el polímero puede ser procesado más fácilmente sin peligro de degradación. Por consiguiente, manipulando correctamente las condiciones de fermentación es posible obtener PHAs con las propiedades y características deseadas.

8.1.2. Producción sostenible de PHAs a partir de topinambur y de los residuos de la industria del biodiesel

Los resultados obtenidos en los **Capítulos 4 y 5** demuestran que es posible obtener PHAs empleando esquemas de biorrefinerías. Sin embargo, es necesario continuar estas líneas de investigación con el objetivo de mejorar aún más los rendimientos obtenidos tanto en los procesos de hidrólisis como de fermentación. La optimización de esta etapa permitirá el desarrollo pleno de bioprocesos sostenibles para la producción de PHAs. Para el caso del topinambur, los resultados obtenidos mostraron que el contenido de nitrógeno (FAN) y demás nutrientes presentes en los hidrolizados de topinambur, es relativamente bajo para inducir un crecimiento celular adecuado que ayude a mejorar la acumulación de PHB. Este problema podría ser resuelto mejorando el nivel de hidrólisis de las proteínas presentes en el topinambur, o empleando otros hidrolizados ricos en proteínas, como el que se produjo a través de residuos de semillas de canola (**Capítulo 5**). La primera opción está

Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros

basada en el hecho de que la cepa de *A. awamori* usada tiene excelentes habilidades para producir enzimas proteolíticas (Wang y col., 2009; 2005). Sin embargo, el contenido proteico del topinambur podría no ser suficiente para aportar las cantidades necesarias de nitrógeno para llevar a cabo fermentaciones microbianas conducentes a la producción de PHB. Por este motivo, y en base a los resultados obtenidos, se propone que los estudios futuros estén enfocados en la utilización de subproductos industriales como materia prima para la producción de nitrógeno y otros suplementos nutricionales necesarios para el desarrollo de procesos fermentativos. En este sentido, los residuos oleaginosos son muy ricos en proteínas y minerales, y por ende tienen un gran potencial biotecnológico (Ramachandran y col., 2007).

La Figura 8.1 presenta un bioproceso para la producción de PHB a partir de los resultados presentados en los **Capítulos 4 y 5**, y los datos reportados por Wang y col. (2010). En este esquema se proponen dos bioconversiones utilizando hongos diferentes (*A. awamori* y *A. oryzae*). La fermentación en estado sólido con *A. awamori* es empleada para la producción de una solución rica en fructosa a partir del topinambur, mientras que la otra fermentación en estado sólido con *A. oryzae* es usada para la producción de una solución rica en nutrientes a partir de los residuos sólidos de la canola u otro material oleaginoso. La combinación entre estos dos hidrolizados daría un medio de cultivo con los niveles necesarios de fuente de carbono y nutrientes para la producción de PHB a partir de fermentaciones bacterianas.

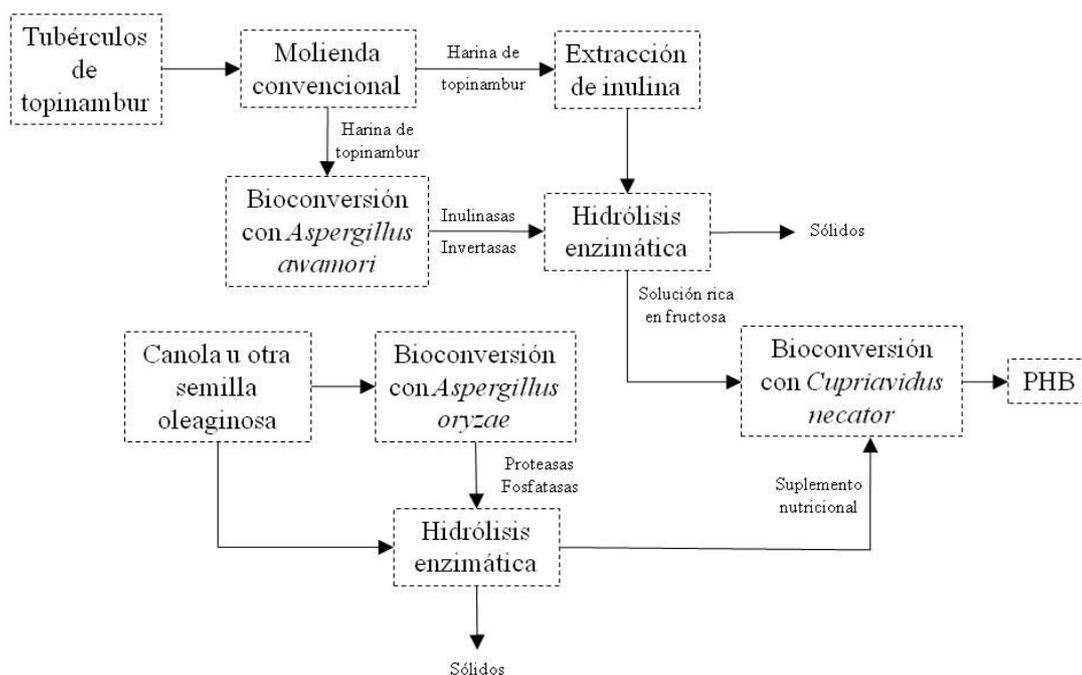


Figura 8.1. Bioproceso propuesto para la producción de PHB a partir de topinambur y residuos sólidos de semillas oleaginosas

Por otra parte, en el **Capítulo 5** se demostró experimentalmente que los residuos de la producción industrial de biodiesel son completamente aptos para la biosíntesis de PHAs sin la adición de otros nutrientes. Los residuos sólidos de las semillas de canola tienen el contenido proteico suficiente para que, luego de una hidrólisis enzimática, puedan generar un medio de cultivo genérico capaz de sostener, de manera equilibrada, el crecimiento celular y la producción de PHAs. Este medio rico en vitaminas, minerales, fósforo y nitrógeno es deficitario en fuente de carbono. En ese sentido, se demostró que el glicerol crudo sirve de fuente de carbono para la producción de PHAs en el medio complejo producido a partir de las semillas de canola. El esquema para este bioproceso es presentado en la Figura 8.2.

