



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE POLI(HIDROXIALCANOATO)S (PHA)S A PARTIR DE
FUENTES RENOVABLES DE BAJO COSTO**

MAURICIO ARIEL PORRAS

BAHÍA BLANCA


ARGENTINA

2016

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, 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 Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre Septiembre de 2011 y Noviembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. María Amelia Cubitto y el Dr. Marcelo Armando Villar.

Lic. Porras Mauricio Ariel

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de(.....)</p>
--	---

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director

Agradecimientos

A CONICET por el otorgamiento de las becas y el apoyo financiero, y al departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y a la Universidad Nacional del Sur por haberme formado y permitido desarrollarme en esta carrera,

A todo el personal de PLAPIQUI, que me recibió en el instituto como si fuera mi casa,

A Lore y a Beni, la mujer y el hombre que más amo en el mundo,

A José, Olga, Marian y Eri, mi familia querida,

A Mari y Luchiano, la familia de mi mujer y mi otra familia querida,

A mis directores, el doctor Marcelo Villar y la doctora María Amelia Cubito, por haberme ayudado a transitar el arduo camino de esta tesis,

A mis amigos, que siempre están cerca,

A los amigos y compañeros del grupo de polímeros y del grupo de microbiología industrial y de los alimentos, por compartir tantos momentos agradables,

A Lore, Beni y Pupé

Resumen

Los plásticos se han convertido en el material de mayor y amplio uso en un corto lapso de tiempo. En este sentido, la dependencia de los plásticos derivados del petróleo ha aumentado progresivamente en los últimos años y es una de las causas del problema de la excesiva acumulación de residuos. Los efectos ambientales dañinos provocados por estos plásticos sintéticos han generado un gran interés en el uso y aplicaciones de biopolímeros. Sin embargo, los polímeros de origen biológico representan en la actualidad sólo una pequeña fracción del mercado total mundial de plásticos (menos del 1% del total) y el principal motivo es su alto costo de producción.

Los poli(hidroxialcanoato)s (PHAs) son una familia de biopoliésteres de origen natural sintetizados por diversos microorganismos. Las características de los PHAs pueden dar lugar a diversas propiedades adaptables a diferentes aplicaciones industriales que van desde materiales de embalaje biodegradables hasta diversos productos médicos. Esto los convierte en candidatos prometedores de interés industrial y con valor ambiental, ya que además de su diversidad química son biodegradables, piezoeléctricos, biocompatibles, además de ser fabricados a partir de fuentes de carbono renovables. Varios factores influyen en la producción de PHAs, tales como la especie de microorganismo, la duración de la fermentación, la tasa de crecimiento, la naturaleza y concentración de la fuente de carbono. Entre estos, el factor de mayor influencia en el costo de producción es la fuente de carbono.

El objetivo de esta tesis fue estudiar y optimizar la producción de PHAs a partir de sustratos de bajo costo y cepas bacterianas aisladas de ambientes costeros de la región de Bahía Blanca. Conjuntamente se propuso desarrollar metodologías rápidas y confiables para evaluar la producción de estos biopolímeros. Con este fin se realizaron aislamientos de cepas bacterianas productoras de PHA de sedimentos del estuario de

Bahía Blanca. Por screening cualitativos se determinó la presencia del biopolímero empleando técnicas clásicas de tinción de gránulos internos de PHA. Alternativamente se utilizó una técnica espectroscópica (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)) para la detección de la presencia e intensidad de picos característicos del PHA en muestras de las cepas aisladas. A partir de este screening se seleccionó la mejor cepa productora de PHA. La cepa seleccionada fue identificada como *Bacillus megaterium* BBST4, la cual fue aislada de sedimentos de Estuario de Bahía blanca, durante un estudio previo llevado a cabo en nuestros laboratorios. Para realizar los ensayos de optimización fueron seleccionados dos sustratos (glicerol y almidón) teniendo en cuenta el rendimiento en la producción de PHA demostrado por *B. megaterium* BBST4, y en relación a los costos del medio de cultivo y la fuente de carbono. Como fuente de nitrógeno se seleccionó la urea y un medio de cultivo salino mínimo. Para la optimización de la producción de PHAs a partir de glicerol como fuente de carbono se analizó la influencia de distintas variables en la producción de este biopolímero. A partir del almidón como fuente de carbono se desarrolló la técnica de diseño experimental por medio de una superficie de respuesta (RSM) como herramienta estadística robusta. Para las dos condiciones determinadas por RSM donde se obtuvo la máxima producción de biopolímero, en relación al rendimiento de PHA en cantidad y en economía (menor costo de producción), se desarrolló un modelado matemático de la cinética de producción de estos biopolímeros. Se probaron distintas técnicas de extracción de PHAs a partir de cloroformo como principal solvente de extracción. La técnica de extracción que presentó los mejores resultados fue optimizada y empleada para obtener los PHAs producidos por la cepa estudiada a partir de las dos fuentes de carbono seleccionadas, y a partir de una tercera fuente de carbono para cotejar diferencias entre sí. Estos PHAs fueron caracterizados por FTIR, Resonancia magnética

nuclear de una dimensión ($^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$) y dos dimensiones (HSQC), Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Cromatografía por exclusión de tamaños (SEC o GPC). Los resultados de caracterización mostraron que los PHAs producido por *B. megaterium* BBST4 a partir de las tres fuentes de carbono presentan aproximadamente un 89,3 mol% de 3HB, un 5,6 mol% de 3HV y un 5,2 mol% de monómeros de mcl-HA, probablemente con extensión interna de la cadena. En nuestro conocimiento, este representa el primer reporte de producción de copolímeros empleando una cepa del genero *Bacillus* a partir de distintas fuentes de carbono renovables. Finalmente se desarrolló una nueva técnica para la determinación del PHA extraíble a partir de células liofilizadas y FTIR. Esta técnica disminuye notablemente los tiempos de determinación, lo que permite una importante reducción en el tiempo de toma de decisiones a la hora de definir cuantitativamente el/los momentos de óptima producción de PHA para realizar la extracción.

Los aportes de esta tesis permiten visualizar un esquema general del proceso de obtención y optimización de la producción de PHAs. Por lo que representan un punto de inicio para el estudio de la biosíntesis de PHAs a partir de sistemas biotecnológicos con diferentes alternativas para la optimización en la detección y cuantificación de estos biopolímeros.

Abstract

In a short time plastics have become the material most widely used. In this sense, the dependence on petroleum-based plastics has progressively increased in recent years and is one of the causes of the problem of excessive accumulation of waste. The harmful environmental effects caused by these synthetic plastics have generated great interest in the use and applications of biopolymers. However, polymers of biological origin now represent only a small fraction of the total world market for plastic (less than 1% of the total) and the main reason is the high cost of production.

Poly(hydroxyalkanoate)s (PHAs) are a family of naturally occurring biopolyesters synthesized by various microorganisms. PHAs characteristics may lead to various properties adaptable to different industrial applications ranging from biodegradable packaging materials to various medical products. This wide range of applications makes them in promising candidates with industrial interest and environmental value. Besides their chemical diversity, they are biodegradable, piezoelectric, biocompatible, in addition to being produced from renewable carbon sources. Several factors influence the production of PHAs, such as the species of microorganism, fermentation time, growth rate, the nature and concentration of the carbon source. Among these, the carbon source is the most influential factor in the cost of production.

The aim of this thesis was to study and optimize the production of PHAs from inexpensive substrates and bacterial strains isolated from coastal environments from Bahia Blanca region. In addition, studies were done for the development of fast and reliable methodologies for assessing the production of these biopolymers. For this purpose, PHA producing bacterial strains were isolated from sediments of Bahía Blanca Estuary. The presence of the internal PHA granules was determined using qualitative screening with conventional staining techniques for these biopolymers. Alternatively, a

spectroscopic technique (infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR)) was used for detecting the presence and intensity of characteristic peaks of PHA in the samples of isolated strains. From this screening, the best PHA producing strain was selected. The selected strain was identified as *Bacillus megaterium* BBT4, which was isolated in a previous study carried out in our laboratories. To perform the optimization trials were selected two substrates (glycerol and starch) considering the yield of PHA production demonstrated by *B. megaterium* BBST4, and the costs related to the culture medium and carbon source. The urea was selected as nitrogen source and a defined minimum salt medium as culture medium. For the optimization of PHA production from glycerol as sole carbon source, the influence of several variables in the production of this biopolymer was analyzed. From starch as carbon source experimental design technique was developed by a response surface methodology (RSM) as robust statistical tool. For the conditions determined by RSM, where maximum biopolymer production in relation to the performance of PHA in quantity and economics (lower production costs) was obtained, a mathematical modeling of the kinetics of production of these biopolymers was developed. Different techniques for PHA extraction were tested using chloroform as principal solvent extraction. The extraction technique that exhibit the best results was optimized and used to obtain the PHAs produced by the strain from the two carbon sources previously selected, and from a third carbon source employed to collate differences between them. These PHAs were characterized by FTIR, nuclear magnetic resonance of one dimension ($^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$) and two dimension (HSQC), differential scanning calorimetry (DSC) and size exclusion chromatography (SEC or GPC). The characterization results showed that PHAs produced by *B. megaterium* BBST4 from the three carbon sources show approximately 89.3 mol% of 3HB, 5.6 mol% of 3HV and 5.2 mol% of mcl-HA monomers, probably with internal chain

extension. To our knowledge, this represents the first report of copolymers production using a strain of *Bacillus* spp. from different renewable carbon sources. Finally it developed a new technique for determining the removable PHA using lyophilized cells and FTIR. This technique significantly reduces the time of determination, allowing a significant reduction in time of making decision when it comes to define quantitatively the moment/s of optimum PHA production to perform the extraction.

The contributions of this thesis allow visualizing an overview of the process of obtaining and optimization of the PHAs production. Therefore they represent a starting point for the study of the biosynthesis of PHAs from biotechnological systems with different alternatives for optimizing the detection and quantification of these biopolymers.

INDICE

CAPITULO 1. Introducción.	1
1.1. LOS BIOPOLÍMEROS EN GENERAL Y LOS POLI(β-HIDROXIALCANOATO)S EN PARTICULAR	1
1.1.1. Polímeros y biopolímeros.	1
1.1.2. Historia de los PHAs.	3
1.1.3. Estructura de los PHAs.	5
1.1.4. Propiedades de los PHAs.	7
1.2. BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs	8
1.2.1. Bacterias Gram-negativas.	8
1.2.2. Bacterias Gram-positivas.	9
1.2.3. Las bacterias del género <i>Bacillus</i> .	11
1.3. METODOLOGÍAS DE OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs	11
1.4. CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN INTRACELULAR DE PHAs	12
1.5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE PHAs	14
1.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PHAs	16
1.6.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	16
1.6.2. Cromatografía por permeación de geles (GPC).	17
1.6.3. Resonancia Magnética Nuclear (NMR).	18
1.6.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	19
1.7. INVESTIGACIÓN SOBRE PHAs	21
1.8. OBJETIVOS	22
1.9. REFERENCIAS	23
CAPÍTULO 2. Bioconversión de glicerol a poli(β-hidroxialcanoato)s en un medio económico por una cepa de <i>Bacillus megaterium</i> aislada de sedimentos marinos.	34
2.1. INTRODUCCIÓN	34
2.1.1. El glicerol y la urea como fuentes económicas de carbono y nitrógeno, respectivamente, para la producción de PHAs.	34
2.1.2. Cuantificación de la producción de PHAs.	36
2.2. OBJETIVOS	37
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.3.1. Obtención de muestras para el aislamiento de cepas productoras de PHAs. Procesamiento y aislamiento.	37
2.3.2. Aislamiento y selección de cepas productoras de PHAs.	38
2.3.3. Selección de cepas productoras de PHAs mediante el análisis de espectros FTIR. Selección de la mejor cepa productora para los ensayos de optimización.	39
2.3.4. Optimización de la producción de PHA por una cepa de <i>B. megaterium</i> .	40
2.3.4.1. Selección de fuentes de nitrógeno y de carbono para la producción de PHAs.	40

2.3.4.2. Efecto de los distintos parámetros y nutrientes del medio de cultivo seleccionado sobre la producción de PHA.	43
2.3.5. Determinación de la producción de PHA.	46
2.4. RESULTADOS	46
2.4.1. Selección de cepas productoras de PHA a partir de glicerol.	46
2.4.2. Análisis del efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de PHA por la cepa <i>B. megaterium</i> BBST4.	47
2.5. DISCUSIÓN	51
2.6. CONCLUSIONES	55
2.7. REFERENCIAS	56
CAPITULO 3. Optimización de la producción de PHA por parte de la cepa <i>Bacillus megaterium</i> BBST4 utilizando almidón como fuente de carbono.	63
3.1 INTRODUCCIÓN	63
3.1.1 La cepa utilizada.	63
3.1.2 Superficie de respuesta con diseño central compuesto y deseabilidad.	63
3.1.3 Software estadístico: R.	64
3.1.4 Variables de optimización.	65
3.1.5 Modelado matemático.	65
3.2 OBJETIVOS	66
3.3 MATERIALES V MÉTODOS	67
3.3.1 Microorganismo y medio de cultivo.	67
3.3.2 Cultivo en Erlenmeyer.	68
3.3.3 Variables de optimización.	70
3.3.4 Esporulación.	72
3.3.5 Análisis estadístico.	72
3.3.6 Modelo propuesto para la producción de PHA por <i>Bacillus megaterium</i> BBST4	76
3.4 RESULTADOS	80
3.4.1 Variables de optimización.	80
3.4.2 Esporulación.	83
3.4.3 Análisis estadístico.	84
3.4.4 Modelado y estimación de parámetros	88
3.5 DISCUSIÓN	95
3.6 CONCLUSIONES	102
3.7 NOMENCLATURA	104
3.8 REFERENCIAS	105

CAPÍTULO 4. Extracción y caracterización de los PHAs producidos por la cepa <i>B. megaterium</i> BBST4 a partir de distintas fuentes de carbono	111
4.1 INTRODUCCIÓN	111
4.1.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).	112
4.1.2 Resonancia magnética nuclear (NMR).	112
4.1.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	112
4.1.4 Cromatografía de exclusión de tamaños o permeación de geles (GPC).	113
4.2 OBJETIVOS	113
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	114
4.3.1 PHAs producidos por la cepa <i>B. megaterium</i> BBST4 a partir de distintas fuentes de carbono.	114
4.3.2 Técnicas de extracción de PHAs empleando cloroformo	114
4.3.2.1 <i>Cloroformo en ebullición (CHCl₃-Sohxlet).</i>	115
4.3.2.2 <i>Hipoclorito y cloroformo en ebullición (CHCl₃-NaClO).</i>	116
4.3.2.3 <i>Dispersión de cloroformo e hipoclorito (Dispersión CHCl₃-NaClO).</i>	116
4.3.2.4 <i>Adaptación y puesta a punto de la técnica de mayor eficiencia.</i>	117
4.3.3 Propiedades físico-químicas de los biopolímeros y equipamiento utilizado para las técnicas de caracterización de PHAs.	117
4.3.3.1 <i>Espectroscopía de FTIR.</i>	118
4.3.3.2 <i>Resonancia magnética nuclear (¹H-NMR, ¹³C-NMR y HSQC).</i>	118
4.3.3.3 <i>Propiedades térmicas (DSC).</i>	119
4.3.3.4 <i>Masas moleculares (GPC).</i>	119
4.4 RESULTADOS	120
4.4.1 PHA obtenido con cada técnica de extracción.	120
4.4.2 Caracterización.	121
4.4.2.1 <i>Espectroscopía de FTIR.</i>	121
4.4.2.2 <i>Estructura molecular (¹H-NMR, ¹³C-NMR y HSQC).</i>	124
4.4.2.3 <i>Propiedades térmicas (DSC).</i>	129
4.4.2.4 <i>Masas moleculares (GPC).</i>	131
4.5 DISCUSIÓN	131
4.5.1 Técnicas de extracción.	131
4.5.2 Espectroscopia de FTIR.	132
4.5.3 Resonancia magnética nuclear (1H-NMR, 13C-NMR y HSQC).	133
4.5.4 Propiedades térmicas (DSC).	134
4.5.5 Masas moleculares (GPC).	136
4.6 CONCLUSIONES	136
4.7 REFERENCIAS	137

CAPÍTULO 5. Determinación del PHA extraíble a partir de células liofilizadas mediante FTIR y herramientas estadísticas.	142
5.1 INTRODUCCIÓN	142
5.1.1 Técnicas para la determinación de la producción celular de PHAs: Determinación directa por extracción química y determinación indirecta.	142
5.1.2 Determinación indirecta de la concentración de PHA por FTIR y métodos estadísticos.	143
5.2 OBJETIVOS	145
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS	145
5.3.1 Cepa, medio y tipo de cultivo utilizados (fermentaciones discontinuas o batch y estado sólido).	145
5.3.2 Métodos de cultivo.	146
5.3.2.1 Fermentaciones discontinuas o batch.	146
5.3.2.2 Fermentaciones en estado sólido.	148
5.3.3 Preparación de muestras y mediciones FTIR.	148
5.3.3.1 PHA y material de pre-extracción (MPE) como estándar de calibración	148
5.3.3.2 Espectros FTIR de transmisión empleando pastillas de KBr.	149
5.3.4 Herramientas de análisis estadístico.	150
5.3.4.1 Análisis Multivariado.	151
5.3.4.2 Análisis de regresión lineal simple (SLRA).	154
5.4 RESULTADOS	156
5.4.1 Análisis estadístico para la determinación de la producción de PHA.	157
5.4.2 PCA: Correlación entre PHA y MPE.	158
5.4.3 Cuantificación de PHA en células liofilizadas.	161
5.4.3.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR1). Calibración con muestras de MPE (Tt1) y muestras de células liofilizadas (Tt2). Predicciones.	161
5.4.3.2 Análisis de regresión. Funciones determinadas por SLRA.	163
5.5 DISCUSIÓN	165
5.6 CONCLUSIONES	168
5.7 REFERENCIAS	169
CAPITULO 6. Conclusiones generales y trabajo futuro.	173
6.1 CONCLUSIONES GENERALES	173
6.2 TRABAJO FUTURO	174
ANEXO A	176
A.1 EL SOFTWARE ESTADÍSTICO	176
A.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS REALIZADOS EN R (Capítulo 3)	183
A.3 REFERENCIAS	184

ANEXO B	186
B.1 MEDIOS DE CULTIVO	186
B.2 MÉTODOS DE TINCIÓN	187
B.3 DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN DISUELTO	192
B.4 REFERENCIAS	193
PUBLICACIONES PRESENTADAS CON LA TESIS	195
Trabajos publicados en revistas internacionales	195
Presentaciones en eventos científicos	195

CAPÍTULO 1. Introducción

1.1. LOS BIOPOLÍMEROS EN GENERAL Y LOS POLI(β -HIDROXIALCANOATO)S EN PARTICULAR.

1.1.1. Polímeros y biopolímeros. La dependencia global de los plásticos derivados del petróleo ha aumentado considerablemente en los últimos años y causa, entre otros, un problema en la eliminación de los residuos (Avella et al., 2005). Un típico ejemplo de esta creciente dependencia lo constituye la producción y el uso de plásticos no biodegradables en el envasado de alimentos. Sin embargo, un posible agotamiento del petróleo y el creciente conocimiento sobre los efectos ambientales dañinos provocados por los plásticos sintéticos ha provocado gran interés en el uso y aplicaciones de los biopolímeros (Phillip y col., 2007; Babu y col., 2013). En la **Figura 1.1** se presenta una de las posibles clasificaciones de polímeros biodegradables que están siendo utilizados para el envasado de alimentos (modificado de Othman, 2014).

Los polímeros de origen biológico son materiales que se producen, entre otros, a partir de recursos renovables. Los polímeros de origen biológico y los polímeros biodegradables se utilizan ampliamente en la literatura, pero hay una diferencia fundamental entre estos dos tipos de polímeros. Los polímeros biodegradables se definen como materiales cuyas propiedades físicas y químicas experimentan un deterioro y se degradan completamente cuando se exponen a microorganismos. Los polímeros de origen biológico pueden ser biodegradables (por ejemplo, poli(hidroxiclcanoatos), PHA) o no degradables (por ejemplo, bio-polietileno). Del mismo modo, mientras que muchos polímeros de origen biológico son biodegradables (por ejemplo, almidón y PHA), no todos los polímeros biodegradables son de origen

biológico (por ejemplo, ácido poliláctico, PLA, y poli(ϵ -caprolactona), PCL) (Babu y col., 2013).