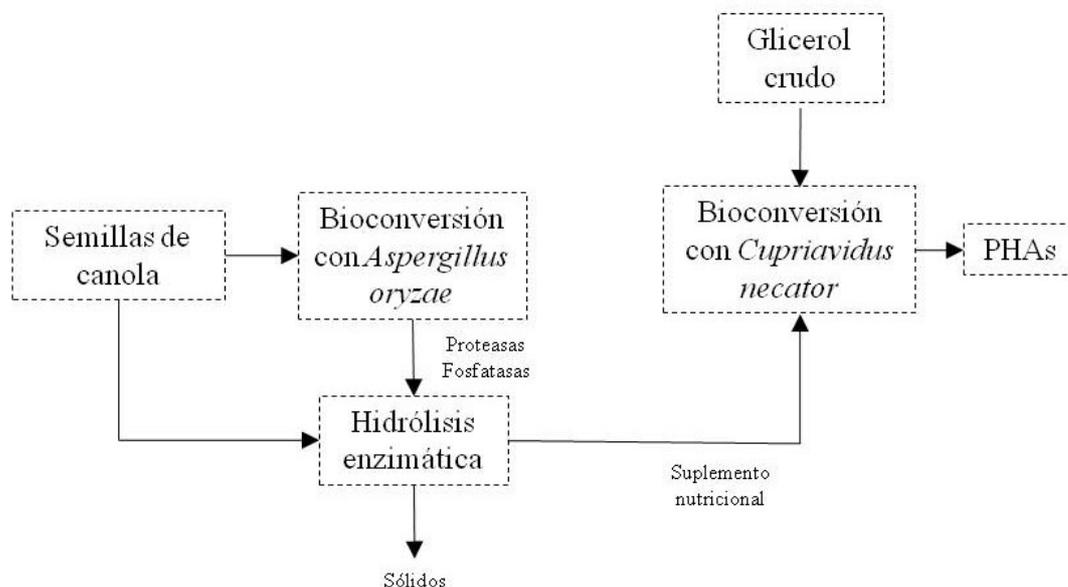


Figura 8.2. Bioproceso propuesto para la producción de PHAs a partir de los dos principales subproductos derivados de la industria del biodiesel

Este esquema de bioproceso es simple, y como se demostró experimentalmente en el **Capítulo 5**, es altamente eficiente y viable. Además tiene una gran ventaja: el medio de cultivo que se produce a partir de la degradación enzimática de los residuos de semillas de canola es altamente rico en aminoácidos y lípidos, los cuales son promotores de la formación de copolímeros de PHAs como el poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato) y otros PHAs de cadena media. En definitiva, este bioproceso tiene un gran futuro debido a la utilización de desechos industriales que son producidos anualmente en gran escala y a su capacidad para producir diferentes copolímeros de PHAs. Dicha tendencia fue confirmada en el **Capítulo 6** de esta tesis donde se demostró que los aminoácidos presentes en los hidrolizados de semillas de canola y el pequeño contenido de metanol y lípidos presentes en el glicerol crudo son sustancias capaces de estimular la biosíntesis de PHAs de cadena

media en *C. necator*, algo que no ha sido reportado hasta ahora sin la ayuda de manipulación genética en este microorganismo.

8.2. Trabajos futuros

Los párrafos anteriores, además de proponer estrategias de bioproceso para la producción de PHAs, también mencionan algunas de los potenciales trabajos futuros derivados de esta tesis. Sin embargo, existen también otras áreas de trabajo en las que se puede continuar trabajando.

Los resultados presentados en el **Capítulo 7** tienen una gran importancia debido a que representan una nueva alternativa para la optimización de metabolitos secundarios. Aunque existen evidencias y tendencias experimentales que soportan la validez y viabilidad de estos resultados, es de gran importancia poder confirmar los mismos para los tres metabolitos estudiados. Esta validación requerirá de un importante esfuerzo experimental enfocado al desarrollo de fermentaciones programadas que se realicen bajo las condiciones operacionales obtenidas teóricamente.

En el **Capítulo 6** se demostró la capacidad de *C. necator* para sintetizar PHAs con un número de átomos de carbono mayor a 6, es decir, PHAs de cadena media. Este resultado tiene una gran importancia, y brinda además muchas posibilidades de estudio y desarrollo a futuro. Conociendo exactamente la estructura química de todos los componentes nutricionales que ingresan en el medio de cultivo al proceso fermentativo (principalmente aminoácidos y lípidos), se podría “programar” la síntesis de ciertos PHAs específicos. Es decir, estimular al microorganismo empleado (*C. necator*) a la formación de estructuras poliméricas con propiedades físicas y químicas determinadas para ciertas aplicaciones específicas. Este trabajo tendría que ser desarrollado de manera multidisciplinaria entre expertos en caracterización de biomoléculas, expertos en fermentaciones microbianas y

expertos en caracterización de polímeros. Al igual que para el caso de la optimización dinámica, éste es un tema con muchísimo futuro en investigación, y por ende necesitará ser desarrollado mediante un enfoque multidisciplinario.

8.3. Referencias

- Bauer, H., Owen, A.J., 1988. Some structural and mechanical properties of bacterially produced poly-*B*-hydroxybutyrate-co-poly-*B*-hydroxyvalerate. *Colloids and Polymer Science*, 266, 241-247.
- Koutinas, A.A., Arifeen, N., Wang, R., Webb, C., 2007a. Cereal-based biorefinery development: integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 61-72.
- Koutinas, A.A., Wang, R., Webb, C., 2003. Modelling studies of a process to produce a generic bioconversion feedstock from wheat. *Food and Bioproducts Processing*, 81, 239-249.
- Koutinas, A.A., Wang, R.H., Webb, C., 2005. Development of a process for the production of nutrient supplements for fermentations based on fungal autolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 629-638.
- Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R., Webb, C., 2007b. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1035-1044.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., 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, 240-245.

Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros

- López, J.A., Bucalá, V., Villar, M.A., 2010. Application of dynamic optimization techniques for poly(β -hydroxybutyrate) production in a fed-batch bioreactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49, 1762-1769.
- López, J.A., Gianoglio-Pantano, I., Cardona, C.A., Villar, M.A., 2011. Dynamic optimization of biotechnological processes involving the biosynthesis of secondary metabolites. *Submitted*.
- Owen, A.J., 1985. Some dynamic mechanical properties of microbially produced poly- β -hydroxybutyrate/ β -hydroxyvalerate copolymers. *Colloids and Polymer Science*, 263, 799-803.
- Ramachandran, S., Singh, S.K., Larroche, C., Soccol, C.R., Pandey, A., 2007. Oil cakes and their biotechnological applications - A review. *Bioresource Technology*, 98, 2000-2009.
- Reddy, S.V., Thirumala, M., Mahmood, S.K., 2009. A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 837-843.
- Sabra, W., Aboud-Zeid, D.M., 2008. Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yield by *Bacillus megaterium*. *Research Journal of Microbiology*, 3, 308-318.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 2006. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 783-789.
- Tajima, K., Igari, T., Nishimura, D., Nakamura, M., Satoh, Y., Munekata, M., 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating

Capítulo 8: Conclusiones finales y trabajos futuros

- polyhydroxylakanoate (PHA) from gas field soil *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 77-81.
- Thomsen, M.H., 2005. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 598-606.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C., Roy, I., 2007. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 1-17.
- Wang, R., Godoy, L.C., Shaarani, S.M., Melikoglu, M., Koutinas, A.A., Webb, C., 2009. Improving wheat flour hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 223-228.
- Wang, R., Law, R.C.S., Webb, C., 2005. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 217-227.
- Wang, R., Shaarani, S.M., Godoy, L.C., Melikoglu, M., Vergara, C.S., Koutinas, A.A., Webb, C., 2010. Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 77-83.
- Xu, Y., Wang, R.H., Koutinas, A.A., Webb, C., 2010. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45, 153-163.
- Yilmaz, M., Beyatli, Y., 2005. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by a *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses. *Zuckerindustrie*, 130, 109-112.

Anexo A: Materiales y métodos

A.1. Materiales y métodos

A.1.1. Reactivos

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Ltd. (USA). Las técnicas cromatográficas desarrolladas en esta tesis: cromatografía gaseosa (GC), cromatografía líquida (HPLC) y cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) fueron desarrolladas usando reactivos de grado analítico Sigma-Aldrich Ltd.

A.1.2. Materias primas de origen agrícola y subproductos industriales

A.1.2.1. Tubérculos de topinambur

Los tubérculos de topinambur (*Helianthus tuberosus*) fueron adquiridos en un supermercado local en el sureste de Francia (Grenoble). Los tubérculos fueron lavados, cortados y liofilizados por un periodo de 24 h. Los trozos secos fueron molidos en un molino universal para alimentos (Universal Ginding Mill) con el objetivo de obtener una harina de topinambur con tamaño de partícula uniforme. La harina de topinambur obtenida fue usada como única fuente de carbono y nutrientes para la producción de enzimas mediante la fermentación en estado sólido del hongo *Aspergillus awamori* y como único sustrato para la hidrólisis enzimática.

A.1.2.2. Semillas de canola

El residuo sólido proveniente de la extracción del aceite de las semillas de canola (*Brassica campestris*) comúnmente conocido como torta grasa, fue amablemente cedido por el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Neiker-Tecnalia (España). Esta torta grasa, rica principalmente en material proteico, fue molida en un molino universal para alimentos (Universal Ginding Mill) con el objetivo de obtener una harina de semillas de canola con un tamaño de partícula uniforme. La harina de semillas de canola obtenida fue usada como única fuente de carbono y nutrientes para la producción de enzimas mediante la fermentación en estado sólido del hongo *Aspergillus oryzae*, y como único sustrato para la hidrólisis enzimática.

A.1.2.3. Glicerol crudo

El glicerol crudo y la torta grasa de canola son los principales residuos de la producción de biodiesel a partir de aceite de canola. El glicerol crudo fue obtenido de una industria productora de biodiesel en el norte de España (País Vasco). Este contiene principalmente las sales provenientes del proceso de esterificación del aceite vegetal para la producción del biodiesel (NaCl y K₂SO₄). El glicerol crudo fue usado como fuente de carbono para la producción de PHAs.

A.2. Microorganismos

En esta tesis fueron usadas, principalmente, 4 especies diferentes de bacterias para la producción de polihidroxicanoatos: *Bacillus megaterium* BBST4, *Alcaligenes latus* DSMZ 1123, *Cupriavidus necator* DSMZ 4058 y *Cupriavidus necator* DMSZ 545.

Anexo A: Materiales y métodos

Adicionalmente, en los esquemas de biorrefinería estudiados a nivel experimental fueron usadas dos especies diferentes de hongos: *Aspergillus awamori* y *Aspergillus oryzae*.

A.2.1. Bacterias

La cepa de *Bacillus megaterium* BBST4 fue extraída de muestras de suelos superficiales provenientes del Estuario de Bahía Blanca (38°45' and 39°40' S, and 61°45' and 62°20' W, Buenos Aires, Argentina). Esta cepa fue aislada como parte del trabajo experimental de esta tesis y fue fenotípicamente caracterizada como *Bacillus megaterium*. Por otra parte, *Alcaligenes latus* DSMZ 1123, *Cupriavidus necator* DSMZ 4058 y *Cupriavidus necator* DMSZ 545 fueron comprados directamente en la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). En general, estas cuatro bacterias fueron conservadas a -70 °C en un freezer, en viales aptos para crioconservación (Protect™ Bacterial Preservation System TS70-AS, Technical Service Consultant Limited), como material de reserva para el mantenimiento de las diferentes cajas de Petri usadas. Cada vial contiene aproximadamente 1 mL de medio líquido con un 20 % de glicerol puro.

El proceso de mantenimiento y preservación fue estándar para todas las bacterias empleadas en esta tesis y fue llevado a cabo mensualmente durante el trabajo experimental. Cada cepa fue precultivada en un shaker orbital a 200 rpm durante 24 h y 30 °C en Erlenmeyers de 250 mL usando 10 g/L de glucosa (para *Bacillus megaterium* BBST4), de sacarosa (*Alcaligenes latus* DSMZ 1123), de fructosa (*Cupriavidus necator* DSMZ 4058) o de glicerol (*Cupriavidus necator* DSMZ 545), 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de peptona. Un ansa de las células producidas en esta etapa fue esparcida en cajas de Petri conteniendo la misma cantidad de fuente de carbono y nutrientes del medio líquido con la

Anexo A: Materiales y métodos

adición de 2 % de agar con el objetivo de solidificar el medio. Cada microorganismo creció en su correspondiente medio sólido por 48 h a 30 °C. Una vez que las células crecieron satisfactoriamente, las cajas de Petri que las contenían fueron guardadas como microorganismos frescos a 4 °C. Estos microorganismos preservados en cajas de Petri fueron regularmente usados para preparar el inóculo de todas las fermentaciones que se desarrollaron con cada microorganismo en particular.

A.2.2. Hongos filamentosos

Los hongos usados en esta tesis fueron: *Aspergillus awamori* y *Aspergillus oryzae*. *Aspergillus awamori* 2B. 361 U2/1, una cepa usada a nivel industrial, fue cedida gentilmente por el Satake Centre for Grain Process Engineering Laboratory de la Universidad de Manchester (Reino Unido). Por su parte, *Aspergillus oryzae* fue cedido por Amoy Food Ltd. (Hong Kong). Esta cepa fue aislada a partir de un iniciador de salsa de soja por el personal de dicha compañía. Ambas cepas fueron usadas separadamente, y en algunas situaciones de manera simultánea, en fermentaciones en estado sólido enfocadas a la producción de soluciones crudas de enzimas ricas principalmente en inulinasas, invertasas, proteasas y fosfatasas. Como método de conservación aplicable a períodos de tiempo medianamente prolongados, cada hongo fue liofilizado y guardado en arena en forma de esporas a 4 °C. Las esporas fueron purificadas y guardadas en cajas de Petri conteniendo un medio sólido con 20 g/L de agar y 50 g/L de la materia prima agrícola utilizada para cada microorganismo: topinambur para *Aspergillus awamori* y harina de torta de canola para *Aspergillus oryzae*. El tamaño del inóculo empleado en cada fermentación en estado sólido fue aproximadamente de un millón de esporas por cada gramo de materia prima usada en base seca.