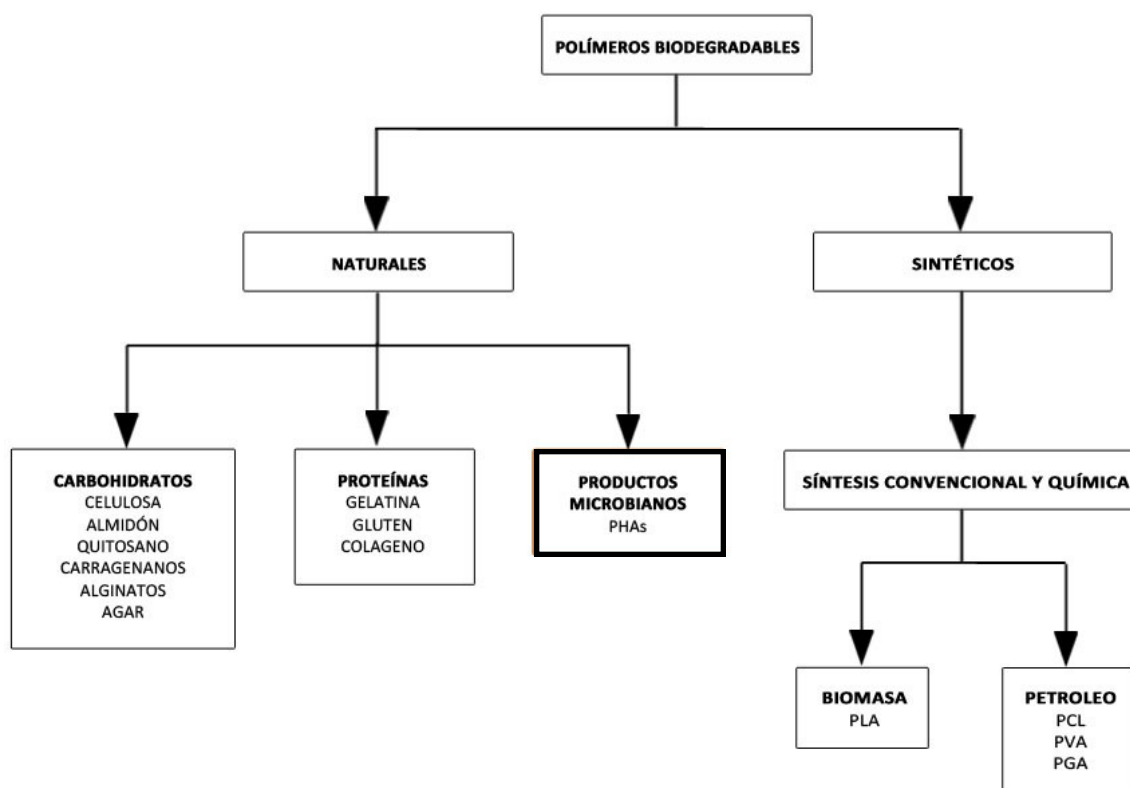


Figura 1.1. Clasificación de polímeros biodegradables (modificado de Othman, 2014).

Entre los biopolímeros existe una creciente atención por los polímeros de origen biológico debido a que se producen a partir de materia prima renovable y a que son amigables con el ambiente (Yates y Barlow, 2013). Por otra parte, la biotecnología moderna ha hecho posible manipular la producción de estos biopolímeros para satisfacer las necesidades humanas (Philip y col., 2007). Los biopolímeros ofrecen la doble ventaja de conservar los recursos fósiles y reducir las emisiones de CO₂, lo que los convierte en una importante materia prima para la innovación en el desarrollo sostenible. Por un lado, algunos polímeros biodegradables sintéticos (**Figura 1.1**) son obtenidos a partir de monómeros bio-derivados que se polimerizan a través de rutas

estándar (por ejemplo el poli(ácido láctico), PLA) y son obtenidos a través de una ruta de síntesis similar a la de los polímeros sintéticos como el poli(etilen tereftalato), PET. Por otro lado, los poliésteres de origen biológico, como los poli(β -hidroxialcanoato)s, PHAs, son polimerizados y acumulados de forma natural en determinados microorganismos como reserva de carbono y energía (Bugnicourt et al., 2014).

Sin embargo, los polímeros de origen biológico representan en la actualidad sólo una pequeña fracción del mercado total mundial de plásticos (menos del 1% del total). Al ritmo actual de crecimiento, se espera que los biopolímeros representarán poco más del 1 % de los polímeros del mercado en 2015 (Doug 2010).

1.1.2. Historia de los PHAs. En 1923, Lemoigne demostró que un bacilo aerobio formador de esporas generaba, en suspensiones anaeróbicas, ácido 3-hidroxiбутírico o hidroxibutirato (HB). Como resultado de sus investigaciones logró cuantificar la cantidad de HB producido por la cepa. En 1927, fue capaz de extraer una sustancia de la cepa utilizando cloroformo y demostró que el material era un polímero de HB (PHB) (Macrae y Wilkinson, 1958). Sin embargo, no fue hasta la década de 1960 que la producción de PHB se exploró a nivel comercial. Los pioneros en este campo fueron Bautista y Werber en WR Grace & Co. (EE.UU.) que consiguieron varias patentes para producir y aislar PHB. Comenzaron con el uso de este polímero en la fabricación de suturas y prótesis. Los bajos rendimientos del proceso, la contaminación del polímero con residuos bacterianos y los altos costos de extracción dieron fin a sus trabajos. La crisis del petróleo de la década de 1970 propició un impulso en la búsqueda de plásticos alternativos. Imperial Chemical Industries (ICI, Reino Unido) fue capaz de formular condiciones para lograr que una cepa de *Alcaligenes latus* produzca PHB hasta en un 70 % de su peso celular seco. El PHB obtenido era quebradizo y con altos costos

de producción, por lo que, después de la crisis del petróleo, el desarrollo del PHB como material de avanzada se detuvo temporalmente (Howells, 1982). Mientras tanto, ICI produjo un nuevo polímero (BIOPOL) un copolímero de 3-hidroxi-butirato y 3-hidroxi-valerato (PHBV). Este copolímero presentaba mejores propiedades que el PHB, tales como menor cristalinidad y mayor elasticidad (King, 1982). ICI se dividió en junio de 1993 y la rama Zeneca BioProducts de ICI comenzó a trabajar con BIOPOL. En abril de 1996 Zeneca vendió su tecnología BIOPOL a Monsanto. En 1998, Metabolix Inc. obtuvo la licencia de Monsanto (Braunegg, 2003) y ese mismo año, con la colaboración entre Metabolix Inc. y el Hospital de Niños de Boston, surge la empresa TEPHA Inc. TEPHA está desarrollando la tecnología de dispositivos médicos a partir de polímeros biodegradables incluyendo la bioingeniería de válvulas del corazón, suturas quirúrgicas, mallas y accesorios ortopédicos (Phillip y col., 2007).

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 (Biocycle™). 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) (López Jiménez, 2011).

En Canadá por su parte, la compañía 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 para ser empleados 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 su parte, la empresa Mitsubishi Gas Chemical (Japón) se ha especializado en la producción de PHB por medio de procesos fermentativos a partir de metanol como fuente de carbono (BioGreen™) (Kosior y col., 2006; López Jiménez, 2011).

Además de las empresas citadas anteriormente otras compañías fueron convirtiéndose en importantes proveedores de PHAs a nivel global (Tabla 1.1)

Tabla 1.1. Proveedores globales de diversos tipos de PHA (modificado de Babu y col., 2013)

Compañía	Localización	Marca	Producción/capacidad prevista (ktoneladas/año)
Bio-on	Italy	Minerv	10
Kaneka	Singapore		10 (al 2013)
Meredian	USA		13.5
Metabolix	USA	Mirel	50
Mitsubishi Gas Chemicals	Japan	Biogreen	0,05
PHB Industrial S.A.	Brazil	Biocycle	0,05
Shenzen O'Bioer	China		
TEPHA	USA	ThephaFLEX/ThephELAST	
Tianan Biological Materials	China	Enmat	2
Tianjin Green Biosciences	China	Green Bio	10
Tianjin Northern Food	China		
Yikeman Shandong	China		3

1.1.3. Estructura de los PHAs. Los PHAs son una familia de biopolíesteres de origen natural sintetizados por diversos microorganismos. Una molécula de PHA se compone generalmente de 600 a 35.000 unidades monoméricas de (R)-hidroxiácidos grasos (Khanna y Srivastava, 2005). Cada unidad de monómero alberga un grupo R, la cadena lateral, que es generalmente un grupo alquilo saturado (**Figura 1.2**), pero también puede tomar la forma de grupos alquilo insaturados, grupos alquilo ramificados, y grupos alquilo sustituidos aunque estas formas son menos comunes (Lu y col., 2009). Todas las unidades monoméricas de los PHAs son enantioméricamente puras y en la configuración R (Phillip y col., 2007).

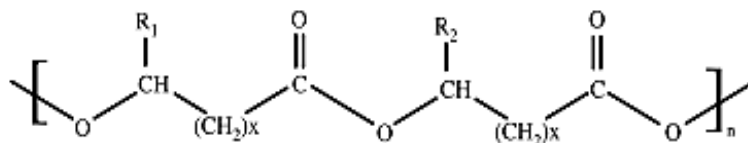


Figura 1.2. Estructura general de los PHAs. R1/R2 = grupos alquilo C1 a C14, x = 1–4, n = 100 a 30.000 (Phillip y col., 2007).

Dependiendo del número total de átomos de carbono del monómero los PHAs pueden ser clasificados como PHAs de longitud de cadena corta (scl-PHA; 3 a 5 átomos de carbono), PHAs de longitud de cadena media (mcl-PHA; 6 a 14 de carbono átomos), o PHAs de longitud de cadena larga (lcl-PHA; 15 o más átomos de carbono) (Khanna y Srivastava, 2005). Se han identificado en los PHAs cerca de 150 monómeros diferentes y este número sigue aumentando con la introducción de nuevos tipos de PHA mediante la modificación química o física de origen natural (Zinn y Hany, 2005), o mediante la creación de organismos genéticamente modificados (OGM) para producir PHAs con grupos funcionales específicos (Escapa y col., 2011). Estas características de los PHA dieron lugar a diversas propiedades que se pueden adaptar a diferentes aplicaciones que van desde materiales de embalaje biodegradables a productos médicos (Tan y col., 2014), entre otros. Esto los convierte en candidatos prometedores de interés industrial y con valor ambiental, ya que además de su diversidad química son biodegradables, piezoeléctricos, biocompatibles, además de ser fabricados a partir de fuentes de carbono renovables (Shah y col., 2008). Estas características hacen que los PHAs sean adecuados para diversas aplicaciones en la industria del embalaje, la agricultura, la industria alimenticia, como materias primas para productos químicos enantioméricamente puros y para la producción de pinturas (Anderson y Dawes, 1990; Sudesh y col., 2000; Misra y col., 2006; Papanephytou y Kyriakidis, 2012). Los PHAs también se consideran compuestos farmacéuticamente activos y actualmente se están investigando como potenciales fármacos anti-HIV, fármacos contra el cáncer, antibióticos, etc. (Tan y col., 2014). Los ácidos R-hidroxicanoicos producidos por la hidrólisis de los PHAs también pueden ser ampliamente utilizados como materiales quirales de partida en química fina y en las industrias farmacéutica y médica (Philip y col., 2007).

Varios factores influyen en la producción de PHAs, tales como el tipo de microorganismo, la duración de la fermentación, la tasa de crecimiento, la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, y las condiciones de estrés, especialmente la limitación de nitrógeno, fósforo u oxígeno (Shahid et al., 2013). Aunque los PHAs son biocompatibles y amigables con el medio ambiente, su costo de producción es mucho mayor que el de los plásticos sintéticos, lo que presenta la principal desventaja de los poli(hidroxialcanoato)s en los mercados globales (Dhangdhariya et al., 2015). En este sentido, en el análisis económico de la producción de PHAs, los costos de la fuente de carbono por sí sola representan aproximadamente el 50 % de los costos totales de la producción de PHAs. Con el fin de reducir los costos de producción, es esencial identificar microorganismos que utilicen fuentes de carbono más económicas y que sean eficientes para producir PHAs (Kim, 2000). La producción de diversos tipos de PHAs, sus propiedades y aplicaciones posteriores fueron revisadas recientemente por Philip y col. (2007), Olivera y col. (2010), Chen (2010) y Rai y col. (2011), entre otros.

1.1.4. Propiedades de los PHA. Dentro de los PHAs, el polímero más comunmente producido corresponde al PHA de cadena corta (scl-PHAs) compuesto por monómeros de ácido 3-hidroxibutírico (PHB), pero el PHB homopolímero es bastante rígido y cristalino, por lo que es más difícil de procesar y de ser utilizado comercialmente.

Por otro lado, los PHAs de cadena media (mcl-PHA), como el poli(hidroxioctanoato), poseen características similares a los elastómeros. Sin embargo, los copolímeros que contienen monómeros de cadena corta y cadena media poseen propiedades intermedias entre los homopolímeros de cadena corta (scl-PHA)s y de cadena media (mcl-PHA)s, dependiendo de la relación entre los distintos monómeros.

Por lo tanto la incorporación de unidades monoméricas de cadena media en la cadena principal mejora las propiedades del polímero obtenido, lo que los hace más adecuados para su aplicación a nivel comercial (Singh y Mallick, 2007). Si bien la síntesis de estos copolímeros es posible agregando al medio de cultivo fuentes de carbono específicas, la ecuación económica mejora mucho cuando la cepa incorpora naturalmente estos monómeros de cadena media a partir de fuentes de carbono de bajo costo como sustrato.

1.2. BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs

Existen diferentes formas de clasificar los grupos bacterianos, la más utilizada emplea las diferencias en estructura y composición de la pared celular (**Figura 1.3**) por medio de la tinción de Gram (1884) (**Apéndice B**). Mediante esta técnica se distinguen dos grandes grupos de bacterias: las bacterias Gram negativas y las bacterias Gram positivas. Entre los productores de PHA encontramos bacterias integrantes de ambos grupos.

1.2.1. Bacterias Gram-negativas. Dentro de las bacterias Gram negativas productoras de PHAs se destacan muchas bacterias halófilas y halotolerantes capaces de producir gran cantidad de PHA a partir de residuos (Shrivastav 2010; Van-Thuoc y col., 2012; Bera, 2015; Dhangdhariya et al., 2015). Varias de estas bacterias, principalmente del género *Cupriavidus*, son ampliamente empleadas en la producción de PHAs a nivel industrial debido a la alta capacidad de producción de scl-PHAs. Investigaciones recientes sobre el empleo de bacterias Gram-negativas en la producción de PHA a escala industrial se puede encontrar en varios artículos de revisión (Chen, 2010; Chanprateep, 2010). Por otra parte, el género *Pseudomonas* se presenta como un interesante productor de mcl-PHAs. Generalmente es capaz de producir entre 1 y 30 %

del peso seco en biopolímero. Hasta la fecha, la mayoría de las bacterias productoras de PHAs empleadas son bacterias Gram-negativas (Lu y col., 2009). Sin embargo, el principal problema con estas bacterias es la presencia del lípido A (endotoxinas), componente de la membrana externa de lipopolisacáridos (LPS) que forman la pared celular de las Gram negativas (**Figura 1.3**); el cual puede ser arrastrado con el PHA durante el proceso de extracción (Rai y col., 2011). Las endotoxinas de los LPS son pirógenos que pueden provocar una fuerte respuesta inflamatoria (Ray y col., 2013), haciendo inadecuado al PHA para aplicaciones biomédicas. Aunque esta endotoxina puede eliminarse, los métodos utilizados para tal fin aumentan el costo global de la producción de PHA y conducen a cambios en las propiedades del PHA (reducción de la masa molecular y la polidispersidad).

1.2.2. Bacterias Gram-positivas. La producción de PHA fue inicialmente descubierta en bacterias Gram-positivas del género *Bacillus* (Lemoigne, 1923), posteriormente se ha informado en otros géneros de este grupo. En comparación con las bacterias Gram-negativas, las bacterias Gram-positivas producen principalmente scl-PHA (Zinn y Hany, 2005) y en menor contenido (2 a 50 % del peso seco), razón por la cual las bacterias Gram-positivas todavía son menos utilizadas para la producción de PHA comercial. Un contenido de scl-PHA del 82 % del peso seco fue obtenido empleando *Streptomyces* sp. (ATCC 1238) en un medio con glucosa, pero este valor puede ser una sobreestimación debido al uso de la técnica del ácido crotonico (Karr y col., 1983; Valappil y col., 2007a). Algunas cepas Gram-positivas son capaces de sintetizar copolímeros de cadena media y cadena corta si se emplean condiciones y sustratos de carbono adecuados. Un estudio realizado por Shahid y col. (2013) demostraron que *B. megaterium* (DSM 509) producía exclusivamente PHB a partir de

glicerol y ácido succínico en un medio mineral con nitrógeno, pero comenzaba a producir copolímeros en un sub-cultivo con el mismo medio y en ausencia de nitrógeno.

Con la misma bacteria, los autores observaron la formación de homopolímero de cadena media (mcl-PHA) cuando realizaron cultivos empleando como sustrato ácido octanoico en ausencia de nitrógeno (Shahid et al., 2013). A pesar de la acumulación de menores cantidades de PHA en general, las bacterias Gram-positivas son ventajosas sobre las Gram-negativas, debido a que no poseen LPS en su pared celular, lo que convierte a los PHAs obtenidos en una mejor fuente de materia prima para aplicaciones biomédicas (Valappil y col., 2007a).

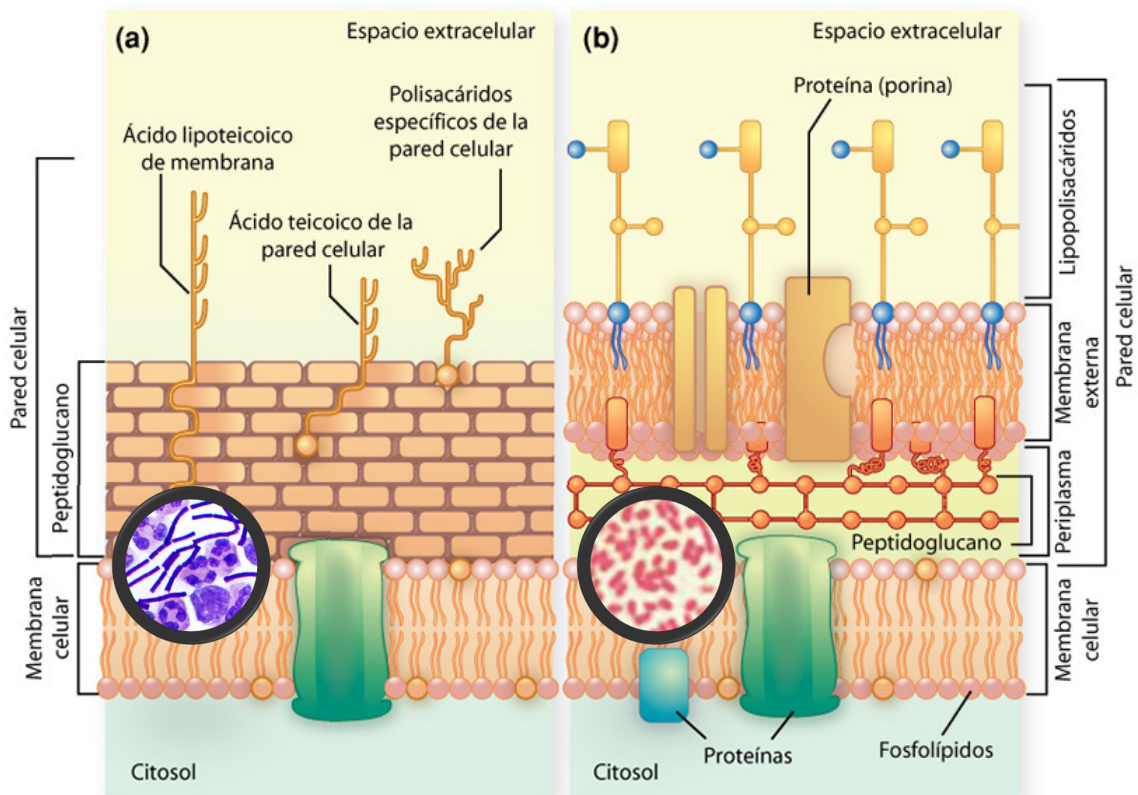


Figura 1.3. Esquema de la pared celular de las bacterias Gram positiva (a) y Gram negativa (b) (Curtis y Schnek, 2008).