A.3. Fermentaciones en estado sólido

Antes de cada fermentación en estado sólido, los cultivos de *A. awamori* y *A. oryzae* fueron esporulados en medios sólidos que contienen 5 % (p/v) de topinambur o torta de canola, y 2 % (p/v) de agar, en tubos de ensayo de 20 mL por un período de 4 a 5 días a 30 °C. Las esporas producidas al final de este período de tiempo fueron extraídas por medio de la adición de 10 mL de agua esterilizada, con algunas gotas de Tween 80 (0.01 % v/v). Las suspensiones de esporas fueron usadas como inóculo para la fermentación en estado sólido, las cuales fueron realizadas en Erlenmeyers de 250 mL conteniendo 5 g de topinambur o torta de canola como única fuente de carbono y nutrientes. Los Erlenmeyers fueron incubados a 30 °C y 200 rpm durante diferentes tiempos de fermentación, los cuales dependen principalmente de la capacidad de cada hongo para metabolizar el material orgánico que tiene disponible. El principal objetivo durante esta etapa es la producción de un complejo enzimático crudo, el cual es posteriormente utilizado en la hidrólisis de la harina de topinambur por medio de las enzimas producidas a partir de *A. awamori*, y de la harina de las semillas de canola a partir del complejo enzimático producido a partir de *A. oryzae*.

A.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron usados algunos con todas las bacterias, y otros con bacterias específicas dependiendo de la capacidad de cada una para metabolizar diferentes fuentes de carbono.

A.4.1. Medios sintéticos

Un medio de cultivo genérico (medio nutritivo) que sirve como inóculo para las 4 bacterias usadas es aquel que contiene 10 g/L de la fuente de carbono consumida por cada microorganismo, 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de peptona. Este mismo medio líquido es convertido en medio sólido por la adición de 20 g/L de agar. El medio sólido es usado para la conservación de las cepas en cajas de Petri a 4 °C por un periodo máximo de 30 días.

El medio de cultivo usado para las fermentaciones en estado líquido con la cepa de *Bacillus megaterium* BBST4 consiste de glucosa, 1 g/L NH_4NO_3 , 2,5 g/L K_2HPO_4 , 2,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g/L KH_2PO_4 , 2,5 g/L NaCl , 0,5 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,05 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Por su parte, el medio líquido usado para las fermentaciones en estado líquido con la cepa *Alcaligenes latus* DSMZ 1123 está basado en: sacarosa, 1,4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L KH_2PO_4 , 1,8 g/L Na_2HPO_4 , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L citrato de hierro(III) y amonio y 3 mL/L de una solución de elementos traza que contiene: 0,3 g/L H_3BO_4 , 0,2 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,01 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Las cepas *C. necator* DSMZ 4058 y 545 no fueron empleadas con medios sintéticos.

A.4.2. Medios complejos

En esta tesis fueron producidos dos medios complejos para ser usados en las siguientes etapas de fermentaciones microbianas: a partir de harina de topinambur y a partir de harina de semillas de canola.

La producción de medio de cultivo complejo a partir de harina de topinambur se detalla a continuación. Previo a la producción de medio, la inulina fue extraída mediante

Anexo A: Materiales y métodos

un proceso de extracción simple, el cual fue llevado a cabo en botellas Duran de 1 L de capacidad que contenían 8 g de harina de topinambur liofilizada. Las condiciones de extracción fueron establecidas de acuerdo a la metodología propuesta por (Lingyun y col., 2007): 77 °C y 11 mL de agua por gramo de harina de topinambur liofilizada durante 25 min en un agitador magnético. Con el objetivo de llevar a cabo la hidrólisis enzimática, los hongos provenientes de la fermentación en estado sólido fueron mezclados con la solución rica en inulina previamente extraída. El volumen de la mezcla se incrementó hasta 200 mL mediante la adición de agua destilada estéril, se ajustó el pH a 5 y la hidrólisis enzimática se llevó a cabo por 48 h a 60 °C sobre un agitador magnético. Durante la hidrólisis, y debido al efecto enzimático, la inulina y otros nutrientes presentes en la harina de topinambur son liberados en el medio líquido obteniéndose un medio de cultivo rico en fructosa y nutrientes, el cual será usado luego en las fermentaciones bacterianas para producir PHB. Al final de la hidrólisis, la mayor parte de los sólidos son separados por centrifugación (10 min y 10.000 rpm) mientras que los sólidos restantes son removidos por filtración al vacío usando filtros Whatman N° 1. La solución rica en fructosa y nutrientes fue esterilizada y filtrada mediante un filtro de 0,2 µm (POLYCAP 36 AS, Fisher). Por otra parte, el pH del medio fue ajustado con KOH 10 M al valor de 6,8 requerido para las fermentaciones bacterianas.

La producción de medio de cultivo a partir de la harina de semillas de canola se desarrolló como se describe a continuación. Los hongos esporulados provenientes de la fermentación en estado sólido fueron extraídos con 100 mL de agua destilada estéril conteniendo diferentes cantidades de harina de canola liofilizada. La cantidad de harina fue variada con el objetivo de obtener las concentraciones finales de nutrientes deseadas. Luego de la fase de extracción de sólidos, el volumen de la mezcla se incremento hasta 200

Anexo A: Materiales y métodos

mL con agua destilada estéril, se ajustó el pH a 5,5 y se llevó a cabo la hidrólisis enzimática durante 28 h a 55 °C sobre un agitador magnético. Durante la hidrólisis enzimática, el material proteico presente en la harina de canola fue convertido en una solución rica en aminoácidos libres, vitaminas y minerales. Al final de la hidrólisis se procedió a separar los sólidos del medio líquido siguiendo los pasos descritos para la harina de topinambur. Previo a la esterilización por filtración, la solución rica en nutrientes fue mezclada con diferentes cantidades de glicerol crudo previamente esterilizado.

A.5. Fermentaciones sumergidas para la producción de PHAs

A.5.1. Fermentaciones en Erlenmeyers (shake flasks)

Todas las fermentaciones bacterianas, independientemente del microorganismo y el medio de cultivo usado, fueron inoculadas con 1 mL de medio nutritivo, el cual fue inoculado 24 h antes a 200 rpm y 30 °C con la fuente de carbono específica para cada microorganismo y con un ansa de células provenientes de las cajas de Petri almacenadas a 4 °C. Las fermentaciones (incluido el inóculo) fueron desarrolladas en Erlenmeyers de 250 mL en un agitador orbital a 200 rpm y 33 °C para el caso de *B. megaterium* BBST4 y *A. latus* DSMZ 1123, y 30 °C para *C. necator* DSMZ 4058 y 545. El volumen de líquido usado en cada Erlenmeyer varió entre 40 y 50 mL. Los medios complejos fueron esterilizados por filtración (0,2 µm, POLYCAP 36 AS, Fisher), mientras que los medios sintéticos en autoclave durante 15 min a 121 °C. Durante el transcurso de las fermentaciones en Erlenmeyers se realizó un muestreo con el objetivo de cuantificar las concentraciones de fuente de carbono, nitrógeno, biomasa y PHB.