Los principales géneros son *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides*) y actinomicetes del género *Streptomyces* (Vallapil y col., 2004), aunque en general, el

género *Bacillus* parece ser un mejor candidato en comparación con *Streptomyces* para la producción de PHAs debido a un mejor rendimiento de polímero y condiciones de fermentación menos estrictas (Vallapil y col., 2007a).

1.2.3. Las bacterias del género *Bacillus*. Las bacterias de este género tienen algunas características interesantes para ser empleadas en distintas aplicaciones industriales, tales como el rápido crecimiento en sustratos económicos y la tolerancia a altas presiones osmóticas. Sin embargo, estas bacterias son formadoras de endosporas y suele suceder que el punto máximo de acumulación de polímero tiene lugar justo antes de la esporulación, siendo degradado durante este proceso. Este hecho es negativo para el desarrollo del proceso de producción de PHAs (Wu et al., 2001; Full y col., 2006; Valappil y col., 2007a). Wu et al. (2001) demostró la dificultad de promover la formación de PHB en cepas de *Bacillus* spp. utilizando métodos estándar de cultivo tales como altas relaciones carbono:nitrógeno, o el bajo suministro de oxígeno, ya que todos estos métodos inducen la esporulación (Faccin, 2009). Por lo que al emplear cepas de *Bacillus* spp. es necesario determinar las condiciones óptimas de crecimiento en las que se logran producir altas concentraciones de PHA evitando la esporulación.

1.3. METODOLOGÍAS DE OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs

En la producción de PHAs influyen distintas variables, tales como el tipo de microorganismo, la duración de la fermentación, la tasa de crecimiento, la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, entre otras (Shahid et al., 2013). Para la optimización de variables en la producción de PHAs se han desarrollado varias metodologías, incluyendo métodos convencionales con el uso de un factor o variable

predictora a la vez, con el uso de análisis de varianza y regresión simples, muy laboriosos y con mucho consumo de tiempo (**Capítulo 2**) hasta técnicas basadas en estadística compleja, como la metodología de superficie de respuesta (MSR) (**Capítulo 3**) (Grothe et al., 1999; Lee y Gilmore, 2005; Salas, 2008; Zafar y col., 2012). Para determinar las mejores interacciones y optimizar simultáneamente múltiples ecuaciones se utilizan las funciones de deseabilidad definidas por Derringer y Suich (1980) (Khun, 2015).

1.4. CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN INTRACELULAR DE PHAs

Para determinar el contenido de PHA de la biomasa han sido desarrollados diferentes métodos: 1) mediante extracción directa, en particular utilizando cloroformo u otros disolventes orgánicos para obtener el PHA extraíble de las células (Valappil y col., 2007b; Ibrahim y col., 2009; Heinrich y col., 2012) o 2) a partir de la medición indirecta, lo que indica la concentración de PHA intracelular, principalmente por cromatografía de gases (Braunegg y col., 1978; Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004; Arcos-Hernandez y col., 2010). Sin embargo, para obtener información sobre el rendimiento real del proceso, se requiere la determinación de PHA extraíble, que sólo puede llevarse a cabo a través de técnicas de extracción directa.

Los altos costos de los procesos de extracción de los PHAs, sumados a la variación en los tiempos de máxima producción por parte de la mayoría de las bacterias productoras de estos biopolímeros, exigen el abordaje de nuevas técnicas de cuantificación que permitan una rápida determinación del momento óptimo en la producción donde realizar el proceso de extracción.

Tradicionalmente se ha usado el ensayo del ácido crotónico como método para la determinación cuantitativa de PHB (Law y Slepecky, 1961; Ward y col., 1973;

Slepecky y Law, 1960). Si bien este método es fácil y rápido para cuantificar el PHB, el mismo tiende a sobrestimar el contenido de PHB y se limita sólo a la determinación de PHB (Karr y col, 1983; Valappil y col., 2007a). Actualmente se puede lograr la cuantificación de diferentes PHAs intracelulares utilizando técnicas analíticas modernas, incluyendo entre otros la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (**capítulos 2 y 5**) (Tan y col., 2014). La técnica de FTIR no necesita de solventes para su aplicación, lo que elimina la exposición al riesgo de las sustancias químicas peligrosas, además no es una técnica destructiva y necesita tiempos cortos para el procesamiento y análisis de las muestras lo que proporciona una rápida disponibilidad de los resultados.

Varios autores demostraron que el contenido de PHA puede ser relacionado por medio de los espectros FTIR de las muestras de células intactas utilizando análisis estadísticos multivariados o quimiometría, principalmente modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), lo que permite la determinación del contenido de PHA con un error estándar de la estimación (Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004; Arcos-Hernández y col. 2010). Sin embargo, todas las cuantificaciones por IR empleadas se basan en metodologías que utilizan accesorios FTIR caros, como ATR (Jarute y col., 2004; Arcos-Hernández y col. 2010), o transmitancia sobre películas de células con microscopía IR (Kansiz y col., 2000), en lugar de utilizar una metodología clásica y de bajo costo, como la transmitancia con pastillas de KBr (Smith, 2011). Tampoco existe información acerca de la cuantificación de PHAs basado en FTIR y análisis multivariado en bacterias Gram-positivas (**capítulo 5**).

1.5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE PHAs

En la producción de PHAs a gran escala tanto la relación costo-beneficio como la pureza farmacológica del PHA dependen principalmente del microorganismo utilizado y el método de extracción empleado (Valapil y col., 2007). El PHA microbiano es almacenado como gránulos intracelulares insolubles y los métodos para recuperarlo implican típicamente la lisis de la pared/membrana celular, la solubilización y purificación del PHA, y finalmente la precipitación del polímero. Los métodos más comunes de recuperación del PHA a partir de la biomasa microbiana utilizan la extracción con solventes y la digestión química. Entre todos los métodos de recuperación, la extracción con solventes es el mejor establecido y el más comúnmente utilizado, debido a que proporciona una alta pureza en la obtención del PHA (Jiang y col., 2015). Se han probado distintos solventes de extracción como diclorometano, carbonato de propileno, anhídrido acético, carbonato de etileno, dicloroetano o cloroformo (Berger et al., 1989; Valapil y col., 2007), siendo la extracción en Soxhlet con cloroformo en ebullición el más popular (Kannan y Řeháček, 1970; Manna y col., 1999). Ramsay y col. (1994) realizaron un estudio donde evaluaron diferentes solventes como cloroformo, cloruro de metileno o 1,2-dicloroetano para recuperar PHB bajo diversas condiciones (cloroformo: 61 °C, 1 h; cloruro de metileno: 40 °C, 24 h y 1,2-dicloroetano: 83 °C, 0,5 h). Después de la extracción con estos solventes, eliminaron los restos celulares mediante filtración y concentraron la solución por evaporación rotatoria antes de precipitar el PHB por adición gota a gota de etanol enfriado con hielo. Con cloroformo y 1,2-dicloroetano lograron una alta recuperación de PHB (68 %) con una alta pureza (96 % a 98 %) en comparación con el cloruro de metileno (recuperación: 25 %, pureza: 98 %).

Aunque las técnicas de extracción con solventes permiten una alta pureza en la recuperación del PHB, existe gran preocupación por los altos costos de esta operación, así como el impacto ambiental negativo causado por la generación de residuos peligrosos (Hottle y col., 2013). Una de las formas de minimizar este problema es mediante el uso de solventes residuales para la extracción de PHB. Esto fue demostrado en una planta de Brasil, donde la producción de PHB a escala piloto se integró con un molino de caña de azúcar y los subproductos de la fermentación etanólica derivados del molino fueron utilizados posteriormente como solventes de extracción para la recuperación del PHB (Nonato y col., 2001), presentando así una solución factible para lograr una alta pureza en la extracción de PHB a un costo ambiental inferior.

Industrialmente, la compañía Australiana Chemie Linz GmbH, productora de PHB, empleaba la extracción con solventes para recuperar el biopolímero. Al igual que Chemie Linz, la compañía inglesa Imperial Chemical Industries (ICI) inicialmente utilizaba la extracción con solvente para la recuperación de PHA (Tamer y Moo-Young, 1998).

Otros procesos de recuperación emplean la digestión química por medio de hipoclorito para el tratamiento de la biomasa. Este tratamiento es eficaz en la solubilización de los componentes celulares lográndose la separación del contenido de PHB que es posteriormente recuperado por centrifugación (Berger y col., 1989). Mientras que el método es simple y eficaz, los polímeros de PHB obtenidos a través de la digestión con hipoclorito son generalmente de masas moleculares más bajas debido a una alta degradación del polímero (Hahn et al., 1994; Ramsay et al., 1990). Por este motivo es necesario optimizar el proceso de extracción para limitar la disminución en la masa molecular del biopolímero (Berger et al., 1989). Por otro lado, para resolver este problema fue desarrollado un enfoque combinado el cual emplea dispersiones de la

solución de hipoclorito de sodio como solubilizante celular y cloroformo para proteger al PHB de la excesiva degradación después de su liberación de las células, aprovechando así la digestión con hipoclorito y la extracción por solvente (Hahn et al., 1994).

1.6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PHAs

Para determinar la estructura química y las propiedades térmicas de los PHAs, estos son sometidos a diferentes técnicas analíticas siendo las más comúnmente utilizadas la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la cromatografía por permeación de geles (GPC), la resonancia magnética nuclear (NMR), la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Los PHAs pueden variar desde no cristalinos a altamente cristalinos con valores de cristalinidad entre 0 % y 70 % (Chanprateep, 2010; Rai y col., 2011). La cristalinidad puede medirse por varios métodos de análisis estructurales, incluyendo DSC y Difracción de Rayos X (Tan y col., 2014).

1.6.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental típicamente utilizada para la determinación de las propiedades térmicas de los PHAs. La capacidad de monitorear la temperatura y el calor involucrado durante las transiciones de fase en polímeros no sólo proporciona datos sobre la estabilidad térmica de los mismos, sino que también hace posible obtener información detallada de los procesos de cristalización y fusión de los cristales formados. Las mejoras en la instrumentación y el software para DSC han generado nuevas oportunidades para el estudio de los efectos de la estructura y los cambios en el medio ambiente en el comportamiento de distintas biomoléculas (Spink, 2008). El uso de DSC en el análisis de las propiedades térmicas de los PHAs es ampliamente

reconocido (Hahn y col., 1994; Oliveira y col., 2007; Valapil y col., 2007; Venkateswar Reddy y col., 2015; Domínguez-Díaz y col., 2015). En el análisis del grado de cristalinidad por DSC, la entalpía de fusión (ΔH_m) ofrece un valor estimado del calor de fusión en las condiciones de análisis, el cual está relacionados con la cristalinidad del polímero. Los PHA con muy baja cristalinidad suelen tener ΔH_m bajos a no observables, mientras que los polímeros altamente cristalinos, tales como el PHB, pueden tener valores ΔH_m de hasta 146 J g^{-1} (Barham y col., 1984; Rai y col., 2011).

1.6.2. Cromatografía por permeación de geles (GPC). Las propiedades físicas de los PHAs dependen de su masa molecular (Domínguez-Díaz y col., 2015). La cromatografía por permeación de geles (GPC) o cromatografía por exclusión de tamaños (SEC), implica el fraccionamiento cromatográfico de macromoléculas según su tamaño molecular. Esta técnica es comúnmente utilizada para el análisis cuantitativo de la distribución de masas molares de PHA (Bürger y col., 1993; Łabuzek and Radecka, 2001; Oliveira et al., 2007; Valapil y col., 2007; Ten y col., 2015). La masa molecular promedio en peso (M_w), la masa molecular promedio en número (M_n), y el índice de polidispersidad o PDI (M_w/M_n) de un PHA pueden ser determinados por cromatografía por permeación de geles (GPC), previa calibración con patrones de poliestireno (Ashby y col., 2002). El M_w de los PHAs se extiende en un amplio rango de 50.000 a 10.000.000 g/mol y en función del valor de M_n , el PDI podría estar entre 1,1 y 6,0 (Madison y Huisman, 1999; Chen y col., 2010; Chanprateep, 2010). Para este análisis se utilizan columnas de GPC consistentes en geles con distintos tamaños de poros (Ashby y col., 2002, Koller y col., 2005). A menudo, el amplio rango de M_w de los PHAs convierte al análisis de una muestra desconocida en un gran desafío, en particular

cuando el biomaterial es una mezcla de diferentes moléculas de PHA con muy diferentes valores de M_n y M_w (Tan y col., 2014).

1.6.3. Resonancia Magnética Nuclear (NMR). La resonancia magnética nuclear (NMR) se ha utilizado durante muchos años como un método de análisis químico. El NMR permite estudiar la composición química de un polímero de PHA intacto (no así la cromatografía gaseosa) y diferenciar entre mezclas de PHA y copolímeros de PHA, con los detalles topológicos y de los grupos funcionales presentes en las moléculas (Hahn y col., 1995; Cromwick y col., 1996; Ashby y col., 2002; Teeka y col., 2012). Los dos núcleos comúnmente utilizados son el de H y el de C dando lugar a $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$. La alta abundancia de protones (^1H) en la naturaleza indica que $^1\text{H-NMR}$ es más sensible y requiere un tiempo de análisis más corto (alrededor de una hora). Por el contrario, debido a la baja sensibilidad y abundancia natural del ^{13}C , la adquisición de espectros de $^{13}\text{C-NMR}$ puede requerir un tiempo de análisis más largo (hasta 24 h) para lograr una intensidad de señal suficiente. A pesar de su mayor costo en tiempo el $^{13}\text{C-NMR}$ aporta información esencial sobre la distribución de monómeros en las macromoléculas. Como los PHAs contienen hidrógeno y carbono, generalmente $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ se aplican en combinación para proporcionar un análisis más completo del polímero. Esta técnica ha sido utilizada para estudiar la dinámica, estructura y disposición de grupos o cadenas laterales de los PHAs (Łabuzek and Radecka, 2001; Oliveira et al., 2007; Valapil y col., 2007; Ten y col., 2015). También se utiliza ampliamente para el análisis de PHAs saturados e insaturados. Mediante $^1\text{H-NMR}$ es posible cuantificar los monómeros presentes en un PHA empleando la relación de intensidad de señales (Sánchez y col., 2003). Las preferencias conformacionales de la molécula de PHB se han determinado mediante el análisis de los espectros de NMR

en cloroformo y dimetilformamida (Doi y col., 1986). El NMR es también una poderosa herramienta no destructiva que podría aplicarse al análisis de nuevos PHAs funcionalizados para los que los estándares analíticos no están disponibles actualmente (Hartmann y col., 2004; Hany y col., 2005). En la **Figura 1.4** se pueden observar un espectro típico de $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ de un mcl-PHA (Wang y col., 2012).

1.6.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica no destructiva, que requiere tiempos mínimos para la preparación de la muestra, y permite la rápida caracterización de los rasgos estructurales de materiales poliméricos complejos. El espectro IR es rico en información relacionada a los movimientos de vibración y rotación de los átomos en las moléculas. Absorciones de IR específicas pueden ser asignadas a determinados tipos de enlaces covalentes, y las modificaciones de estos enlaces debidas al entorno electrónico local pueden ser detectados en los detalles de los espectros. Esta herramienta es utilizada habitualmente para determinar cualitativamente la estructura molecular de los PHAs (Kansiz, 2000; Oliveira et al., 2007; Valapil y col., 2007), ya que las principales bandas del PHA son las correspondientes a las señales de estiramiento del grupo carbonilo del éster (1750 a 1720 cm^{-1}) y las bandas entre 1450 y 1000 cm^{-1} son las correspondientes a deformaciones de los grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_2), así como a estiramientos del grupo CO (Kansiz, 2000; Shahid y col., 2013). En el análisis de cristalinidad por FTIR, los PHAs presentan bandas de absorción característicos a ciertos números de onda que pueden ser correlacionados con la cristalinidad.

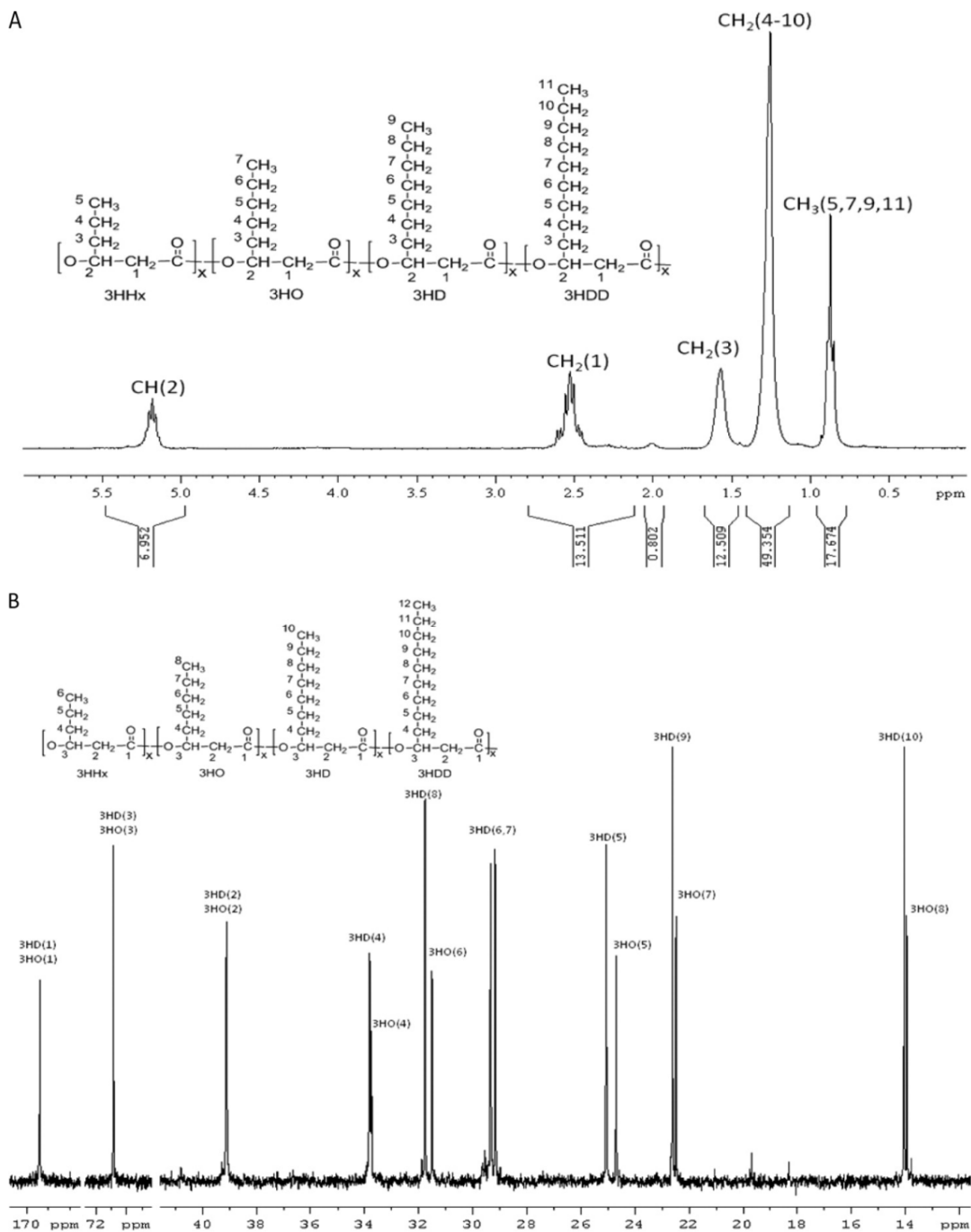


Figura 1.4. (A) Espectro típico de ¹H-NMR de un mcl-PHA. Los protones están numerados en el polímero y se asignan a los picos en el espectro. (B) Espectro típico de ¹³C-NMR de un mcl-PHA, los átomos de carbono están numerados en el polímero y se les asigna a picos en el espectro (3HHx, 3-hidroxihexanoato; 3HO, 3-hidroxiocetanoato; 3HD, 3-hidroxidecanoato, 3HDD, 3-hidroxidodecanoato) (Tan y col., 2014).

Las ubicaciones exactas de estas bandas varían según la composición química del polímero. Para scl-PHA como PHB y PHBV, las bandas en 1453, 1382, 1279, 1228, y 1185 cm^{-1} son sensibles al grado de cristalinidad (Bloembergen y col., 1986; Xu y col., 2002; Luo y col., 2006; Porter y Yu, 2011).