A.5.2. Fermentaciones en biorreactor

En este estudio fueron usados dos biorreactores. El primero fue un Lab Fermenter (Bioengineering, Suiza) de 3,7 litros de capacidad, el cual se operó con un volumen de trabajo de 1,6 L (Figura A.1). Este equipo se encuentra en los Laboratorios de Fermentaciones de la Planta Piloto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. El otro equipo fue un Lab Fermenter (New Brunswick Scientific Co., INC, NJ) de 3,5 litros de capacidad, el cual se operó con volúmenes de operación entre 1 y 2.5 L. Este segundo equipo se encuentra en el Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology en el Department of Food Science and Technology de la Agricultural University of Athens.

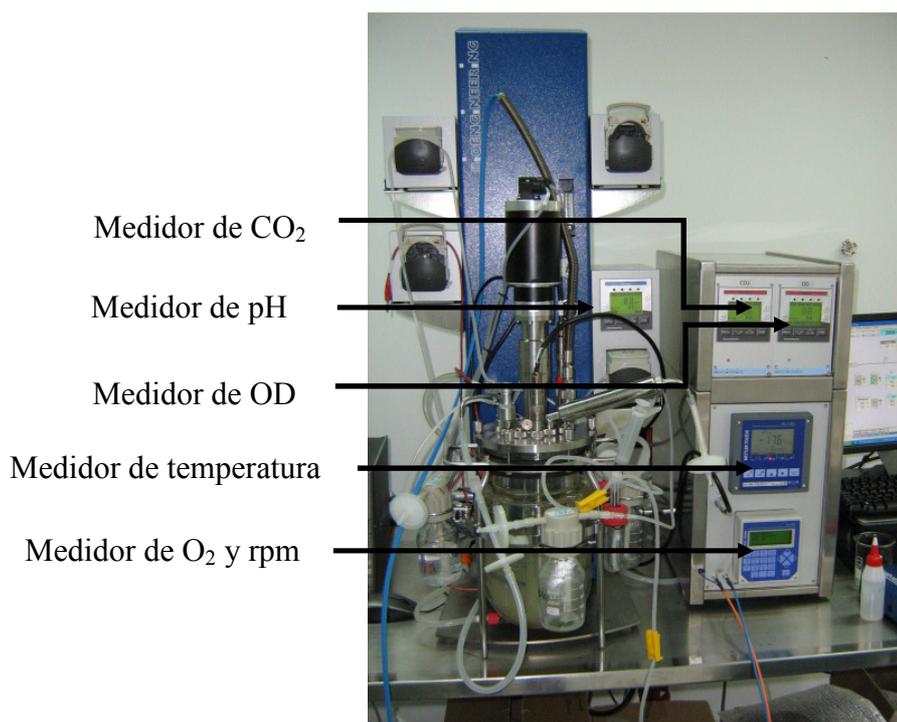


Figura A.1. Biorreactor (Bioengineering, Suiza) usado en una de las etapas de esta tesis

Anexo A: Materiales y métodos

Cada vaso de biorreactor fue esterilizado durante 20 min a 121 °C. El pH fue ajustado y mantenido en el valor deseado en cada fermentación usando NaOH 1 N y HCl 1 N. La concentración de oxígeno disuelto en todas las fermentaciones desarrolladas fue mantenida por encima del 20 % del nivel de saturación mediante la velocidad de agitación y el ajuste automático de la velocidad de aireación. Todos los electrodos fueron propiamente calibrados antes de cada esterilización, y la temperatura de operación fue mantenida constante durante cada fermentación en el valor requeridos por cada microorganismo.

Luego de la esterilización, el vaso y las soluciones controladoras de pH fueron enfriados naturalmente en un lapso de 1h. Una vez que se alcanzó la temperatura de operación, el medio de cultivo es introducido asépticamente en el biorreactor y finalmente es adicionado el inóculo que contiene las células en medio nutritivo. En todos los casos, este inóculo representó el 10 % del volumen de trabajo del biorreactor.

A.5.3. Muestreo

Durante el transcurso de cada fermentación, tanto en Erlenmeyers como en biorreactor, fueron tomadas entre 3 y 10 muestras por día. Antes de procesarlas, todas las muestras fueron observadas en un microscopio óptico (Olympus) y luego centrifugadas por 8 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante fue recolectado, en cada caso, para el análisis químico de la concentración de fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, mientras que el sólido fue usado para la determinación del peso seco y la cuantificación del PHB.

A.6. Extracción de los PHAs obtenidos por fermentación

Para la extracción de los PHAs, las células fueron recolectadas por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min y luego liofilizadas. Se emplearon tres métodos de extracción propuestos en la literatura.

A.6.1. Digestión + extracción en Soxhlet

Las células liofilizadas fueron tratadas con una solución de hipoclorito de sodio (16 %, v/v en agua) por 12 h a 37 °C, con el objetivo de romper la pared celular y liberar el biopolímero contenido en el citoplasma microbiano. Posteriormente, esta mezcla fue centrifugada a 10.000 rpm y el residuo fue lavado dos veces con agua destilada, acetona, etanol y dietil éter (Manna y col., 1999; Ramsay y col., 1994; Valappil y col., 2007). Finalmente, el residuo fue secado y sujeto a extracción con Soxhlet por 24 h usando cloroformo como solvente. Al terminar el proceso de extracción con Soxhlet, la solución de cloroformo que contiene el PHB fue concentrada por evaporación y el PHB fue precipitado usando metanol frío. El precipitado fue centrifugado y secado a temperatura ambiente en una estufa con vacío.

A.6.2. Dispersión–extracción con cloroformo e hipoclorito de sodio

En esta etapa se empleó el método reportado por Hahn (1994; 1993). En este método se utilizaron 30 mL de cloroformo y 30 mL de hipoclorito de sodio (30 %, v/v en agua) por gramo de biomasa liofilizada. La mezcla obtenida es tratada a 30 °C durante 90 min en un agitador orbital a 150 rpm y luego centrifugada a 10.000 rpm durante 10 min, produciéndose tres fases separadas. La fase superior contiene hipoclorito de sodio, la fase intermedia contiene todo el material celular (no biopolímero) y las células que no fueron

rotas, y la fase inferior corresponde a la solución de PHA en cloroformo. La fase superior puede ser cuidadosamente extraída con una pipeta y posteriormente la solución de PHA en cloroformo obtenida por filtración. El PHA es recuperado de la solución por precipitación usando 10 volúmenes de metanol frío.

A.6.3. Extracción con Soxhlet

Las células liofilizadas fueron colocadas directamente en un equipo Soxhlet usando cloroformo como solvente y extraídas durante 48 h. La solución final de PHA en cloroformo fue concentrada por evaporación y el PHA precipitado usando metanol frío. Posteriormente, este precipitado fue secado en una estufa de vacío a temperatura ambiente.