La banda en 1725 cm^{-1} y las bandas en el rango de 1500 a 1300 cm^{-1} , 1300 a 1000 cm^{-1} y 1000 a 800 cm^{-1} revelan cambios conformacionales de los mcl-PHA y scl-mcl-PHA, tanto en fase cristalina como amorfa (Chen y col., 2009).

1.7. INVESTIGACIÓN SOBRE PHAs

La intensa investigación y el interés comercial en los PHAs son evidentes al observar el rápido incremento en las publicaciones relacionadas. Un reporte de citas de la Web of Science (Thomson Reuters, Nueva York, EE.UU.) reveló que en los últimos 20 años, los documentos relacionados con el PHA han aumentado casi 10 veces, mientras que las citas se han incrementado en más de 500 veces con un recuento medio de citas de cerca de 1.100 por año (Tan y col., 2014). Esto ha impulsado el crecimiento del conocimiento y el desarrollo de técnicas relacionadas con la producción microbiana de PHAs. Con esta información, el trabajo de investigación sobre los PHAs puede generarse con rapidez, ya sea mediante el uso de cepas microbianas conocidas o por medio del aislamiento y caracterización de nuevas cepas microbianas productoras de PHA (**Figura 1.5**).

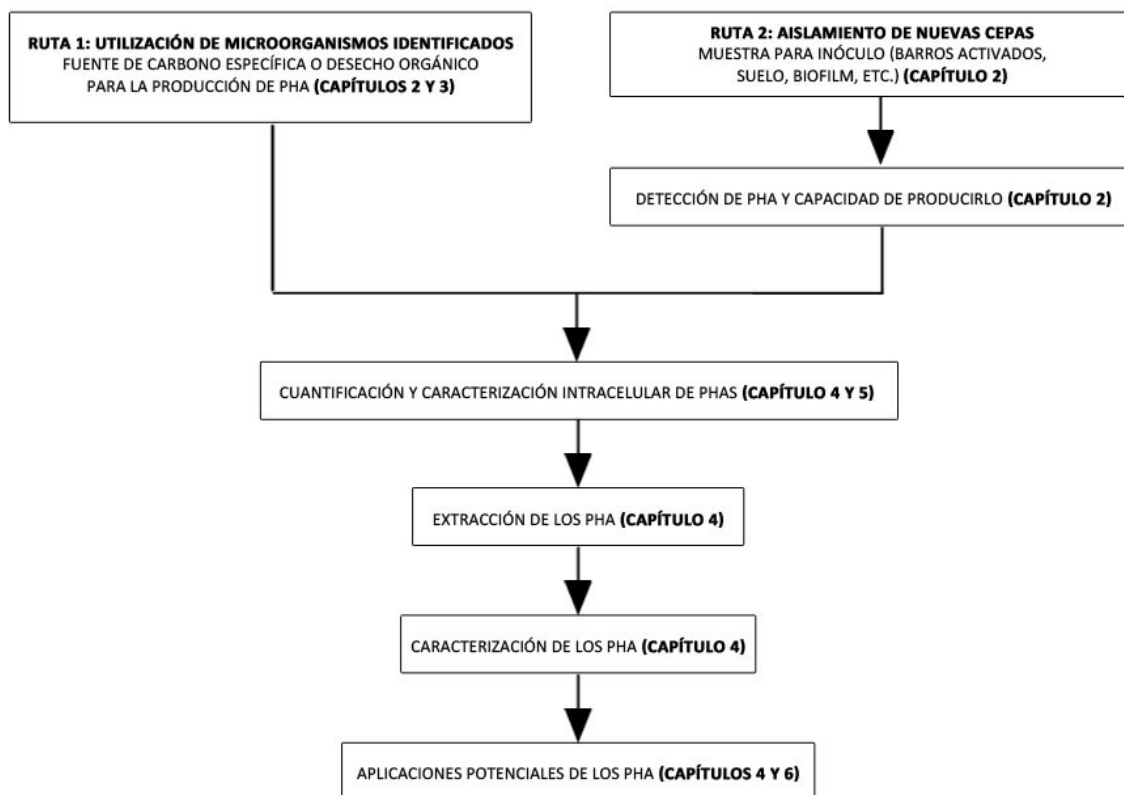


Figura 1.5. Proceso esquemáticos del flujo de trabajo para la investigación de PHAs (modificado de Tan y col., 2014).

1.8. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es estudiar y optimizar la producción de poli(β -hidroxialcanoato)s, PHAs, a partir de sustratos de bajo costo y cepas bacterianas autóctonas aisladas de ambientes costeros de la región de Bahía Blanca. Conjuntamente se propuso desarrollar metodologías rápidas y confiables para evaluar la producción de estos biopolímeros.

Este objetivo general se abordó mediante los siguientes objetivos particulares:

- a) Evaluar la capacidad de producción de PHAs por parte de cepas bacterianas provenientes de ambientes costeros afectados por la actividad antrópica.

- b) Seleccionar cepas con el mejor potencial para la producción de PHAs a partir los residuos seleccionados.
- c) Estudiar las condiciones experimentales y nutricionales para optimizar el crecimiento y la acumulación de PHAs por parte de la cepa seleccionada, empleando como sustratos glicerol y almidón en un medio de bajo costo.
- d) Adaptar las metodologías de extracción
- e) Identificar y caracterizar los biopolímeros obtenidos
- f) Desarrollar un método rápido y confiable para la determinación del PHA extraíble a partir de células liofilizadas.

1.9. REFERENCIAS

- Anderson, A.J., Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54:450-472.
- Arcos-Hernandez, M.V., Gurieff, N., Pratt, S., Magnusson, P., Werker, A., Vargas, A., Lant, P. (2010) Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *J. Biotech.* 150:372-379.
- Ashby, R., Solaiman, D., Foglia, T. (2002) Poly(ethylene glycol)-mediated molar mass control of short-chain- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60:154-159.
- Avella, M., De Vlieger, J. J., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., Volpe, M. G. (2005) Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chem.*, 93(3):467-474.
- Babu, R. P., O'Connor, K., Seeram, R. (2013) Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Prog. Biomater.*, 2(1):8.

-
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L., Holmes, P. A. (1984) Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: Poly-3-hydroxybutyrate. *J. Mater. Sci.*, 19:2781-2794.
- Bera, A., Dubey, S., Bhayani, K., Mondal, D., Mishra, S., Ghosh, P. K. (2015) Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate using seaweed-derived crude levulinic acid as co-nutrient. *Int. J. Biol. Macromol.*, 72:487-494.
- Berger, E., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., Chavarie, C., Braunegg, G. (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol. Tech.*, 3:227-232.
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm T.L., Marchessault, R.H. (1986) Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 19:2865-2871.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M. (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 6:29-37.
- Braunegg, G. (2003) Sustainable poly(hydroxyalkanoate) (PHA) production, in degradable polymers: principles and applications, ed. Scott G. Kluwer Academic.
- Bugnicourt, E. (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.*, 8(11):791-808.
- Bürger, H. M., Müller, H., Seebach, D., Bornsen, K. O., Schar, M., Widmer, H. M. (1993) Matrix-assisted laser desorption and ionization as a mass spectrometric tool for the analysis of poly[(r)-3-hydroxybutanoates]. comparison with gel permeation chromatography. *Macromolecules*, 26:4783-4790.

- Chanprateep, S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.*, 110:621-632.
- Chen, G. Q. (2010) In plastics from bacteria: natural functions and applications, Chen, G. Q., Ed. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 14, pp. 121–132.
- Chen, S., Liu, Q., Wang, H., Zhu, B., Yu, F., Chen, G. Q., Inoue, Y. (2009) Polymorphic crystallization of fractionated microbial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, 50:4378-4388.
- Cromwick, A.M., Foglia, T., Lenz, R.W. (1996) The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46:464-469.
- Curtis, H. y Schneek, A. (2008) Curtis. Biología. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Derringer, G. and Suich, R. (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.*, 12:214-219.
- Dhangdhariya, J. H., Dubey, S., Trivedi, H. B., Pancha, I., Bhatt, J. K., Dave, B. P., Mishra, S. (2015) Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. *Int. J. Biol. Macromol.*, 76:254-261.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K. (1986) Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules*, 19(11):2860-2864.
- Domínguez-Díaz, M., Meneses-Acosta, A., Romo-Uribe, A., Peña, C., Segura, D., Espin, G. (2015) Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. Polym. J.*, 63:101-112.

- Doug, S. (2010) Bioplastics: technologies and global markets. BCC research reports PLS050A. <http://www.bccresearch.com/report/bioplastics-technologies-markets-pls050a.html>
- Escapa, I.F., Morales, V., Martino, V.P., Pollet, E., Avérous, L., García, J.L., Prieto, M.A. (2011) Disruption of β -oxidation pathway in *Pseudomonas putida* KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89:1583-1598.
- Faccin, D. J. L., Martins, I., Cardozo, N. S. M., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Alves, T. L. M., Secchi, A. R. (2009) Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *J.Chem. Technol. Biot.*, 84(12):1756-1761.
- Full, T.D., Jung, D.O., and Madigan, M.T. (2006) Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43:377-384.
- Gram, H.C. (1884) "Über die isolierte färbung der schizomyceten in schnitt- und trockenpräparaten". *Fortschr. Med.*, 2:185–189.
- Grothe, E., Moo-Young, M., Chisti, Y., (1999) Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microb. Tech.*, 25:132-141.
- Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S., Chang, H.N. (1994) Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioeng.*, 44(2):256-261.
- Hahn, S.K., Chang, Y.K., Lee, S.Y. (1995) Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:34-39.

- Hany, R., Hartmann, R., Böhlen, C., Brandenberger, S., Kawada, J., Löwe, C., Zinn, M., Witholt, B., Marchessault, R.H. (2005) Chemical synthesis and characterization of POSS-functionalized poly[3-hydroxyalkanoates]. *Polymer*, 46:5025-5031.
- Hartmann, R., Hany, R., Geiger, T., Egli, T., Witholt, B., Zinn, M. (2004) Tailored biosynthesis of olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPO1 with improved thermal properties. *Macromolecules*, 37:6780-6785.
- Heinrich, D., Madkour, M.H., Al-Ghamdi, M.A., Shabbaj, II, Steinbüchel, A. (2012) Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express* 2:59.
- Hottle, T. a., Bilec, M. M., Landis, A. E. (2013) Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polym. Degrad. Stab.*, 98(9):1898-1907.
- Howells, E.R. (1982) Opportunities in biotechnology for the chemical industry. *Chem. Ind.*, 8:508-511.
- Ibrahim, M. H. A., Steinbüchel, A. (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* mw1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:6222-6231.
- Jarute, G., Kainz, A., Schroll, G., Baena, J. R., Lendl, B. (2004) On-line determination of the intracellular poly(β -hydroxybutyric acid) content in transformed *Escherichia coli* and glucose during PHB production using stopped-flow attenuated total reflection FTIR spectrometry. *Anal. Chem.* 76:6353-6358.
- Jiang, Y., Mikova, G., Kleerebezem, R., van der Wielen, L.A., Cuellar, M.C. (2015) Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture. *AMB Express*, 5(1):5.

- Kannan, L.V., Rehacek, Z., (1970) Formation of poly- β -hydroxybutyrate by Actinomycetes. *Indian J. Biochem.*, 7:126-129.
- Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., Mc Naughton, D. (2000) Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3415-3420.
- Karr, D.B., Waters, J.K., Emerich, D.W. (1983) Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:1339-1344.
- Khanna, S., Srivastava, A. K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.*, 40:607-619.
- Kim, B. (2000) Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzym. Microb. Technol.*, 27:774-777.
- King, P.P. (1982) Biotechnology: an industrial view. *J Chem Technol Biotechnol*, 32:2-8.
- Koller, M., Bona, R., Braunnegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P. (2005) Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromol.*, 6:561-565.
- Kuhn M. (2015). Desirability: Desirability Function Optimization and Ranking. R package version 1.9. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=desirability>
- ŁAbuzek, S., and Radecka, I. (2001) Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *J. Appl. Microb.*, 90(3):353-357.
- Law, J.H. and Slepecky, R.A. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.*, 82:33-36.

-
- Lee, K. M., and Gilmore, D. F. (2005) Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design. *Proc. Biochem.*, 40(1):229-246.
- Lemoigne, M. (1923) Production d'acide β -oxybutyrique par certaines bactéries du group du *B. subtilis*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 176:1761.
- Lu, J., Tappel, R. C., Nomura, C. T. (2009) Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxy-alkanoates). *Polym. Rev.*, 49:226-248.
- Luo, R., Chen, J., Zhang, L., Chen, G. (2006) Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2Ps from *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Biochem. Eng. J.*, 32:218-225.
- Macrae, R. M., Wilkinson, J. F. (1958) Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 19:210-222.
- Madison, L. L., Huisman, G. W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxy-alkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63:21-53.
- Manna, A., Banerjee, R., Paul, A. K. (1999) Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. *Curr. Microbiol.*, 39(3):153-158.
- Misra, A. K., Thakur, M. S., Srinivas, P., Karanth, N. G. (2000) Screening of poly- β -hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biotech. Lett.*, 22:1217-1219.
- Nonato, R., Mantelatto, P., Rossell, C. (2001) Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57:1-5.
- 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. *Biores. Technol.*, 98(3):633-638.
-

- Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G., Luengo, J. M. (2010) Unusual PHA biosynthesis. In plastics from Bacteria: Natural functions and applications, Chen, G. Q., Ed., Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 14, pp. 133–186.
- Othman, S. H. (2014) Bio-nanocomposite materials for food packaging applications: types of biopolymer and nano-sized filler. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 2:296-303.
- Papaneophytou, C. P. and Kyriakidis, D. A. (2012) Optimization of polyhydroxyalkanoates production from *Thermus thermophilus* HB8 using response surface methodology. *J. Polym. Environ.*, 20(3):760-773.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. (2007) Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82:233-247.
- Porter, M., Yu, J. (2011) Monitoring the in situ crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy. *J. Microbiol. Meth.*, 87:49-55.
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., Roy, I. (2011) Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R. Rep.*, 72:29-47.
- Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., Ramsay, J. A. (1990) Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2093-2098.
- Ramsay, J. A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C., Ramsay, B. A. (1994) Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.*, 8:589-594.
- Ray, A., Cot, M., Puzo, G., Gilleron, M., Nigou, J. (2013) Bacterial cell wall macro-amphiphiles: Pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie*, 95:33-42.

- Salas, C. (2008) Por qué comprar un programa estadístico si existe R? *Ecologia Austral*, 18(203) :223-231.
- Sánchez, R. J., Schripsema, J., da Silva, L. F., Taciro, M. K., Pradella, J. G. C., Gómez, J. G. C. (2003) Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *Eur. Polym. J.*, 39:1385-1394.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, 26:246-265.
- Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P., Gaillard, J. L., Corroler, D. (2013) Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng.*, 116:302-308.
- Shrivastav, A., Mishra, S. K., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., Mishra, S. (2010) Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *Int. J. Biol. Macromol.*, 47(2):283-287.
- Singh, A. K., Mallick, N. (2008) Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(3):350-357.
- Slepecky, R. A., Law, J. H. (1960) A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Anal. Chem.*, 32:1697-1699.
- Smith, B.C. (2011) Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy. CRC Press, Taylor and Francis Group, USA.
- Spink, C. H. (2008) Differential Scanning Calorimetry, *Meth. Cell Biol.* 84(7):115-141.

- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 25(10):1503-1555.
- Tamer, I. M., Moo-young, M. (1998) Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37(97):1807-1814.
- Tan, G. Y., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., Wang, J. Y. (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3):706-754.
- Teeka, J., Imai, T., Reungsang, A., Cheng, X., Yuliani, E., Thiantanankul, J., Poomipuk, N., Yamaguchi, J., Jeenanong, A., Higuchi, T., Yamamoto, K., Sekine, M. (2012) Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis by isolated *Novosphingobium* sp. THA_AIK7 using crude glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39:749-758.
- Ten, L. N., Chae, S. M., Yoo, S.-A. (2015) Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by *Cyanobacterium Anabaena* sp. BD47. *Chem. Nat. Comp.*, 51(2):350-351.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C., Roy, I. (2007a) Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91:1-17.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T. (2007b) Large-scale production and efficient recovery of PHA with desirable material properties, from newly characterized *Bacillus cereus* SPV. *J. Biotec.*, 132:251-258.
- Van-Thuoc, D., Huu-Phong, T., Thi-Binh, N., Thi-Tho, N., Minh-Lam, D., Quillaguaman, J. (2012) Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam. *MicrobiologyOpen*, 1(4), 395-406.

- Venkateswar Reddy, M., Mawatari, Y., Yajima, Y., Seki, C., Hoshino, T., Chang, Y.-C. (2015) Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from alkylphenols, mono and poly-aromatic hydrocarbons using *Bacillus* sp. CYR1: A new strategy for wealth from waste. *Biores. Technol.*, 192:711–717.
- Wang, Q., Tappel, R. C., Zhu, C., Nomura, C. T. (2012) Development of a new strategy for production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* via inexpensive non-fatty acid feedstocks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78:519-527.
- Ward, A. C., Dawes, E. A. (1973) A disk assay for poly- β -hydroxybutyrate. *Anal. Biochem.*, 52:607-613.
- 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, J., Guo, B. H., Yang, R., Wu, Q., Chen, G. Q., Zhang, Z. M. (2002) In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polym.*, 43:6893-6899.
- Yates, M. R., Barlow, C. Y. (2013) Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers - A critical review. *Res. Cons. Recyc.*, 78:54-66.
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., Dhiman, A. K. (2012) Artificial intelligence based modeling and optimization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production process by using *Azohydromonas lata* MTCC 2311 from cane molasses supplemented with volatile fatty acids: A genetic algorithm paradigm. *Biores. Technol.*, 104:631-641.
- Zinn, M., Hany, R. (2005) Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification. *Adv. Eng. Mater.*, 7: 408–411.

CAPÍTULO 2. Bioconversión de glicerol a poli(hidroxicanoato)s en un medio económico por una cepa de *Bacillus megaterium* aislada de sedimentos marinos.

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. El glicerol y la urea como fuentes económicas de carbono y nitrógeno, respectivamente, para la producción de PHAs.

La producción de biodiesel genera alrededor del 10 % (p/p) de glicerol como subproducto principal. El exceso de glicerol generado puede llegar a convertirse en un problema ambiental; sin embargo, debido a su amplia presencia en la naturaleza, muchos microorganismos conocidos pueden utilizar el glicerol como única fuente de carbono y energía. Una de las posibles aplicaciones es su uso como fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano en microbiología industrial (da Silva y col., 2009). Una de estas potenciales aplicaciones con gran valor agregado es su utilización en la producción de PHAs. Bormann y Roth (1999) utilizaron glicerol como fuente de carbono en cultivos discontinuos para la producción de PHB consiguiendo una baja conversión promedio de alrededor del 17 %. Ashby y col. (2004 y 2005) han utilizado directamente los residuos de la corriente de producción del biodiesel para generar un caldo de cultivo logrando así la producción de PHAs. Cavalheiro y col. (2009) han obtenido PHB a partir de glicerol reciclado de plantas de biodiesel consiguiendo conversiones de PHB de alrededor del 62 %. Es sabido que las bacterias del género *Bacillus* son capaces de crecer a partir de glicerol como única fuente de carbono y energía (Rohini y col., 2006; Vishnuvardhan Reddy, 2009; Sindhu y col., 2011; Zafar y col., 2014). Recientemente Zafar y col. (2014) obtuvieron una conversión del 16 % de

glicerol en copolímeros (scl-HA-co-mcl-HA) a partir de la cepa *Bacillus* sp. RER002 y glicerol como fuente de carbono. Estos resultados le dan una gran perspectiva a futuras investigaciones enfocadas a la producción de PHAs a partir de residuos agroindustriales como el glicerol (López y col. 2011) y cepas de *Bacillus* spp. con amplia capacidad para consumir fuentes de carbono derivadas de estos desechos.

Por otra parte, la urea es una fuente de nitrógeno económica (Soletto, 2005). Utilizando urea en concentraciones menores a 1 g/L, Kim y col. (1992) consiguieron porcentajes de producción de PHA mayores a 37 % con la cepa *Alcaligenes* sp. SH-69 luego de 24 h de crecimiento, empleando sorbitol como fuente de carbono. Utilizando urea y melaza como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente, Kulprecha y col. (2009) consiguieron porcentajes de producción de PHB mayores a 55 % con la cepa *B. megaterium* BA-019 y empleando las mismas fuentes de nitrógeno y carbono Tripathi y col. (2013) consiguieron superar concentraciones del 76 % utilizando una cepa de *Alcaligenes* sp. En otro trabajo, Bormann y col. (1998) consiguieron productividades de hasta 0,83 gPHB/L⁻¹·h⁻¹ con la cepa *Azotobacter beijerinckii* utilizando glucosa como fuente de carbono.

Para la búsqueda de microorganismos con capacidad de producir PHA utilizando determinados residuos industriales o agroindustriales como sustrato, deben seleccionarse sitios relacionados con la generación de residuos o que estén impactados por vuelcos industriales y municipales. Por esta razón se eligieron para este estudio sedimentos del Estuario de Bahía Blanca. El Estuario se encuentra ubicado en la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires, Argentina, entre los 38° 42' y 39° 26' S y 62° 28' y 61° 40' O y presenta una longitud aproximada de 100 km. Está formado por una serie de canales orientados en dirección NO-SE y extensas planicies de mareas e islas, contando con una superficie total de 2.290 km². El canal principal, es la vía de acceso al

complejo portuario más importante de la región. Este sistema recibe el aporte de cursos de agua dulce que atraviesan zonas urbanas y rurales y dos descargas cloacales de la ciudad con tratamiento insuficiente. Además en su margen norte se encuentra asentado uno de los polos petroquímicos más importantes del país.

En base a lo antes mencionado, el objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar la producción de PHAs a partir de glicerol como sustrato y cepas aisladas de ambientes de la región.

2.1.2. Cuantificación de la producción de PHAs

Los altos costos involucrados en los procesos de extracción de los PHAs, sumados a la variación en los tiempos de máxima producción por parte de la mayoría de las cepas productoras de estos biopolímeros, exigen el abordaje de nuevas técnicas de cuantificación que permitan una rápida determinación del momento óptimo de producción donde realizar el proceso de extracción. Actualmente, la cuantificación de diversos PHAs microbianos intracelulares se puede lograr utilizando técnicas analíticas modernas, incluyendo entre otros la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Amy Tan y col., 2014).

El FTIR se ha aplicado para detectar y distinguir entre los diferentes tipos de PHAs, presentes dentro de células intactas. La banda éster del grupo carbonilo característico del PHA intracelular ubicada entre 1720 y 1750 cm^{-1} del espectro FTIR (Kansiz y col., 2000) puede emplearse como herramienta de detección y cuantificación de PHAs (Helm y col., 1995; Hong y col., 1999; Misra y col., 2000; Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004; Arcos-Hernández et al., 2010). La concentración de PHA intracelular está directamente relacionada con la altura de esta banda en el espectro

FTIR obtenido. Esto permite su utilización para realizar una determinación rápida de la producción de PHA a un tiempo dado de fermentación.

La técnica FTIR requiere pocos pasos para la preparación de muestras, con mínima manipulación, empleando pequeñas cantidades (0,4 a 1 mg) de material. Por otra parte, es una técnica rápida (tiempo de procesamiento ~ 30 min), no destructiva y que no requiere el uso de solventes (Amy Tan y col., 2014).

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Aislamiento de cepas productoras de PHA a partir de muestras de sedimentos del estuario de Bahía Blanca.

2.2.2. Determinación rápida de la producción de PHA en células liofilizadas de cepas aisladas de sedimentos del estuario de Bahía Blanca por medio de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

2.2.3. Optimización de la producción de PHA por una cepa de *Bacillus megaterium*.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Obtención de muestras para el aislamiento de cepas productoras de PHA.

Procesamiento y aislamiento.

Para la búsqueda de nuevas cepas productoras de PHA se utilizaron sedimentos obtenidos del estuario de Bahía Blanca colectados de la zona de puerto Galván. Se tomó 1 g de cada muestra y se suspendió en 25 mL de solución de Winogradsky (SW) (Pochon y Tardieu, 1962) contenidos en Erlenmeyers de 100 mL. La SW fue modificada como SWG mediante la adición de 3 % de glicerol y 0,1 % urea (**Anexo B**). Los Erlenmeyers fueron incubados a 30 °C y 150 rpm por 48 h. Al finalizar la incubación, se tomaron de cada frasco alícuotas de 0,1 mL y se sembraron por

agotamiento en superficie en placas con SWG con 1,2 % de agar-agar ultra puro (Merck, Alemania) (SWGA) con el fin de obtener colonias aisladas. Las cajas de Petri fueron incubadas a 30 °C durante 48 a 72 h para observar la formación de colonias.

2.3.2. Aislamiento y selección de cepas productoras de PHA

De cada placa se tomó con ansa una muestra de cada tipo de colonia observada y se realizó un extendido en portaobjetos para luego ser coloreado por medio de las tinciones Negro Sudan (Burdon, 1942) y azul Nilo (modificado de Ostle y Holt, 1982 y Kitamura y Doi, 1994) (**Anexo B**). Los preparados se observaron por microscopía de luz clara e iluminación UV (Zeiss, Primo StariLED, Alemania), respectivamente, usando un objetivo de 100 x de inmersión en aceite. De las colonias que presentaron gránulos coloreados y/o con fluorescencia se obtuvieron células para ser re-aisladas en PCA (Plate Count Agar, Britania), para asegurar su pureza y preservarlas para los estudios siguientes. Una vez obtenidos los cultivos puros, las cepas se guardaron en caldo Tripticasa-Soja (TSB, Britania B0210206, Argentina) adicionado con 20 % de glicerol a -70 °C.

La capacidad de producción de PHAs se determinó por medio de la técnica de FTIR. Cada una de las cepas se cultivó en placa con SWG durante 48 h a 30 °C. De estas placas se colectó la biomasa por medio de lavados con agua destilada (AD). Cada muestra fue sucesivamente centrifugada (Rolco CM 4080, Argentina) durante 15 min a 2.000 g y re-suspendida en AD para asegurar la eliminación de todos los posibles restos de medio de cultivo que pudieran ser arrastrados con los lavados de la placa. Tras centrifugar las muestras, el pellet de células obtenido fue congelado en ultrafreezer (-70 °C) para ser luego liofilizado (RIFICOR LA-B3-C, con una bomba de vacío WELCH 1402) y conservado para determinar la capacidad de producción de PHAs.

2.3.3. Selección de cepas productoras de PHA mediante el análisis de espectros FTIR. Selección de la mejor cepa productora para los ensayos de optimización.

De las muestras de las cepas aisladas liofilizadas se realizó un análisis del espectro infrarojo (IR) para observar la presencia/ausencia e intensidad del pico correspondiente al PHA ($1720-1750\text{ cm}^{-1}$) (Kansiz y col., 2000; Misra y col., 2000; Jarute y col., 2004; Arcos-Hernandez y col., 2010). Para estos análisis se mezcló exhaustivamente 1 mg de cada muestra con 99 mg de KBr de grado espectroscópico utilizando un mortero y una maja de ágata. Las mezclas así obtenidas se utilizaron para preparar pastillas de KBr por medio de una prensa mecánica (6 Ton de presión durante 10 minutos). Antes de las mediciones, las pastillas se secaron a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h para eliminar la humedad atmosférica (Misra y col., 2000). Los espectros se registraron utilizando un espectrómetro Nicolet Nexus. Para cada medición fueron realizados 100 escaneos que se promediaron en el rango de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Para minimizar las diferencias entre los espectros debido a los cambios en la línea de base, esta línea fue corregida mediante el algoritmo de corrección automática de la línea de base del software OMNIC, con exclusión de las bandas de CO_2 (Kansiz y col., 2000). Los espectros obtenidos fueron comparados con el espectro de una cepa de *B. megaterium*, cultivada en las mismas condiciones y aislada previamente en nuestros laboratorios (López Jiménez, 2011), cuya capacidad de producción era conocida, para comparar y definir el potencial y/o la utilidad de las nuevas cepas aisladas.

2.3.4. Optimización de la producción de PHA por una cepa de *B. megaterium*

2.3.4.1. Selección de fuentes de nitrógeno y de carbono para la producción de PHA

2.3.4.1.1. *Bacillus megaterium* BBST4. La cepa bacteriana utilizada fue aislada de sedimentos del estuario de Bahía Blanca, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (López Jiménez, 2011). De acuerdo con las pruebas bioquímicas y el análisis de rDNA 16S la cepa fue identificada como *Bacillus megaterium* (GenBank: número de acceso HM119600.1), y nombrada como *Bacillus megaterium* BBST4. La cepa fue conservada a -70 °C en caldo de Tripticasa-soja con 20 % de glicerol.

2.3.4.1.2. *El método de auxonograma.* Este método, descrito por Beijerinck (1889), fue adaptado con el fin de realizar una detección de las fuentes de carbono y nitrógeno que podrían ser utilizadas por la cepa *B. magaterium* BBST4 para su crecimiento y para la producción de PHA. Todos los medios y soluciones utilizados se prepararon con agua bi-distilada. El medio SWGA se empleó como medio basal.

Una muestra de *B. megaterium* BBST4 conservada en ultrafreezer (-70 °C) fue recuperada en caldo Tripticasa-soja e incubada a 30 °C en un agitador orbital durante 24 h a 150 rpm. Luego se tomó una alícuota de este cultivo con ansa estéril y se sembró mediante agotamiento en superficie en una placa con agar para recuento en placa (PCA, Britania, Argentina), esta placa se incubó a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se tomó una colonia aislada cuidadosamente con un ansa de platino, se suspendió en 5 mL de solución salina estéril (SSE: 0,8 % p/v de NaCl) y se homogeneizó durante 1 minuto con un mezclador de vórtice. La suspensión se centrifugó durante 15 min a 2.000 g, se lavó dos veces con SSE y se suspendió finalmente en la misma solución. La densidad óptica de la suspensión se ajustó a una absorbancia de 0,2 a 550 nm (DO₅₅₀), correspondiente a 10⁸ unidades formadoras de colonias/mililitro (UFC/mL), utilizando

un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, EE.UU.).

2.3.4.1.3. Pruebas con fuentes de carbono. Para este ensayo se utilizó como medio basal, el medio salino SW con la adición de agar agar al 1% (SWA). A este medio se le adicionó 0,1 % (p/v) de NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno (SWAn). Una alícuota de 100 μL de la suspensión de células obtenidas como se indicó anteriormente se extendió en la superficie del agar con una espátula de Drigalsky estéril. Después de secar las placas durante 15 min en estufa a 37 °C, se colocaron en la superficie del agar discos de 5 mm de papel de filtro estéril (MFS, 5A, USA). Los discos se impregnaron con 35 μL de soluciones estériles de las siguientes fuentes de carbono al 2 % (p/v en agua bi-destilada): almidón, extracto de malta y glicerol, y 25 μL de petróleo crudo (tipo “Medanito”; origen: Neuquén, Argentina; densidad: 0,84 g/cm^3 , 28 °API). Discos impregnados con agua destilada o una solución al 2 % de glucosa, se incluyeron como controles negativo y positivo, respectivamente. Todas las fuentes de carbono fueron esterilizadas por filtración con filtro de membrana de 0,22 μm de tamaño de poro (Millipore, EE.UU.) y el petróleo crudo fue esterilizado en autoclave (a 1,5 atm, por 15 min) en viales sellados de 5 mL.

2.3.4.1.4. Pruebas con fuentes de nitrógeno. Para estas pruebas se utilizó un medio compuesto de SWA con 2 % (p/v) de glucosa (SWAGlu) como fuente de carbono. La glucosa se esterilizó por filtración como se describió anteriormente y se añadió al medio previamente autoclavado. Una alícuota de 100 μL de la suspensión de células obtenidas se extendió sobre placas de SWAGlu como se indicó en el punto anterior. Después del secado en estufa de las placas a 37 °C durante 15 min, discos de 5 mm de papel de filtro

estéril se colocaron en la superficie del agar. Los discos se impregnaron con 35 μL de soluciones estériles al 0,1 % de las siguientes fuentes de nitrógeno: urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl y KNO_3 . Discos embebidos con agua bi-destilada o NH_4NO_3 se incluyeron como controles negativo y positivo, respectivamente. Las soluciones de fuentes de nitrógeno se prepararon con agua bi-destilada y se esterilizaron por filtración con filtros de membrana de 0,22 μm de tamaño de poro (Millipore, EE.UU.). Cada fuente de carbono y nitrógeno se ensayó por triplicado.

Todas las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h y se observaron diariamente. Se reportó la asimilación de la fuente de carbono o de nitrógeno cuando se observó un área opaca circular de crecimiento alrededor del disco.

2.3.4.1.5. Combinación de fuentes de carbono y de nitrógeno. El último ensayo del método de auxonograma se realizó con combinaciones de las fuentes de carbono y nitrógeno para determinar la combinación más conveniente para el crecimiento y la producción de PHA. Para este experimento se prepararon medios de cultivo, con SWA como base con cada una de las siguientes fuentes de nitrógeno al 0,1 %: urea (SWA_{urea}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\text{SWA}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$), NH_4Cl ($\text{SWA}_{\text{NH}_4\text{Cl}}$), KNO_3 ($\text{SWA}_{\text{KNO}_3}$) o NH_4NO_3 ($\text{SWA}_{\text{NH}_4\text{NO}_3}$). Una alícuota de 100 μL de una suspensión de células en SSE se extendió en la superficie del agar con una espátula de Drigalsky estéril. A continuación se colocaron sobre la superficie del agar discos de papel de filtro estériles de 5 mm, impregnados con 35 μL de una solución estéril de cada una de las siguientes fuentes de carbono al 2 %: almidón, extracto de malta, glicerol y 25 μL de petróleo crudo. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. Se probaron cuatro sustratos por placa, y cada combinación de fuente de carbono-nitrógeno se ensayó por triplicado. Se registró la asimilación de cada fuente de carbono, con la fuente de nitrógeno respectiva, cuando se

observó un área opaca de crecimiento alrededor del disco. Todos los días, pequeñas muestras fueron tomadas de la zona de crecimiento (cuando fue observada) con una aguja estéril y se extendieron en 1 cm^2 en un portaobjetos de vidrio (Cría y Dotterer, 1916). En cada caso se realizó una tinción con el método de Negro Sudán para la detección de gránulos de PHA producido por las células y otra tinción con la técnica descrita por Schaffer y Fulton (1933) para confirmar la presencia de endosporas. Los extendidos teñidos se observaron por microscopía de luz clara utilizando un objetivo de 100x de inmersión en aceite. Se examinaron 20 campos (área por campo: $0,0227 \text{ mm}^2$) en cada portaobjetos.

2.3.4.2. Efecto de los distintos parámetros y nutrientes del medio de cultivo seleccionado sobre la producción de PHA

A partir de un cultivo de 24 h de *B. megaterium* BBST4 en TSB a 30 °C se sembró con ansa una placa con SWAG (SWA con el agregado de 3 % de glicerol y 0,1 % de urea). Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 30 °C. Luego se recogió con ansa estéril una colonia que fue transferida a un Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de SWG (SW con el agregado de 3 % de glicerol y 0,1 % de urea) y se incubó 28 h a 30°C y a 150 rpm. Las células del cultivo se colectaron mediante centrifugación durante 15 min a 2.000 g, el pellet se lavó dos veces con solución salina, y finalmente se re-suspendió en la misma solución. La densidad óptica de esta suspensión se ajustó a una DO_{550} de 0,2 utilizando un espectro-fotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, EE.UU.). Los experimentos siguientes fueron inoculados con suspensiones preparadas de la manera descripta en este ítem.

2.3.4.2.1. Efecto de la variación de las concentraciones de glicerol y urea

Se utilizaron Erlenmeyer estériles de 250 mL con 100 mL de SWG y diferentes concentraciones de glicerol y urea. Los distintos medios ensayados fueron los siguientes:

I-SWG con 0,1% (p/v) de urea y tres concentraciones diferentes de glicerol (2 %, 3 % y 4 %). II-SWG con 3% de glicerol y diferentes concentraciones de urea (0,05 %, 0,08 %, 0,1 % y 0,15 %).

Cada medio se ensayó por triplicado y cada Erlenmeyer se inoculó con 1mL de la suspensión celular preparada a partir del pre-cultivo descrito anteriormente, para obtener una densidad bacteriana final de 10^6 UFC/mL. Estos experimentos se llevaron a cabo en un incubador termostatzado con agitación (Gerhardt SW 20, Dinamarca) a 30 °C y 150 rpm durante 30 h. El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo mediante la medición de la DO_{550} a lo largo del tiempo y la tasa de crecimiento específico (μ) se calculó como:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t - t_0} \quad (1)$$

Donde t y t_0 son los tiempos final e inicial de crecimiento, respectivamente, y N y N_0 indican el número de células por mL a los tiempos t y t_0 , respectivamente (establecidos de su equivalencia con la DO_{550}). Además, se tomaron 20 μ L del cultivo para determinar el porcentaje de células con gránulos de PHA por medio de la técnica de tinción con Negro Sudán mediante microscopía de luz clara. El porcentaje de células esporuladas se determinó por medio del método de Schaeffer-Fulton para la tinción de endosporas. Las tinciones fueron observadas como fue descrito anteriormente. Al finalizar cada experimento, se centrifugó el volumen restante de cada Erlenmeyer a 2.000 g durante 15 min para recoger las células. El pellet obtenido se lavó dos veces con agua destilada y se liofilizó. Posteriormente el peso seco de las células (PSC) fue

determinado en una balanza analítica (MettlerAE163, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, Reino Unido). La biomasa resultante liofilizada se utilizó para la extracción del PHA como se describió en 2.3.5.

2.3.4.2.2. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación en la producción de PHA

El crecimiento y producción de PHA por parte de la cepa *B. megaterium* BBST4 fueron ensayados a 30 °C y 37 °C en SWG (3 % de glicerol y 0,08 % de urea) en un incubador con agitación a 150 rpm. El inóculo fue obtenido como fue descrito anteriormente. Por cada temperatura ensayada fueron retirados tres Erlenmeyer de la incubadora (triplicados) a las 18, 30, 40, 48 y 60 h de incubación. El volumen de cada Erlenmeyer fue centrifugado a 2.000 g durante 15 min. El pellet obtenido fue lavado dos veces con agua destilada y liofilizado. El PSC y el contenido de PHA (% en peso) fueron determinados como se describe en el inciso anterior y en 2.3.5, respectivamente. Además, 20 µL de cada cultivo fue recogido en cada tiempo de incubación, para determinar el porcentaje de células con gránulos de PHA y el porcentaje de células esporuladas por medio de las técnicas de tinción con Negro Sudán y Schaeffer-Fulton, respectivamente.

2.3.4.2.3. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo: variación en la concentración mínima de extracto de levadura

Se estudió además el efecto de la adición de extracto de levadura (EL) a la formulación SWG. Se ensayaron dos concentraciones de EL: 0,005 % y 0,01 % (p/v). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, en incubadora a 30 °C y 150 rpm de agitación, durante 48 h. Finalmente, se determinaron los contenidos de PSC y PHA (% en peso).

2.3.5. Determinación de la producción de PHA

La extracción del polímero producido se realizó utilizando una modificación de la técnica descrita por Manna y col. (1999) y Valappil y col.(2007). Las células liofilizadas fueron lisadas en hipoclorito de sodio (5,5 % p/v en agua) a 37 °C durante 1 h. A continuación, la suspensión se centrifugó a 6.000 g (ALC-Multispeed Centrifuge PK131, Thermo Electron Corporation, Francia) y el pellet obtenido se lavó dos veces con agua, acetona y etanol, sucesivamente. Finalmente, cada pellet fue sometido a extracción con cloroformo en ebullición durante 10 min y se filtró con papel de filtro Whatman GF/C (47mm, 1820047). El PHA disuelto fue purificado mediante precipitación con hexano y recuperado por filtración y evaporación del solvente (Chuah y col., 2013). El contenido de PHA fue definida como gramos de biopolímero por litro de cultivo celular (g/L).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Selección de cepas productoras de PHA a partir de glicerol.

Entre las cepas bacterianas aisladas se seleccionaron 10 que, mediante la coloración de negro Sudán y azul Nilo, mostraron poseer gránulos de PHA cuando se las cultivo en un medio con glicerol como única fuente de carbono. A fin de evaluar y comparar su potencial de producción con la cepa *B megaterium* BBST4, aislada en estudios previos, se utilizó el análisis por medio de espectros FTIR. En la Figura 2.1 pueden observarse los espectros normalizados de las 6 cepas que presentaron la mayor altura de pico entre 1720-1750 cm⁻¹, también se puede observar el espectro de la cepa *B.megaterium* BBST4.