A.7. Métodos analíticos

A.7.1. Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad fue determinado tanto en el topinambur como en la torta de canola. Aproximadamente un gramo de cada materia prima fue secada a 95 °C durante 6 horas en crisoles cerámicos previamente pesados. Para cada muestra se realizaron entre tres y cinco determinaciones. El contenido de humedad fue expresado como gramos de agua por gramos de materia prima tratada (Ecuación 4.1)

$$W = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\% \quad (\text{A.1})$$

Donde W : Contenido de humedad (%)

m_1 : Peso del crisol (g)

Anexo A: Materiales y métodos

m_2 : Peso del crisol con la materia prima húmeda (g)

m_3 : Peso del crisol con la materia prima seca (g)

A.7.2. Determinación del contenido de cenizas

El contenido de cenizas en las harinas de topinambur y de canola liofilizadas fue obtenido luego de la degradación de la materia orgánica en una mufla a 600 °C durante 4 horas. Los cálculos fueron realizados mediante la Ecuación 4.2:

$$C = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100\% \quad (\text{A.2})$$

Donde C : Contenido de cenizas (%)

m_1 : Peso de del crisol (g)

m_2 : Peso del crisol con la materia prima seca (g)

m_3 : Peso del crisol con cenizas después de 4 h a 600 °C (g)

A.7.3. Concentración de fuentes de carbono

La concentración de fructosa, glucosa, sacarosa y glicerol fueron analizadas con un cromatógrafo en fase líquida (HPLC, Waters 600E) equipado con una columna Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm, Bio Rad, CA) y con un detector de índice de refracción diferencial (RI Waters 410) y un detector UV (Waters 486). Las condiciones de operación fueron: 40 µL de volumen de muestra; 0,005 M H₂SO₄ de fase móvil; 0,6 mL/min de velocidad de flujo y 65 °C de temperatura de columna. Antes de cada inyección, las muestras fueron diluidas a una concentración apropiada con agua deionizada y

Anexo A: Materiales y métodos

posteriormente filtradas a través de una membrana de 0,45 μm de diámetro de poro. Las concentraciones de las diferentes fuentes de carbono fueron calculadas independientemente en base a las curvas de calibración elaboradas para cada componente puro. A continuación en la Tabla A.1 se muestran las correlaciones usadas para cada fuente de carbono y sus respectivas desviaciones.

Tabla A.1 Correlaciones para el cálculo de las diferentes concentraciones de fuentes de carbono usadas por HPLC, y sus respectivas desviaciones

Fuente de carbono	Concentración (g/L)	Desviación (R^2)
Fructosa	$4 \cdot 10^{-6} \times \text{Área} - 0,068$	0,999
Glucosa	$4 \cdot 10^{-6} \times \text{Área} + 0,0375$	0,989
Sacarosa	$3 \cdot 10^{-6} \times \text{Área} - 0,099$	0,999
Glicerol	$4 \cdot 10^{-6} \times \text{Área} + 0,0854$	0,997

A.7.4. Concentración de azúcares totales e inulina

Los azúcares totales fueron determinados a partir de una variación del método colorimétrico del ácido fenol-sulfúrico propuesto por Mullin y col., (1994). Tres muestras de topinambur previamente pesadas fueron ajustadas para obtener una lectura de entre 0,2 y 0,4 unidades arbitrarias. Para ello fue preparada una solución con 200 mg de topinambur liofilizado en 100 mL de agua destilada. El contenido de azúcar fue medido en esta solución y calculado posteriormente para la cantidad de muestra usada. 20 μL de esta solución fueron mezclados con 3,9 mL de H_2O y posteriormente fueron adicionados 10 mL de H_2SO_4 , e inmediatamente mezclados en un vortex. La solución fue enfriada en agua fría durante 2 min y mantenida a temperatura ambiente. Posteriormente fueron agregados 100 μL de una solución de fenol al 50 % y esta solución fue mezclada y llevada a un baño

Anexo A: Materiales y métodos

térmico a 23 °C durante 30 min. Finalmente se midió la absorbancia a 580 nm entre 30 y 60 minutos después de agregado el fenol. Para cuantificar la concentración se realizó una curva de calibración empleando inulina pura como estándar (Figura A.2).

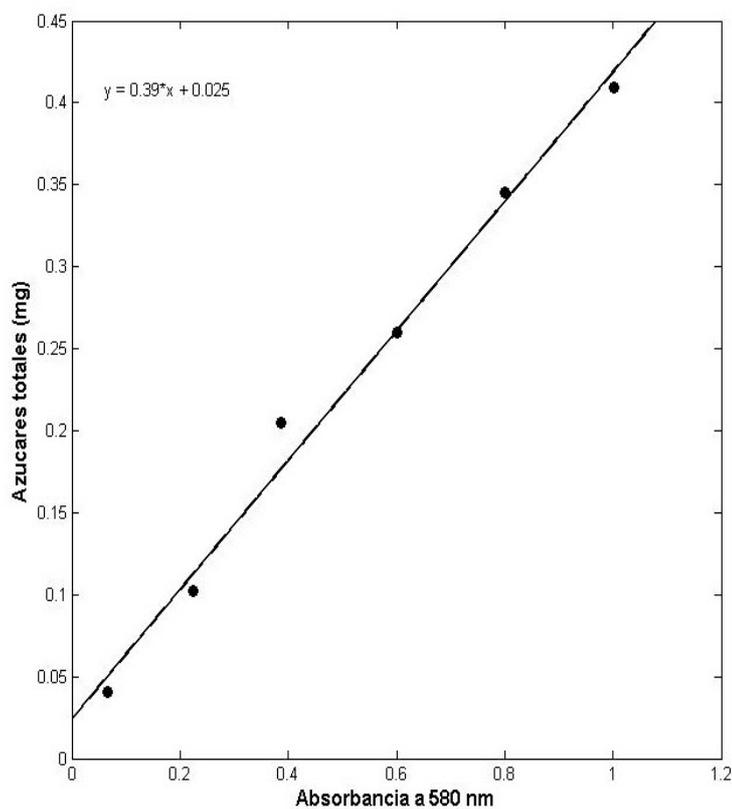


Figura A.2. Curva de calibración para el cálculo de los azúcares totales usando inulina como estándar

La concentración de inulina en la harina de topinambur liofilizada fue calculada como la diferencia entre los azúcares totales y los azúcares reductores calculados a partir de HPLC.

A.7.5. Concentración de aminoácidos libres (FAN)

La acción hidrolítica de las proteasas producidas por los hongos filamentosos tiende a la degradación enzimática de las proteínas presentes en el topinambur y en la harina de canola, lo cual produce aminoácidos, amonio y α -amino nitrógeno a partir de péptidos y proteínas. El método analítico empleado para el cálculo de los aminoácidos libres (FAN) fue el método colorimétrico propuesto por la European Brewery Convention en 1987 (Lie, 1973). Las soluciones empleadas en este método son descriptas a continuación.

Reactivo de color: esta solución consiste de 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g ninhidrina, 3 g fructosa y 60 g KH_2PO_4 , los cuales son disueltos en 1 L de agua destilada. Durante la preparación de este reactivo el pH de la solución debe ser mantenido entre 6,6 y 6,8. Por lo tanto, el pH tiene que ser controlado cuando se adiciona el fosfato a la solución. Este reactivo debe almacenarse a 4 °C.

Reactivo de dilución: primero se debe preparar una solución de 2 g yodato de potasio (KIO_3) en 616 mL de agua destilada. Posteriormente, se deben adicionar 384 mL de etanol y, finalmente, debe completarse hasta un litro con la adición de agua destilada.

El procedimiento para el cálculo del FAN se detalla a continuación. Las muestras son inicialmente centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min. con el objetivo de recolectar el sobrenadante el cual es usado para calcular la concentración de FAN. 2 mL de muestra diluida son transferidos a tres tubos de ensayo con tapa rosca (160 × 16 mm; Fisons). Para el análisis de cada muestra también fueron preparados un estándar y un blanco. El estándar es una solución de concentración conocida de glicina, mientras que el blanco es directamente preparado con 2 mL de agua destilada. 1 mL de reactivo de color es transferido a cada tubo de ensayo, los mismos son completamente sellados para evitar evaporación, y colocados durante 16 min en un baño a 100 °C. Luego los tubos son

Anexo A: Materiales y métodos

retirados del baño caliente y colocados durante 20 min. en otro baño a 20 °C. Transcurrido este tiempo son adicionados 5 mL de reactivo de dilución en cada tubo. Finalmente se mide la absorbancia a 570 nm por comparación con el blanco. Es altamente recomendable que, para medidas mayores a 1,5, se haga una mayor dilución de la muestra con el objetivo de lograr medidas en el rango de calibración realizado. La siguiente ecuación fue la usada para el cálculo del FAN a partir de las medidas anteriores:

$$FAN = \frac{A_{570} \times D \times C}{A_{S,570}} \quad (A.3)$$

Donde: FAN: Concentración de aminoácidos libres (mg/L)

A_{570} : Absorbancia de la muestra a 570 nm

D: Factor de dilución de la muestra

C: Concentración de glicina en la solución estándar (mg/L)

$A_{S,570}$: Absorbancia de la solución estándar a 570 nm

A.7.6. Concentración de fósforo

El contenido de fósforo de las muestras líquidas fue medido empleando el método reportado por Herbert y col., (1971). Este método está basado en la oxidación del fósforo orgánico combinado para producir fosfatos. Bajo condiciones controladas es producido el complejo fosfomolibdato por la reacción entre molibdato de amonio y los compuestos fosforados presentes en la muestra líquida. La muestra final tiene un color azul y su absorbancia es medida espectrofotométricamente a 730 nm.

Anexo A: Materiales y métodos

A una alícuota de 0,1 mL de muestra se le adicionan 4,9 mL de agua destilada en un tubo de ensayo con tapa a rosca. Posteriormente se agregan 0,4 mL de una solución de ácido perclórico al 60 % (v/v) para formar una solución, la cual debe agitarse vigorosamente en un vortex durante 20 segundos.

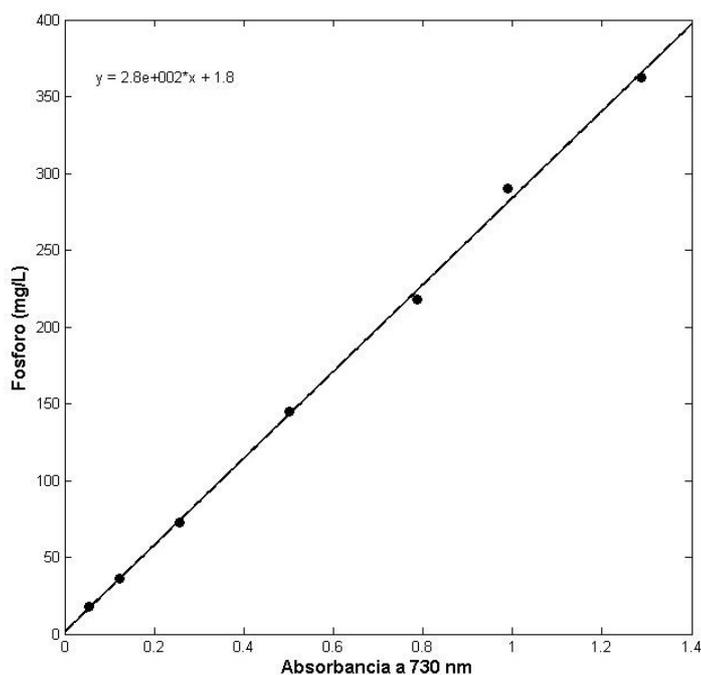


Figura A.3. Curva de calibración para el cálculo de la concentración de fósforo en las muestras líquidas

Después de esta agitación, se deben agregar 0,4 mL de una solución recién preparada de ácido L-ascórbico (1 %, v/v) y la mezcla se agita nuevamente por otros 20 segundos. Finalmente, a cada tubo se le agrega 0,4 mL de molibdato de amonio al 5 % (p/v) y los tubos se agitan nuevamente en el vortex. Una vez finalizada la agitación, los tubos se dejan en reposo por 10 min. para medir la absorbancia de las muestras a 730 nm usando agua como blanco. La concentración de fósforo en cada muestra fue calculada de acuerdo a la curva de calibración mostrada en la Figura A.3.

A.7.7. Concentración de biomasa celular

El peso seco fue medido por centrifugación de las muestras a 13.000 rpm durante 10 min. y posterior secado a 70 °C hasta peso constante. Además, para cada microorganismo se realizó una curva de calibración entre densidad óptica a 600 nm en función del peso seco con el objetivo de tener medidas rápidas de la concentración de biomasa.

A.7.8. Concentración de P(3HB) y P(3HB-co-3HV)

Luego de la medida del peso celular seco los sólidos fueron usados para la determinación de su contenido de biopolímero. El método empleado es el reportado por Riis y Mai (1988), el cual se basa en el análisis por cromatografía gaseosa del éster del ácido hidroxibutírico producido luego de la hidrólisis del PHB con ácido clorhídrico y posterior esterificación del ácido con propanol. En este método se empleó 1,2-dicloroetano como solvente. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

Las botellas universales usadas para la determinación del peso seco fueron también empleadas para la determinación del PHB. En esta botella se adicionan 2 mL de 1,2-dicloroetano y 2 mL de propanol acidificado (1 volumen de HCl concentrado + 4 volúmenes de propanol) y la mezcla se coloca durante 2 h en un baño termostático a 100 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se adicionan 4 mL de agua destilada y la mezcla se agita durante 2 min. La fase pesada es usada para la determinación de los PHAs mediante cromatografía gaseosa. A continuación se presentan las curvas de calibración empleadas para la determinación de la concentración de PHB y PHV a partir de las aéreas obtenidas por cromatografía gaseosa (Figura A.4).