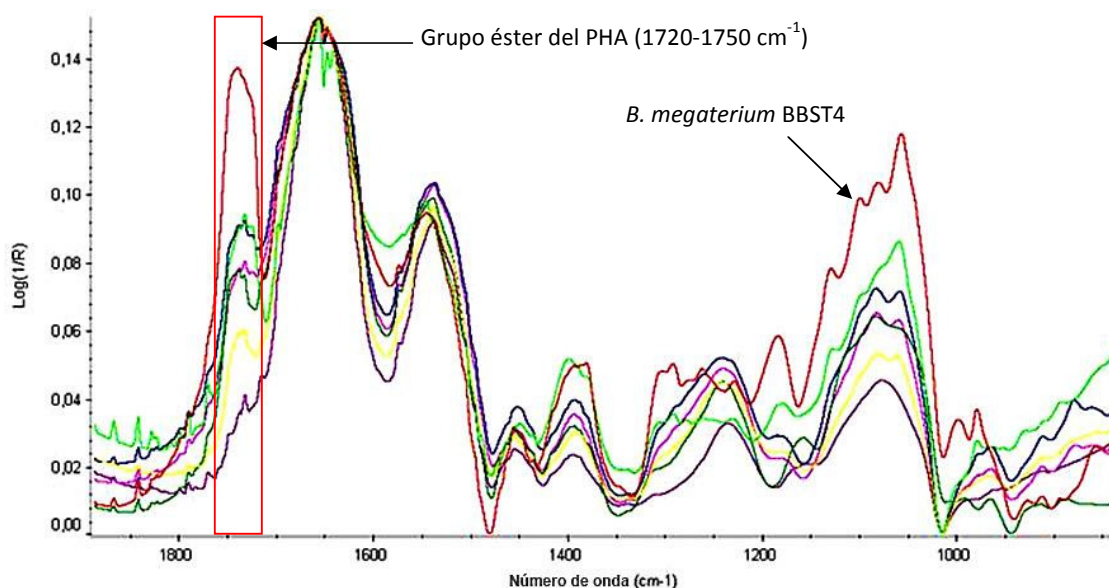


Figura 2.1. Porción del espectro FTIR ($1900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$) de las cepas aisladas y *B. megaterium* BBST4 presentando la zona donde se ubica el pico correspondiente al grupo éster del PHA.

De las cepas analizadas, el espectro que presentó la mayor intensidad para el pico correspondiente al PHA fue sin dudas el de la cepa *B. megaterium* BBST4. Por este motivo no se continuó con la selección y caracterización de las nuevas cepas aisladas, óptandose por realizar un análisis exhaustivo del potencial de la cepa *B. megaterium* BBST4 en la producción de PHAs.

2.4.2. Análisis del efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de PHA por la cepa *B. megaterium* BBST4.

La cepa *B. megaterium* BBST4 demostró tener la capacidad de utilizar todas las fuentes de nitrógeno y carbono probadas en medio salino mínimo (SW) (Tabla 1). Sin embargo, el almidón, el extracto de malta y el glicerol produjeron en general una zona de crecimiento más densa dentro de las 48 h de incubación, similar a lo observado con glucosa (control positivo). Además la cepa presentó muy baja frecuencia de

esporulación cuando se utilizó glicerol como fuente de carbono combinado con urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NH_4Cl como fuente de nitrógeno.

Tabla 2.1. Combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno y su efecto en la producción de PHA y en la esporulación por la cepa *B. megaterium* BBST4

Fuente de nitrógeno	Fuente de Carbono	Crecimiento*	PHA**	Esporas***
SWA-urea	Almidón	+++	+	SP-
	Glicerol	+++	+	SP-
	Extracto de malta	+++	+	SP+
	Petróleo Crudo	+	-	SP+
SWA- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Almidón	++	-	SP++
	Glicerol	++	+	SP-
	Extracto de malta	+++	+	SP++
	Petróleo Crudo	+	-	SP-
SWA- NH_4Cl	Almidón	++	+	SP+
	Glicerol	++	+	SP-
	Extracto de malta	+++	+	SP++
	Petróleo Crudo	-	ND	ND
SWA- NH_4NO_3	Almidón	+	-	SP+
	Glicerol	+++	+	SP+
	Extracto de malta	+++	+	SP++
	Petróleo Crudo	+	-	SP-

* (+++): crecimiento denso en 48 h, (++): crecimiento denso luego de 72 h, (+) pequeñas colonias, área difusa luego de 72 h, (-) sin crecimiento tras 72 h de incubación. ** (+): Presencia de gránulos de PHA en más del 50 % de las células tras 48 h de incubación, (-): presencia ocasional de granulos de PHA luego de 72 h de incubación *** Determinado por coloración de Shaeffer-Fulton (1933), (SP+): más del 50 % de las células esporularon después de 72 h de incubación, (SP++): más del 50 % de las células esporularon después de 48 h de incubación, (SP-): aparición ocasional de células esporuladas tras 72 h de incubación.

En función de los resultados obtenidos se seleccionaron el glicerol y la urea como una combinación promisoriosa de fuentes de carbono y nitrógeno dado que proporcionaron, en 48 h de cultivo, un crecimiento denso, con producción de PHA en más del 50 % de las células con aparición ocasional de células esporuladas tras 72 h de incubación.

Posteriormente, se determinaron los parámetros de crecimiento y la producción de PHA por parte de la cepa *B. megaterium* BBST4 en el medio seleccionado y en diferentes condiciones de cultivo. En la Tabla 2.2 se pueden observar los datos obtenidos para la biomasa y la producción de PHA a diferentes relaciones de C/N en el medio de cultivo, las cuales se consiguieron variando la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, agitación, y pH, se determinaron en estudios previos en nuestro laboratorio (Porras y col., 2011). En todas las condiciones ensayadas, la cepa alcanzó la fase estacionaria alrededor de las 18 h de incubación.

Tabla 2.2. Cultivo de la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 en un medio basal mínimo definido suplementado con distintas concentraciones de glicerol y urea (SWG).

Medio de cultivo	C/N	Biomasa (PSC) (g L ⁻¹)	PHA (%)
SWG (2 % glicerol)*	17,0	1,33 ± 0,10 ^a	12,9 ± 2,8 ^a
SWG (3 % glicerol)*	25,4	2,20 ± 0,20 ^b	13,2 ± 1,7 ^a
SWG (4 % glicerol)*	34,0	1,40 ± 0,10 ^a	8,6 ± 1,4 ^b
SWG (0,05 % urea)**	50,2	2,32 ± 0,10 ^b	13,1 ± 2,0 ^a
SWG (0,08 % urea)**	31,6	2,60 ± 0,19 ^b	20,4 ± 1,9 ^c
SWG (0,15 % urea)**	16,9	2,30 ± 0,10 ^b	11,0 ± 0,9 ^a

* 0,1 % urea. **3 % glicerol. Condiciones de cultivo: 30 h a 30 °C y 150 rpm

La cepa presentó una tasa media de crecimiento específico de $0,39 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ en todas las formulaciones del medio ensayadas y no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Además, en ninguna de las formulaciones se observaron células con endosporas durante el tiempo que duró la experiencia.

Una vez seleccionado el medio de cultivo más adecuado para la producción de PHA (3 % de glicerol y 0,08 % de urea) se estudió el efecto de la temperatura de incubación y el tiempo más adecuado para la recolección de PHA. La Figura 2.2 muestra los resultados obtenidos a 30 y 37 °C. En dicha figura sólo se muestra el comportamiento de la cepa desde las 18 h de cultivo, porque este es un tiempo cercano a la aparición de la fase estacionaria, cuando la acumulación de PHA comienza a ser significativa.

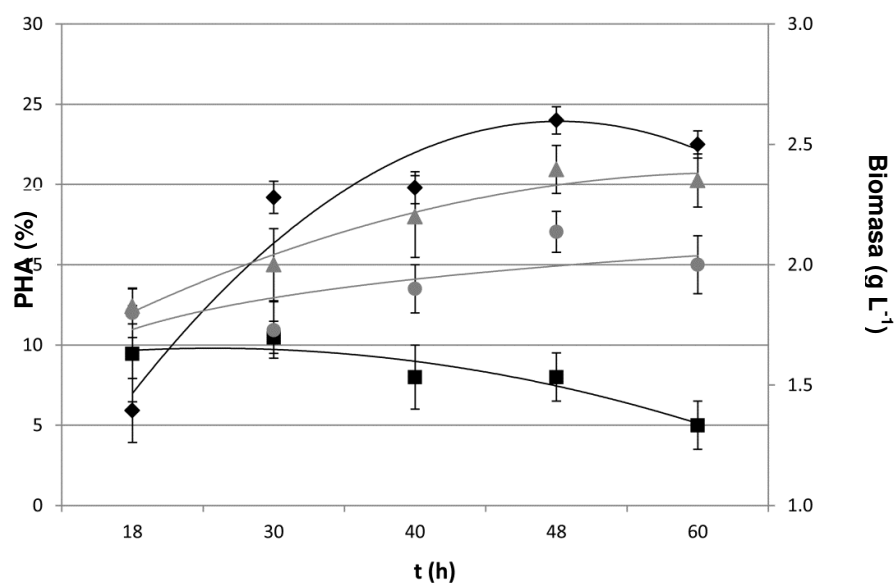


Figura 2.2. Influencia de la temperatura y el tiempo de cultivo en la producción de PHA. Símbolos: (◆) % PHA a T = 30 °C, (■) % PHA a T = 37 °C, (▲) Biomasa a T = 30 °C, y (●) Biomasa a T = 37 °C, las curvas representan las líneas de regresión o tendencia de los datos experimentales.

En la Tabla 2.3 se presentan los resultados obtenidos empleando el medio SWG (3 % de glicerol, 0,08% de urea), modificado con el añadido de bajas concentraciones de extracto de levadura. Se puede observar que un 0,005 % de EL favoreció significativamente la acumulación de PHA ($p < 0,01$), mientras que un 0,01 % de EL tuvo un efecto negativo en cuanto a la acumulación de PHA.

Puede observarse que, comparado con el control (sin agregado de extracto de levadura), la cepa presentó mejor crecimiento en medios con EL, aunque sólo una mejor producción de PHA con 0,005 % EL.

Tabla 2.3. Efecto de la adición de extracto de levadura en el crecimiento celular y la acumulación de PHA.

Medio de cultivo*	Biomasa (g L ⁻¹)	PHA (%)
0,00 % EL	2,55 ± 0,08 ^b	23,0 ± 1,0 ^c
0,005 % EL	3,80 ± 0,30 ^a	30,0 ± 1,5 ^b
0,010 % EL	2,90 ± 0,80 ^a	18,0 ± 2,0 ^a

*SWG (3 % glicerol, 0,08 % urea). Condiciones de cultivo: 48 h a 30 °C y 150 rpm.

2.5. DISCUSIÓN

Los espectros bacterianos que se registran en el IR medio son específicos de cada cepa bacteriana y muestran las características vibracionales de todos los componentes celulares: ácidos grasos, proteínas intracelulares y de membrana, polisacáridos y ácidos nucleicos (Kansiz y col., 2000, Dean y col., 2010, Naumann, 2000). Los espectros obtenidos a partir de las pastillas de KBr se normalizaron, a fin de eliminar las diferencias de peso entre las muestras, utilizando como referencia la banda característica de las proteínas a ~ 1654 cm⁻¹ (banda de amida I) (Amiel y col. 2000; Dziuba y col., 2007). Las pastillas de KBr se seleccionaron para la adquisición de espectros de cuantificación de PHA por ser el material transparente para IR más comúnmente utilizado el cual proporciona buena calidad de espectros (Smith, 2011). La presencia de PHA en el espectro de cada cepa liofilizada se detectó basándose en la presencia del pico característico entre 1720 y 1750 cm⁻¹ correspondiente a las señales de estiramiento del grupo éster C=O (Shahid y col., 2013). Los espectros de las nuevas cepas aisladas

presentaron una menor intensidad en el pico de PHA respecto al obtenido con la cepa *B. megaterium* BBST4, lo que puede atribuirse a una menor producción de este biopolímero. En función de este resultado se decidió no continuar con el análisis de las condiciones de cultivo de nuevas cepas para continuar con los estudios de las mejores condiciones de cultivo para la cepa *B. megaterium* BBST4 la cual presenta un mayor potencial como productor de PHAs.

Aunque existe una amplia información sobre *B. megaterium* como productor de PHAs, la cepa BBST4 es una nueva cepa obtenida de un ambiente de estuario, por lo que fue necesario recabar más información experimental acerca de las características nutricionales y de crecimiento con el fin de desarrollar su potencial en la producción de PHAs.

Las fuentes de carbono utilizadas en la prueba del auxonograma fueron seleccionadas debido a que son los componentes principales de algunos residuos industriales de nuestra región: a) almidón: industria de papas congeladas, producción de maíz, b) glicerol: industria del biodiesel, c) extracto de malta: industria de elaboración de cerveza, d) petróleo crudo: industria del petróleo (refinerías, transporte de petróleo crudo).

Las fuentes de carbono y nitrógeno afectaron en gran medida al proceso metabólico de crecimiento, producción de PHA y producción de esporas de la cepa. La formación de endosporas es un proceso multifásico, similar en todas las cepas de *Bacillus* spp., influido por la temperatura de crecimiento, el pH del medio, la aireación, la presencia de minerales y la presencia y concentración de ciertos compuestos de carbono y nitrógeno (Holt y col., 1994). El PHA producido sería utilizado durante la formación de esporas, ya que este aportaría la energía necesaria para llevar adelante el proceso y según algunos autores la esporulación es una de las causas de la baja

producción de PHA del género *Bacillus* (Wuy col., 2001). Por lo tanto, es importante seleccionar las condiciones del medio de cultivo que retrasen en mayor medida este proceso para optimizar la producción de PHA por un *Bacillus* sp.. El glicerol y la urea como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, fueron seleccionados para los ensayos, no sólo en relación a los aspectos fisiológicos indicados anteriormente, sino también desde el punto de vista económico. La urea es una de las fuentes más baratas de nitrógeno y el glicerol es un sub-producto generado por la industria del biodiesel, ambos producidos abundantemente en Argentina y particularmente en nuestra región.

La cepa *B. megaterium* BBST4 mostró ser capaz de crecer en un medio basal salino mínimo con todas las concentraciones de glicerol y urea ensayadas, sin la necesidad de adición de fuentes nutricionales complejas. El efecto de la relación molar C/N en los medios, usando una concentración de glicerol de 30 g/L, y variando la concentración de urea de 0,5 a 1,5 g/L, no presentó diferencias en el PSC. Sin embargo, la acumulación de PHA (% en peso) mostró ser significativamente mayor a una relación C/N de 31,6, que a las otras relaciones estudiada. Esta relación que podríamos considerar "óptima" y moderadamente desequilibrada, es coincidente con los resultados obtenidos por otros autores que utilizaron cepas de *Bacillus* spp. con otros sustratos (Kulpreecha y col., 2009). Sin embargo, como puede verse en la Tabla 2.2, en el medio donde la concentración de urea se fijó en 1 g/L, y se varió la concentración de glicerol, la relación C/N más desequilibrada (C/N:34) dio la menor producción de PSC y PHA, a pesar de que esta relación C/N fue similar a la relación "óptima" (obtenida con 30 g/L de glicerol y 0,8 g/L de urea, es decir, C/N:31,6). Estos resultados están en concordancia con los observados con la cepa *Bacillus* sp. RER002 (Zafar y col., 2014). Estos autores determinaron que la máxima producción de PHAs, dentro de un intervalo de concentraciones de glicerol de 10 a 40 g/L, se obtenía utilizando 30 g/L. Aunque

estos autores no explicaron el efecto negativo de concentraciones más altas de glicerol en la producción de PHA, se podría pensar que en concentraciones superiores al 30 %, el glicerol limita el crecimiento al generar la disminución de la actividad acuosa (a_w) del medio, elevando su osmolaridad (Halswort y Magan, 1997). Por otro lado a concentraciones bajas de urea el aumento en la producción de PHA observado puede deberse a que la fuente de nitrógeno se va agotando al acercarse a las 18 h de crecimiento, de forma similar a lo que parece suceder con la cepa *Alcaligenes* sp. después de 24 h de cultivo (Tripathi y col 2013), mientras que este hecho no se observa a concentraciones mayores de urea.

De la observación de las tinciones de las células al microscopio de luz clara se puede concluir que los cuerpos de inclusión de PHA proliferaron a lo largo de todo el cultivo, pero llegaron a presentar un tamaño máximo en la fase estacionaria.

Las cepas de *B. megaterium* han sido reportadas como mesófilas, con una temperatura óptima de crecimiento situada entre 30 y 37 °C (Kulpreecha y col, 2009; Schleifer, 2009; Ståhl y Olson, 1997; Thirumala y col. 2010; Todar, 2005; Zafar y col., 2014). Aunque la cepa estudiada en este trabajo presentó buen crecimiento a 37 °C (Figura 2.2), la PSC y la producción de PHA fue significativamente mayor a 30 °C, en coincidencia con los resultados obtenidos por Thirumala y col. (2010). Además, a esta temperatura la esporulación se ve disminuida. Estos resultados están también en concordancia con el hecho reportado por Prabhu y col. (2010), quien afirmó que la temperatura óptima para la actividad de la PHA sintasa es de 30 °C. La mayor acumulación de PHA a 30 °C fue observada después de 48 h de cultivo, por lo que podría proponerse como tiempo óptimo de crecimiento. Como ya se mencionó, la baja tasa de esporulación es otra de las ventajas del cultivo a 30 °C. Este resultado es interesante debido a que se ha informado que la acumulación máxima de PHA se

produce antes de la formación de esporas, y que este es degradado durante el proceso de esporulación (Kominék y Halvorson, 1965; Valappil y col., 2007).

El extracto de levadura (EL) es una mezcla de aminoácidos, péptidos, vitaminas y carbohidratos solubles en agua, que actúan como factores de crecimiento. Aunque la cepa *B. megaterium* no tiene requisitos nutricionales adicionales para el cultivo, la presencia de estos factores implicaría un ahorro de energía para los procesos de biosíntesis. Además, un requerimiento de EL a tan bajas concentraciones, no cambiaría significativamente las características económicas del medio. La adición de 0,005 % EL mejoró significativamente la producción de PHA. Por otro lado, la adición de EL en concentraciones mayores (0,01 %) no mejoró la producción de PHA. Esto es probablemente debido a que esta concentración de EL podría convertirse en un suministro adicional de nitrógeno, alterando así la relación C/N, y por consiguiente conducir a una condición menos favorable para la producción de PHA.

2.6. CONCLUSIONES

En esta etapa se aislaron bacterias potenciales productoras de PHAs de distintos medios. Empleando FTIR se obtuvieron los espectros de las células liofilizadas para determinar la acumulación de PHA siguiendo la banda característica del biopolímero en 1720-1750 cm^{-1} . Los picos típicos para el PHA resultaron, para todas las cepas aisladas en iguales condiciones y tiempos de cultivo, menores que el pico obtenido para el PHA producido por la cepa *B. megaterium* BBST4, previamente aislada en nuestro laboratorio. En función de este resultado se decidió no continuar con el aislamiento de nuevas cepas y proseguir con el estudio de la producción de biopolímeros empleando la cepa *B. megaterium* BBST4. Esta cepa demostró tener la capacidad de crecer a partir de distintas fuentes de carbono y nitrógeno. Si bien el hecho de ser una cepa esporógena

podría considerarse como una desventaja, se observó que la expresión de esta característica fue dependiente de las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas. Por lo que se seleccionó la urea como fuente de nitrógeno, almidón y glicerol como potenciales fuentes de carbono, ya que bajo esas condiciones nutricionales la cepa presentó muy baja esporulación en los tiempos utilizados para la producción de PHAs.

La composición del medio de cultivo más adecuada para la producción de PHAs fue la siguiente: 3 % p/v de glicerol, 0,08 % p/v de urea, y 0,005 % p/v de extracto de levadura, pH 8. Las condiciones de incubación en ensayos discontinuos para el máximo de producción de PHA fueron 30 °C y 150 rpm de agitación, durante 48 h. Además, las condiciones óptimas de fermentación encontradas previnieron la degradación del PHA, sin observarse indicios de esporulación, una vez que la producción máxima de PHA fue lograda. Este es considerado un punto de inflexión para el uso de las cepas de *Bacillus* spp. como productoras de PHA. La eficiencia de *B. megaterium* BBST4 para la producción de PHAs, en un sistema de bajo costo con glicerol y urea, sumado a las características del polímero obtenido, justifican la continuidad del trabajo con esta cepa para mejorar la producción de PHAs. Además, la producción de copolímeros abre las posibilidades del uso de esta cepa en la producción de polímeros para aplicaciones con mayor valor agregado, como las médicas y farmacéuticas.

2.7. REFERENCIAS

Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubié, M. C., Pichon, P., Travert, J. (2000) Potentiality of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Le Lait*, 80(4):445-459.

- Arcos-Hernandez, M. V., Gurieff, N., Pratt, S., Magnusson, P., Werker, A., Vargas, A., Lant, P. (2010) Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *J. Biotechnol.*, 150:372-379.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Foglia, T.A. (2004) Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. *J. Polym. Environ.*, 12:105-112.
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., Foglia, T. A. (2005) Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromol.*, 6:2106-2112.
- Beijerinck, M. W. (1889) L'auxanographic ou la method de l'hydrodiffusion dans la gelatine appliqueeaux recherches micro biologiques. *Arch. Neerl. Sci. Exact. Nat.*, 23:367-372.
- Bormann, E. J., Roth, M. (1999) The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *Biotechnol. Lett.*, 21:1059-1063.
- Bormann, E. J., Leihner, M., Roth, M., Beer, B., Metzner, K. (1998) Production of polyhydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* from protein hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50:604-607.
- Breed, R. S., Dotterer, W. D. (1916) The number of colonies allowable on satisfactory Agar plates. *J. Bacter.*, 1:321.
- Burdon, K. L., Stokes, J. C., Kimbrough, C. E. (1942) Studies of the common aerobic spore-forming Bacilli staining for fat with Sudan Black B-stain. *J. Bacter.*, 43:717-724.

- Cavalheiro, J. M., de Almeida, M. C. M., Grandfils, C., Da Fonseca, M. M. R. (2009) Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Proc. Biochem.*, 44(5):509-515.
- Chuah, J. A., Yamada, M., Taguchi, S., Sudesh, K. (2013) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. *Polym. Degrad. Stab.*, 98:331-338.
- Da Silva, G. P., Mack, M., Contiero, J. (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.*, 27(1):30-39.
- Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., Pittman, J. K. (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in fresh water microalgae. *Bioresour. Technol.*, 101:4499-4507.
- Dziuba, B., Babuchowski, A., Nałęcz, D., Niklewicz, M. (2007) Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Inter. Dairy J.*, 17(3):183-189.
- Halswort, H. J., Magan, N. (1997) Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (7):2435-2442.
- Helm, D., Helm, D., Naumann, D., Naumann, D. (1995). Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 126:75-79.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994) Endospore forming Gram-positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore USA, 559.

- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51(4):523-526.
- Jarute, G., Kainz, A., Schroll, G., Baena, J. R., Lendl, B. (2004) On-line determination of the intracellular poly(β -hydroxybutyric acid) content in transformed *Escherichia coli* and glucose during PHB production using stopped-flow attenuated total reflection FTIR spectrometry. *Anal. Chem.*, 76:6353-6358.
- Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., Mc Naughton, D. (2000) Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3415-3420.
- Kim, G. J., Yun, K. Y., Bae, K. S., Rhee, Y. H. (1992) Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes* sp. SH-69 in batch culture. *Biotechnol. Lett.*, 14:27-32.
- Kitamura, S., Doi, Y. (1994) Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnol. Tech.*, 8(5):345-350.
- Kominek, L. A., Halvorson, H. O. (1965) Metabolism of poly-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 90:1251-1259.
- Kulprecha, 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*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107:240-245.
- López Jiménez, J.A. (2011) Polímeros de interés industrial. síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

- Manna, A., Banerjee, R., Paul, A. K. (1999) Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil Streptomyces. *Curr. Microbiol.*, 39(3):153-158.
<http://doi.org/10.1007/s002849900437>
- Misra, A. K., Thakur, M.S., Srinivas, P., Karanth, N. G. (2000) Screening of poly- β -hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biotechnol. Lett.*, 22:1217-1219.
- Naumann, D. (2000) Infrared Spectroscopy in Microbiology, in Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers, Ed., John Wiley & Sons Ltd, pp 102-131.
- Ostle, A. G., Holt, J. G. (1982). Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(1), 238-241.
- Pochon, J. and Tardieu, L. (1962) Techniques d'analyse microbiologie du sol. De la Tourelle, Paris.
- Porras, M.A., Cubitto, M.A., Villar, M.A. (2011) Biosíntesis de poli(β -hydroxialcanoato)s por la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 empleando glicerol como fuente de carbono. IX Simposio Argentino de Polímeros, 166-169.
- Prabhu, N., Santimano, M., Mavinkurve, S., Bhosle, S., Garg, S. (2010) Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp. NQ-11/A2. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 97:41-50.
- Rohini, D., Phadnis, S., Rawal, S. K. (2006) Synthesis and characterization of poly- β -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. *Ind. J. Biotechnol.*, 5(3):276-283.
- Schaeffer, A. B., Fulton, M. (1933) A simplified method of staining endospores. *Sci.*, 77:194.
- Schleifer, K.H. (2009) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology SE - 3., 5:19-1317.

- Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P., Gaillard, J. L., Corroler, D. (2013) Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 302-308.
- Sindhu, R., Ammu, B., Binod, P., Deepthi, S. K., Ramachandran, K. B., Soccol, C. R., Pandey, A. (2011) Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54(4):783-794.
- Smith, B. C. (2011). Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy. CRC press.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M., Converti, A. (2005) Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243(1):217-224.
- Ståhl, S., Olsson, O. (1977) Temperature range variants of *Bacillus megaterium*. *Arch. Microbiol.*, 113, 221-223.
- Tan, G. Y., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., Wang, J. Y. (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3):706-754.
- 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. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 37:271-278.
- Todar, K. (2005) Todar's Online Textbook of Bacteriology: The Genus *Bacillus*. Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, USA.

- Tripathi, L., Wu, L. P., Chen, J., Chen, G. Q. (2012) Synthesis of diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate-block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a β -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. *Microb. Cell Fact.*, 11:1-11.
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T. (2007) Large-scale production and efficient recovery of PHA with desirable material properties, from newly characterized *Bacillus cereus* SPV. *J. Biotech.*, 132:251-258.
- Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M., Mahmood, S. K. (2009) Production of PHB and P(3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(3):391-397. <http://doi.org/10.1007/s11274-008-9903-3>
- 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.
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., Agrawal, J., Dhiman, A. K. (2014) Valorization of glycerol into polyhydroxyalkanoates by sludge isolated *Bacillus* sp. RER002: Experimental and modeling studies. *Chem. Prod. Proc. Model.*, 9(2):117-131.

CAPÍTULO 3. Optimización de la producción de PHA por parte de la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 utilizando almidón como fuente de carbono.

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 La cepa utilizada

Las cepas de *Bacillus* spp. tienen algunas características interesantes para ser empleadas en distintas aplicaciones industriales, tales como bajos requerimientos nutricionales, crecimiento rápido, tolerancia osmótica, entre otras (Schleifer, 2009). Además producen gran variedad de exoenzimas, tales como proteasas, amilasas, xilenasas, lo cual permite la utilización de diversos sustratos complejos y económicos. Una característica distintiva de este género es la capacidad de producir endosporas, lo cual le brinda una notable capacidad de sobrevivir a condiciones adversas siendo una ventaja a la hora de preservar las cepas. En estas bacterias el proceso de esporulación suele suceder en el punto máximo de acumulación de PHA, siendo luego degradado durante la esporulación. Por este motivo, en cepas de *Bacillus* spp. se hace necesario determinar las condiciones óptimas de crecimiento en las que se logren producir altas concentraciones de PHA minimizando la esporulación.

3.1.2 Superficie de respuesta con diseño central compuesto y deseabilidad

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas estadística y matemáticas para el desarrollo, mejora y optimización de procesos (Talebpour et al., 2009). Por otra parte, es una valiosa herramienta para investigar la interacción entre factores y representar cuantitativamente los efectos de los parámetros

utilizados en la medida de sus respuestas (Bezerra y col., 2008; Hatambeygi y col., 2011). A través de una serie de experimentos y como resultado de ecuaciones de regresión de alta precisión se consigue describir la relación entre los parámetros y las respuestas. Esto permite obtener respuestas óptimas y los valores de los parámetros experimentales asociados a las mismas. A partir de la MSR también pueden ser evaluados con eficacia múltiples factores y sus interacciones (Switzar y col., 2011; Yuan y col., 2015). Para determinar las mejores interacciones y optimizar simultáneamente múltiples ecuaciones se utilizan las funciones de deseabilidad definidas por Derringer y Suich (1980).

3.1.3 Software estadístico: R

Nacido en el año 1992, R (Ihaka y Gentleman, 1996) es un programa estadístico oficialmente presentado en 1997. Es un lenguaje de programación de uso libre y se rige por la licencia general pública (“General Public License” o GPL) de la fundación de software libre (“Free Software Foundation” o GNU, <http://www.gnu.org/>) y por lo tanto de distribución gratuita y código abierto, con una amplia variedad de métodos estadísticos, computacionales y de visualización disponibles (Huber, 2011). Desarrollado como un gran proyecto colaborativo de estadísticos de diversos países y disciplinas que aumenta exponencialmente año tras año, también es un programa basado en comandos, en el que se puede acceder a todos los procedimientos y opciones a través de sintaxis computacional (Salas, 2008). Detalles más específicos, así como una comparación con otros paquetes estadísticos, se presentan en el **Anexo 1**.

3.1.4 Variables de optimización

Distintas variables influyen en la producción de PHAs, tales como el tipo de microorganismo, la duración de la fermentación, la relación de crecimiento, la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, entre otras (Shahid et al., 2013). El almidón es una fuente de carbono interesante ya que es un sustrato renovable, abundante y económico. Entre los trabajos de optimización de procesos de producción de PHAs se han utilizado como variables el almidón en *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus cereus* CFR06 (Kim, 2000; Halami, 2008), el extracto de levadura en *Bacillus megaterium* JK4h (Dhangdhariya, 2015) y el tiempo de cultivo, que representa una medida indirecta de la duración de la fermentación y la relación de crecimiento, en *Thermus thermophilus* HB8 (Papaneophytou y Kyriakidis, 2012). Estas variables han sido empleadas cada una junto a otras variables independientes, pero tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva el presente trabajo sería el primero en el que estas tres variables son utilizadas en conjunto para optimizar procesos de producción de PHAs.

3.1.5 Modelado matemático

En los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio del modelado de la producción de biopolímeros a partir de procesos de fermentación. Este aspecto se atribuye principalmente a la necesidad imperiosa de lograr abordar los principales problemas relacionados con la producción de PHAs. Con el fin de mejorar el rendimiento y la productividad de estos biopolímeros y reducir el costo de producción, diversos autores han propuesto diferentes modelos para fermentaciones batch y semi-batch (Mulchandani y col., 1989; Raje y Srivastava, 1998; Khanna y Srivastava, 2006; Faccin y col., 2009; López y col., 2010).

3.2 OBJETIVOS

Basados en el enfoque presentado anteriormente se propusieron para este trabajo varios objetivos utilizando la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 aislada de sedimentos del estuario de Bahía Blanca:

- 1) Optimización de la producción de PHA por la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 empleando almidón como fuente de carbono.
- 2) Empleo de la metodología de superficie de respuesta (MSR) como herramienta estadística de diseño experimental
- 3) Modelado matemático para la simulación de procesos biológicos

3.2.1 Optimización de la producción de PHA por la cepa *Bacillus megaterium* BBST4

Inicialmente y por medio de las metodologías de superficie de respuesta (MSR) y deseabilidad, se optimizaron los objetivos definidos a continuación en base a un diseño experimental central compuesto (DCC).

3.2.2 Metodología de superficie de respuesta (MSR) como herramienta estadística de diseño experimental

Por medio de la MSR y la deseabilidad se planteó: a) Determinar las mejores relaciones C/N para optimizar a corto plazo la producción de PHA empleando almidón y urea como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, utilizando un medio base salino de bajo costo y b) Determinar si el extracto de levadura a bajas concentraciones estimula la degradación del almidón para lograr una mayor producción de PHA en el menor tiempo de cultivo posible.

3.2.3 Modelado matemático como herramienta para la simulación de procesos biológicos

Finalmente se trabajó en la optimización de la producción de PHA por *B.megaterium* BBST4 proponiendo un modelo que contemple las variables dependientes que se describen en la MSR para las condiciones deseables determinadas. También se llevó a cabo la estimación de parámetros con el fin de ajustar el modelo implementado a los datos experimentales obteniéndose una cinética para la producción de PHA en un sistema batch.

3.3 MATERIALES Y METODOS

3.3.1 Microorganismo y medio de cultivo

La cepa bacteriana utilizada en el presente trabajo fue aislada de sedimentos del estuario de Bahía Blanca (situado en la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires, Argentina, entre 38° 42' y 39° 26' S y 62° 28' y 61° 40' W). De acuerdo con las pruebas bioquímicas y el análisis de 16S rDNA, se trata de una cepa de *Bacillus megaterium* (GenBank: número de acceso HM119600.1), la cual fue denominada BBST4. La cepa fue conservada a -70 ° C en caldo Tripticasa-soja (Britania B0210206, Argentina) con un 20 % de glicerol.

El medio de cultivo utilizado en este estudio fue una solución salina de Winogradsky (SW) (Pochon y Tardieu, 1962) (**Anexo B**), con un pH final de 8, ajustado con solución NaOH 1 N.

Se seleccionó almidón como fuente de carbono por ser un sustrato proveniente de fuentes renovables, abundante y económico. Según el diseño experimental descrito en el siguiente inciso, la SW se complementó con almidón (Anedra, Argentina) y urea (Anedra, Argentina) (SWS), ya que con esta combinación, además de observarse un

buen crecimiento de la cepa, se determinaron una muy baja frecuencia de esporulación tras 72 h de cultivo y un porcentaje de células mayor al 50 % con gránulos de PHA tras 48 h de cultivo (Capítulo 2, inciso 2.4.2). La SWS con el agregado de 12 g/L agar-agar ultrapuro (SWSA) (Merck, Alemania), fue utilizada para el crecimiento de la cepa en medio sólido. Todas las soluciones fueron preparadas con agua bidestilada. La SW se autoclavó a 1 atm durante 15 min, mientras que las soluciones de almidón, urea y elementos traza fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana con 0,22 micras de poro (Merck-Millipore, Brasil) y fueron añadidos asépticamente al medio. Las incubaciones fueron realizadas en un agitador Gerhardt SW 20 (Dinamarca) con baño termostatzado.

3.3.2 Cultivo en Erlenmeyer

Para los experimentos, la cepa *B. megaterium* BBST4 mantenida a -70 °C fue recuperada en caldo Trypticasa-soja e incubada a 30 °C en un agitador orbital durante 24 h. De este caldo se tomó una alícuota por medio de un ansa estéril la cual fue transferida a una placa con SWSA (con 1 % de almidón y 0,08 % de urea). La placa fue incubada durante 48 h a 30 °C. Una colonia fue tomada con ansa estéril y transferida a un Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de SWS (con 1 % de almidón y 0,08 % de urea), el Erlenmeyer fue incubado a 30 °C y 150 rpm durante 48 h. Las células fueron recogidas mediante centrifugación (Rolco CM 4080, Argentina) durante 15 min a 2.000 g, se lavó dos veces con solución salina (NaCl 0,85 % p/v), y finalmente se suspendió en la misma solución. La densidad óptica de esta suspensión celular fue ajustada a una absorbancia de 0,2 a 550 nm (DO550) correspondiente a 10⁸ unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) utilizando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, EE.UU.). La suspensión de células resultante fue utilizada como inóculo para los experimentos.

Erlenmeyer estériles de 250 mL fueron preparados con 100 mL de SW y los sustratos y tiempos de cultivo fueron determinados por MSR (**Tabla 3.1**). Cada Erlenmeyer fue inoculado con 1 mL de la suspensión celular, obteniendo una densidad celular final de 10^6 UFC/mL. Los experimentos fueron diseñados para generar superficies de respuesta para evaluar los efectos sobre cuatro variables dependientes (Y): acumulación de PHA (Y_1), crecimiento celular (Y_2), consumo de almidón (Y_3) y variación de pH (Y_4). Se emplearon tres variables independientes (X) en el diseño de los experimentos: X_1 (C/N), relación carbono:nitrógeno utilizada en el medio de cultivo experimental, con la variación de la concentración de almidón en relación a la concentración constante de la fuente de nitrógeno (urea); X_2 (EL), concentración de extracto de levadura y X_3 (Tc), tiempo final de crecimiento de la cepa en la muestra. El extracto de levadura fue utilizado en muy bajas concentraciones, en comparación con su concentración habitual en medios de cultivo. La idea fue generar el aporte de elementos traza/factores de crecimiento no presentes en el medio SW que estimulen la hidrólisis de almidón para conseguir una mayor producción de PHA a menores tiempos. Las diferentes condiciones de cultivo se llevaron a cabo de acuerdo con un diseño ortogonal central compuesto de cinco niveles en bloques (DCC), este sigue un tratamiento factorial 2^3 con 7 repeticiones en el punto central más 6 puntos axiales.

Incluso cuando la cepa y las condiciones experimentales son las mismas, se debe considerar que se trata de un proceso biológico, por lo que pequeños cambios, ya sea en el equipo o en los inóculos pueden producir ligeras variaciones en los resultados. Por lo tanto, para incluir estas variaciones y obtener así resultados más consistentes, se realizaron tres bloques de experimentos (**Tabla 3.1**). Se llevaron a cabo un total de 21 ensayos y cada experimento se realizó por triplicado (para tener en cuenta el error experimental interno).

3.3.3 Variables de optimización

3.3.3.1 Producción de PHA (Y_1). La extracción de PHA fue llevada a cabo utilizando una técnica modificada de la extracción con cloroformo descrita por Manna y col. (1999) y Valappil y col. (2007). Las células liofilizadas obtenidas de cada muestra fueron lisadas por medio de digestión química con solución de hipoclorito de sodio (5,5 % v/v en agua) a 37 °C por 1 h con agitación constante, centrifugadas a 6.000 g y el residuo obtenido fue lavado dos veces con agua destilada, acetona y etanol, sucesivamente. El pellet así obtenido fue sujeto a extracción con cloroformo en ebullición durante 15 minutos. Luego, el PHA disuelto fue purificado por precipitación con hexano y recuperado por filtración y evaporación del solvente. La producción de PHA fue referenciada como peso (en g/L) en la muestra de células liofilizadas.

3.3.3.2 Crecimiento celular (Y_2). Las experiencias fueron llevadas a cabo en un incubador con agitación a 30 °C y 150 rpm. El crecimiento celular fue determinado al final de cada experimento de acuerdo al DCC (**Tabla 3.1**). El volumen de cada Erlenmeyer fue centrifugado a 2.000 g por 15 min con el fin de recoger todas las células de la muestra. El pelet acumulado fue lavado dos veces con agua destilada y finalmente liofilizado (RIFICOR L-A-B3-C, con una bomba de vacío WELCH 1402). Posteriormente el peso celular liofilizado (en g/L) fue determinado por medio de una balanza analítica de 5 dígitos (Mettler AE 163, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, UK). La biomasa liofilizada resultante fue empleada para la extracción del PHA como fue descrito anteriormente. Complementaria-mente a los datos de peso celular y para obtener la curva general de crecimiento de cada condición del DCC, en todas las

experiencias se monitoreó el crecimiento celular a varios tiempos a lo largo de aproximadamente 50 h por medio de la densidad óptica (a 550 nm).

3.3.3.3 Consumo de almidón (Y_3). El contenido de almidón residual en el medio de cultivo fue determinado midiendo espectroscópicamente la absorción de luz del complejo coloreado iodo-almidón (Nakamura, 1981) (**Anexo B**). Para esta determinación fue utilizado 1 mL de la muestra con el agregado de 0,1 mL de solución de yodo (Britania, Argentina), y la cantidad necesaria de agua destilada para llevar el volumen a 10 mL. La intensidad del color se midió en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, EE.UU.) a 550 nm (Subramaniam, 2012). El almidón forma un complejo de color azul oscuro al interactuar con las molécula de yodo y la intensidad del color generado es directamente proporcional a la cantidad de almidón presente en la solución (Najafpour y Poi Shan, 2003).