Anexo A: Materiales y métodos

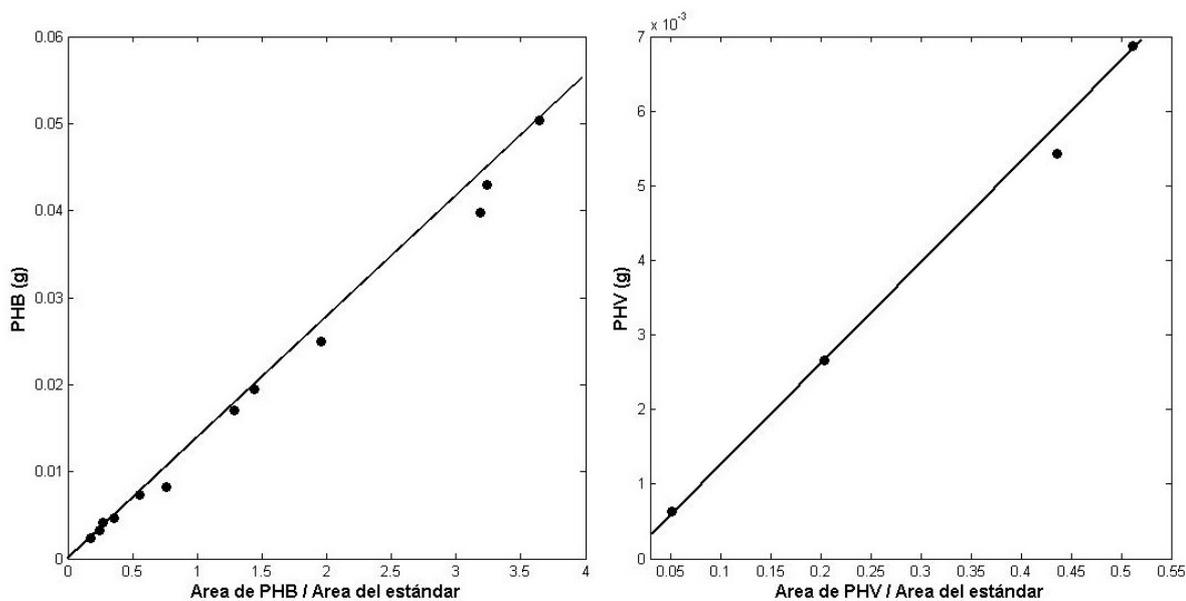


Figura A.4. Curvas de calibración para el cálculo del contenido de P(3HB) y P(3HV) a partir de cromatografía gaseosa. Correlaciones: $\text{PHB (g)} = 0,013 X - 2,9 \cdot 10^{-5}$ y

$$\text{PHV (g)} = 0,013 X - 6,4 \cdot 10^{-5}$$

El cromatógrafo de gases empleado fue un Hewlett Packard 5890 (Series II) dotado con el software Chemistation versión 6.03. La columna usada fue una PORAPLOT Q-HT (10×0.32 mm) con helio como gas carrier. La temperatura de inyección fue 230 °C, 200 °C para el detector y una temperatura inicial de 120 °C. En el tiempo inicial, la temperatura fue 120 °C, ésta fue incrementada hasta 230 °C en los primeros tres minutos y luego se mantuvo constante hasta el final del análisis.

A.7.9. Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los diferentes PHAs producidos fueron disueltos en cloroformo y luego depositados sobre una ventana de NaCl. Los espectros fueron obtenidos, luego de una total evaporación

Anexo A: Materiales y métodos

del solvente, en el rango de 4.000 a 400 cm^{-1} en un espectrómetro *NICOLET FTIR 520*. Se realizaron 20 barridos por muestra con una resolución de 2 cm^{-1} .

A.7.10. Resonancia magnética nuclear (NMR)

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron tomados a 400 MHz (^1H -NMR) y 125 MHz (^{13}C -NMR) usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como solvente. Aproximadamente 10 mg de muestra de biopolímero y 1 mL de solvente fueron usados para cada análisis. El equipo empleado fue un espectrómetro *BRUCKER 400*.

A.7.11. Cromatografía por exclusión de tamaños (SEC)

La distribución de masas molares y las masas molares promedio de los PHAs obtenidos fueron determinadas por cromatografía por exclusión de tamaños con un sistema constituido por una bomba Waters 515 HPLC y un detector refractométrico diferencial modelo Waters 410, equipado con tres columnas Phenogel 5 μm Linear(2) y una pre-columna de 5 μm (Pehnomenex). El solvente empleado fue cloroformo a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección por muestra fue de 200 μL y se emplearon estándares de poliestireno para la calibración. Las constantes de calibración de Mark-Houwink que utilizadas fueron: $K_{\text{PS}} = 4,9 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}$, $\alpha_{\text{PS}} = 0,794$ para el PS y $K_{\text{PHB}} = 11,8 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}$, $\alpha_{\text{PHB}} = 0,78$ para el PHB.

A.7.12. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de los PHAs producidos fueron medidas por calorimetría diferencial de barrido empleando un calorímetro diferencial *PERKIN-ELMER PYRIS 1*, calibrado con indio y n-heptano como estándares. Para cada análisis, se usaron

Anexo A: Materiales y métodos

aproximadamente 10 mg de muestra de biopolímero. Las muestras fueron calentadas desde 25 °C hasta 190 °C, posteriormente enfriadas hasta 25 °C y calentadas nuevamente hasta 190 °C a una velocidad de 10 °C/min.

A.7.13. Análisis termogravimétrico (TGA)

El rango de temperatura de degradación de los diferentes PHAs fue estudiado mediante análisis termogravimétrico (TGA, *PERKIN ELMER II*). Las muestras fueron calentadas en atmósfera de nitrógeno desde temperatura ambiente hasta 900 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

A.8. Referencias

- Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S., Chang, H.N., 1994. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 256-261.
- Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S., Lee, K.M., Chang, H.N., 1993. The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology Techniques*, 7, 209-212.
- Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.D., 1971. Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods in microbiology*, Norris, J.R., Ribbons, D.W. Eds. Vol. 5 B, New York: Academic Press.
- Lie, S., 1973. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79, 37-41.

Anexo A: Materiales y métodos

- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., Fan, Z., 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*, 79, 1087-1093.
- Manna, A., Banerjee, R., Paul, A.K., 1999. Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. *Current Microbiology*, 39, 153-158.
- Mullin, W.J., Modler, H.W., Farnworth, E.R., Payne, A., 1994. The macronutrient content of fractions from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). *Food Chemistry*, 51, 263-269.
- Ramsay, J.A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C., Ramsay, B.A., 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, 8, 589-594.
- Riis, V., Mai, W., 1988. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography A*, 445, 285-289.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T., Bucke, C., Roy, I., 2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132, 251-258.