3.3.3.4 Variación de pH (Y_4). Se midió el pH final de cada experimento para determinar la variación de pH (ΔpH_i) por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta pH_i = pH_0 - pH_i \quad (1)$$

Donde pH_0 es el pH inicial de la muestra, el cual fue fijado en 8, y pH_i es el pH final.

3.3.4 Esporulación

El porcentaje de células esporuladas fue determinado por medio del método de tinción de Shaeffer-Fulton (1933). Las coloraciones fueron observadas utilizando un objetivo de inmersión de 100x.

3.3.5 Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos a partir del DCC fueron analizados empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR) y la optimización multivariada utilizando el software R (R Core Team, 2015) con los paquetes *rsm* y *desirability*, respectivamente, siguiendo los tres pasos descriptos a continuación:

3.3.5.1 Primer paso. Codificación de los factores. En este paso son codificados los niveles de los factores. Es fundamental una adecuada codificación para el análisis por medio de MSR (Lenth, 2010), lo que proporciona un marco uniforme para poder investigar los efectos producidos por los factores (**Tabla 3.1**). Los niveles codificados en un diseño factorial 2^k están dados por:

$$X_i = \frac{(A_i - \bar{A})}{D} \quad (2)$$

Donde A_i es el i ésimo nivel del factor A , \bar{A} es el nivel promedio del factor A y

$$D = \frac{1}{2} (A_2 - A_1).$$

3.3.5.2 Segundo paso. Diseño central compuesto. en este paso fue generado el diseño central compuesto (DCC-MSR) necesario para aplicar el MSR, que incluyó a los bloques del diseño, y fue analizada su función de varianza. Los bloques en un DCC son de dos tipos: un bloque en “cubo”, el cual contiene los puntos del diseño a partir de un

diseño factorial de dos niveles o factorial fraccionado, más puntos centrales y un bloque en “estrella”, el cual contiene puntos axiales más puntos centrales. A partir del DCC definido fueron determinados los modelos de superficie de respuesta y ajustados utilizando la función *rsm* (**Anexo A**). La fórmula del modelo para *rsm* puede hacer uso de las funciones especiales *FO* (primer orden), *TWI* (interacción entre variables), *PQ* (cuadrática pura) o *SO* (segundo orden), dado que las mismas especifican la porción de superficie de respuesta del modelo. A pesar de ello, la función principalmente utilizada es *SO* debido a que la ecuación polinomial de segundo orden presenta la ventaja de incluir los términos *FO*, *TWI* y *PQ* (Lenth, 2010). La función *SO* está definida por la siguiente ecuación:

$$Y_i = \beta_o + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (3)$$

Donde Y_i son las variables dependientes, β_o el término independiente, β_i el coeficiente lineal o de primer orden, X_i y X_j las variables independientes, β_{ij} el coeficiente de interacción y β_{ii} el coeficiente cuadrático. Todas estas variables están incluidas en la función *rsm*, incorporando la influencia de los bloques (Lenth, 2010).

Para estimar los parámetros estadísticos de cada variable dependiente y la superficie de respuesta correspondiente, se realiza con la función *rsm* un análisis de regresión seguido de un análisis de la varianza (ANOVA) y de una prueba de falta de ajuste. Para ajustar los datos experimentales de los experimentos definidos para la MSR se utilizó una ecuación polinomial de segundo orden. La significación de cada ecuación del modelo y los términos del mismo fueron evaluados por medio del test-F. La calidad de ajuste para la ecuación polinomial fue expresada por medio del coeficiente de determinación ajustado (R^2) (Lenth, 2010; Dhangdhariya y col., 2015). La ecuación

polinómica ajustada se expresó utilizando representaciones gráficas de superficie en tres dimensiones, de esta manera se visualizaron las relaciones entre las respuestas y los niveles experimentales de cada factor utilizados en el diseño.

Para el análisis estadístico se empleó el software R por ser software libre y además porque el paquete *rsm* posee mejores capacidades en la creación general de DCC que los programas comerciales dedicados (Lenth, 2010).

3.3.5.3 Tercer paso. Buscando las condiciones deseables. En este paso nos focalizamos en la respuesta de la variable PHA (Y_1) en base a las condiciones de los tres niveles principales de los factores (+1, 0, -1). Para determinar las mejores interacciones fue empleado el enfoque de la función de deseabilidad, que permite optimizar simultáneamente múltiples ecuaciones, propuesto por Harrington (1965) utilizando formas funcionales (Kuhn, 2015) descritas por Derringer y Suich (1980). En esencia, el enfoque consiste en traducir las funciones a una escala común ([0, 1]), combinarlas utilizando la media geométrica y optimizar la métrica general. Existen I funciones a optimizar simultáneamente, denotadas $f_i(x)$ con $i = 1, \dots, I$ y para cada una de las funciones I se construye una función de “deseabilidad” individual. Esta será alta cuando $f_i(x)$ se encuentra en el nivel deseable (como ser un máximo, un mínimo o un valor objetivo) y baja cuando $f_i(x)$ se encuentra en un valor no deseable (Kuhn, 2015). La deseabilidad fue determinada por medio del paquete *desirability* para el software R basado en tres funciones discontinuas simples definidas por Derringer y Suich (1980) las cuales corresponden al tipo de optimización de un objetivo. Para la maximización de $f_i(x)$, la función propuesta es:

$$d_i^{max} = \begin{cases} 0 & \text{si } f_i(x) < A \\ \left(\frac{f_i(x) - A}{B - A} \right)^s & \text{si } A \leq f_i(x) \leq B \\ 1 & \text{si } f_i(x) > B \end{cases} \quad (1)$$

Donde $f_i(x)$ son las I funciones a optimizar simultáneamente, y representan las Y_i variables dependientes o de respuesta. A es el valor límite superior de la respuesta Y_i , B es el valor límite inferior para esta respuesta, y s es un parámetro de escala que representa el peso o importancia que define la forma de la curva de la función. Este parámetro permite definir si la deseabilidad es más fácil o más difícil de satisfacer para la variable Y_i en relación a la deseabilidad a satisfacer para las demás respuestas. Cuando $s = 1$ la función es lineal. Si $s > 1$ se da mayor importancia a la consecución del objetivo para la variable Y_i por sobre las demás propuestas. Cuando $s < 1$, se asigna menor importancia a la consecución del objetivo por parte de la variable Y_i .

Cuando la ecuación es utilizada para minimizar, Derringer y Suich (1980) proponen:

$$d_r^{min} = \begin{cases} 0 & \text{si } f_r(x) > B \\ \left(\frac{f_r(x) - B}{A - B} \right)^s & \text{si } A \leq f_r(x) \leq B \\ 1 & \text{si } f_r(x) < A \end{cases} \quad (2)$$

Y para el objetivo

$$d_r^{obj} = \begin{cases} \left(\frac{f_r(x) - A}{t_0 - A} \right)^{s_1} & \text{si } A \leq f_r(x) \leq t_0 \\ \left(\frac{f_r(x) - B}{t_0 - B} \right)^{s_2} & \text{si } t_0 \leq f_r(x) \leq B \\ 0 & \text{si } B < f_r(x) < A \end{cases} \quad (3)$$

Donde t_0 es el valor objetivo para la variable Y_i . Estas funciones están en la misma escala y son discontinuas en los puntos A , B y t_0 . Los valores de s , s_1 o s_2 pueden ser elegidos según si el criterio de deseabilidad es más o menos difícil de satisfacer.

Dado que las R funciones de deseabilidad (d_1, \dots, d_R) están en la escala $[0,1]$, pueden ser combinadas para encontrar una función D de deseabilidad general. Un método para conseguirlo es por medio de la media geométrica:

$$D = \left(\prod_{r=1}^R d_r \right)^{1/R} \quad (4)$$

La media geométrica tiene la propiedad de que si algún modelo no es deseable ($d_r = 0$), la deseabilidad general es también inaceptable ($D = 0$).

Una vez que se ha definido D y las ecuaciones de predicción para cada una de las R funciones han sido calculadas, puede usarse para optimizar o clasificar los predictores. Todas las variables descritas están incluidas en las funciones del paquete *desirability* (Kuhn, 2015).

Para maximizar la deseabilidad general fue utilizado el método simplex de Nelder-Mead (1965) y una región de diseño cúbico.

En un último paso se modelaron las mejores interacciones de deseabilidad y se concluyó con una nueva experiencia para corroborar y validar las respuestas obtenidas (Figura 3.5). Las condiciones óptimas determinadas para las 4 variables fueron ajustadas con el software gPROMS (Process Systems Enterprise Limited, London, United Kingdom) con la intención de modelar la cinética de producción de PHAs por parte de la cepa estudiada.

3.3.6 Modelo propuesto para la producción de PHA por *Bacillus megaterium* BBST4

3.3.6.1 Cinética y estequiometría del modelo. En este trabajo se plantea una cinética que contempla una combinación de diferentes aspectos de modelos desarrollados por otros autores (Mulchandani y col., 1989; Patwardhan y Srivastava, 2004; Khanna y Srivastava 2005; Faccin y col. 2012). El objetivo principal fue formular un modelo apropiado que pueda representar los datos experimentales obtenidos para la cepa

utilizada en el estudio. El proceso de fermentación se representa mediante un sistema de ecuaciones diferenciales algebraicas (DAE).

En cuanto a las suposiciones hechas por Patwardhan y Srivastava (2004), la biomasa total (X) se expresa como la contribución de dos componentes: la biomasa residual (R), que es considerada como el componente catalíticamente activo, y la concentración de biopolímero (P) considerado como el componente inerte.

$$X = R + P \quad (8)$$

Debido a que *Bacillus megaterium* generalmente produce PHAs cuando hay un exceso de fuente de carbono, la ecuación de la cinética de crecimiento sólo considera el término de limitación de fuente de nitrógeno.

$$\mu = \mu_M \left(\frac{S_2}{K_{S_2} + S_2} \right) \quad (9)$$

La biomasa residual puede ser considerada como el conjunto de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares de los microorganismos con la exclusión de la acumulación de polímero intracelular. La ecuación de la tasa de producción de biomasa residual presenta el parámetro de muerte celular para el caso en que las bacterias alcancen la fase de muerte. También presenta una constante de ajuste, que suprime el parámetro anterior, que es considerado en caso de que el estudio es llevado a cabo hasta la fase estacionaria.

$$\frac{dR}{dt} = (\mu - k_d) R + a \quad (10)$$

Las ecuaciones de balance de masa utilizadas para la producción de polímero junto con las ecuaciones correspondientes a los sustratos son las propuestas por

Mulchandani y col. (1989) y Khanna y Srivastava (2005) con algunos parámetros adicionales que permiten un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos para el presente trabajo.

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \frac{dR}{dt} + k_2 R \quad (11)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = - \left(k_3 \frac{dR}{dt} + k_4 \frac{dP}{dt} + k_5 R + bS_2 + cS_1 \right) \quad (12)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -k_6 \frac{dR}{dt} \quad (13)$$

Por último, para representar los datos de pH del medio, se decidió incluir dos ecuaciones: la primera es una ecuación diferencial similar a la propuesta por Faccin y col. (2012) que representa la concentración de iones hidrógeno en el medio de cultivo líquido, y la segunda es el logaritmo decimal del valor recíproco de la concentración de iones hidrógeno.

$$\frac{dH}{dt} = (k_{pH1} \mu + k_{pH2}) X H \quad (14)$$

$$pH = -\log_{10}(H) \quad (15)$$

3.3.6.2 Estimación de parámetros y calibración del modelo. La estimación de parámetros fue formulada como un problema de optimización dinámica usando la formulación de máxima probabilidad empleando el software gPROMS. Este tipo de criterios intenta determinar el valor de los parámetros del modelo que maximicen la probabilidad de que el modelo se ajuste a los valores obtenidos a partir de los experimentos. En el presente trabajo se utilizó la siguiente ecuación para llevar a cabo la estimación de los parámetros del modelo.

$$\Omega(\theta) = \frac{N}{2} \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV_i} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \left[\ln(\sigma_{ijk}^2) + \frac{(z_{ijk}^* - z_{ijk})^2}{\sigma_{ijk}^2} \right] \right\} \quad (16)$$

Con el fin de mostrar la bondad de ajuste del modelo implementado con los datos observados fueron determinados el error medio (*EM*) y el error relativo (*ER*). El primero da información relacionada con la sobreestimación o subestimación del modelo y el segundo está asociado a su exactitud o precisión.

$$EM = \frac{\sum_{i=1}^{n_{obs}} (y_i - \hat{y})}{n_{obs}} \quad (17)$$

$$ER = \frac{\sum_{i=1}^{n_{obs}} |y_i - \hat{y}|}{\sum_{i=1}^{n_{obs}} y_i} \quad (18)$$

Se calculó el índice de coherencia (*d*) propuesto por Willmott (1981). Este índice representa una medida del grado en que las predicciones de un modelo en particular están libres de errores. Puede variar entre 0 y 1, donde 1 indica una coherencia perfecta entre las observaciones y las predicciones dadas por el modelo y 0 indica que no existe coherencia en absoluto.

$$d = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{obs}} (y_i - \hat{y})^2}{\sum_{i=1}^{n_{obs}} (|\hat{y} - \bar{y}| + |y_i - \bar{y}|)^2} \quad (19)$$

Con la intención de verificar la exactitud del modelo y representar adecuadamente los datos experimentales, la validación del modelo se llevó a cabo utilizando un

conjunto de datos independientes evaluando el desempeño de los modelos finales por medio de los errores medios y relativos descriptos anteriormente.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Variables de optimización

En la **Tabla 3.1** se presenta el esquema del DCC implementado. Se presentan las variables independientes sin codificar y las codificadas, las concentraciones de almidón (C) y urea (N) empleadas, los bloques de experimentos y el número de corrida para cada experimento. También son presentados los resultados experimentales para la variable dependiente PHA, incluyendo los desvíos estándar.

3.4.1.1 Producción de PHA (Y_1). En la **Tabla 3.1** se pueden observar los resultados de producción de PHA para todas las experiencias del DCC. Para las relaciones C/N de 6,25 y 0,08 g/L EL en relación a lo obtenido con 0,02 g/L EL se obtuvo un 2 % más de PHA (0,0070 g/L).

Las mayores concentraciones de PHA para la relación C/N de 6,25 se obtuvieron a las 18 h, mientras que para la mayor relación C/N empleada (18,75) fueron obtenidas a las 78 h, con un incremento del 22 % de PHA en relación a lo obtenido a las 18 h (0,0909 g/L). Sin embargo, con una relación C/N de 18,75 se obtuvo en 18 h de cultivo solo un 1 % más de PHA en relación al mejor resultado obtenido a las 18 h con la relación C/N de 6,25.

La mayor producción de PHA se obtuvo con el agregado de extracto de levadura (EL) en concentraciones de 0,08 y 0,02 g/L para la menor y mayor relación C/N estudiadas, 6,25 y 18,75, respectivamente.

3.4.1.2 Crecimiento celular (Y_2). En la **Figura 3.1** se presentan las curvas de crecimiento a partir de la DO (550 nm) para la cepa en las experiencias definidas para el DCC. En todos los cultivos la cepa parece llegar a la fase estacionaria entre las 18 y las 24 h, salvo en $C/N = 12,5$ y $EL = 0,05$ g/L y $C/N = 18,75$ y $EL = 0,08$ g/L en los que el crecimiento exponencial parecería prolongarse hasta al menos las 48 h. Sólo con $C/N = 6,25$ parece llegar a la fase estacionaria a tiempos menores, cercanos a las 18 h. Este momento coincide con el fin de la pendiente de máximo consumo de almidón y con los máximos valores de producción de PHA, observados para $C/N = 6,25$ con ambas concentraciones de EL (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Diseño experimental (DCC) definido para aplicar la MSR.

Exp.	Orden	Bloque	C (g/L)	N (g/L)	Variables Naturales			Variables Codificadas			PHA (g/L)	DE (\pm)
					C/N	EL (g/L)	Tc (h)	X1	X2	X3		
1	1	1	15	0,8	18,75	0,02	78	1	-1	1	0,510	0,017
2	2	1	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,210	0,007
3	3	1	15	0,8	18,75	0,08	18	1	1	-1	0,180	0,006
4	4	1	5	0,8	6,25	0,02	18	-1	-1	-1	0,409	0,006
5	5	1	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,282	0,005
6	6	1	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,249	0,004
7	7	1	5	0,8	6,25	0,08	78	-1	1	1	0,174	0,002
8	1	2	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,218	0,002
9	2	2	15	0,8	18,75	0,08	78	1	1	1	0,280	0,002
10	3	2	5	0,8	6,25	0,02	78	-1	-1	1	0,151	0,005
11	4	2	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,200	0,006
12	5	2	15	0,8	18,75	0,02	18	1	-1	-1	0,419	0,009
13	6	2	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,261	0,001
14	7	2	5	0,8	6,25	0,08	18	-1	1	-1	0,416	0,001
15	1	3	17	0,8	21,34	0,05	48	1,414	0	0	0,272	0,010
16	2	3	10	0,8	12,50	0,05	6	0	0	-1,414	0,062	0,003
17	3	3	10	0,8	12,50	0,0*	48	0	-1,414	0	0,284	0,010
18	4	3	3	0,8	3,66	0,05	48	-1,414	0	0	0,184	0,006
19	5	3	10	0,8	12,50	0,05	48	0	0	0	0,197	0,001
20	6	3	10	0,8	12,50	0,05	90	0	0	1,414	0,052	0,002
21	7	3	10	0,8	12,50	0,09	48	0	1,414	0	0,212	0,007

* Control

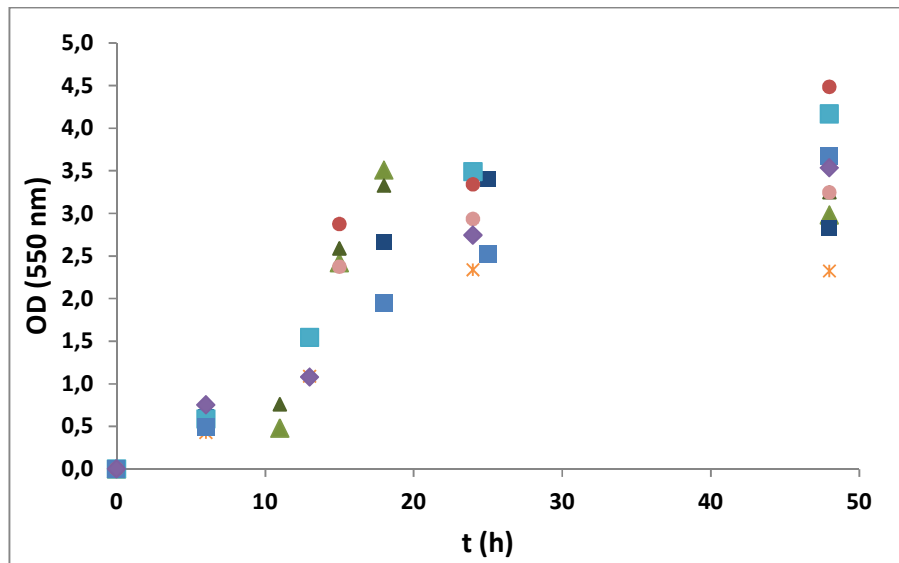


Figura 3.1. Crecimiento celular (expresado en DO) en función del tiempo.

Símbolos: (*) C/N = 3,66 y EL = 0,05 g/L, (▲) C/N = 6,25 y EL = 0,02 g/L, (▲) C/N = 6,25 y EL = 0,08 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0,05 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0,1 g/L, (●) C/N = 18,75 y EL = 0,02 g/L, (●) C/N = 18,75 y EL = 0,08 g/L, (◆) C/N = 21,34 y EL = 0,05 g/L.

3.4.1.3 Consumo de Almidón (Y_3). En la **Figura 3.2** se presentan las curvas de concentración de almidón disuelto en función del tiempo para las experiencias definidas en el DCC, lo que indica el progreso de la hidrólisis y consumo del almidón por parte de la cepa. Se puede observar que para las menores relaciones de C/N el consumo casi total del almidón se produce antes de las 18 h; para las relaciones de C/N de 12,5 el mayor consumo de almidón se daría antes de las 25 h, mientras que para las mayores relaciones de C/N utilizadas en este trabajo la degradación del almidón se daría a una relación relativamente constante, lo que se observa más acentuado con la mayor relación experimentada (C/N = 21,34).

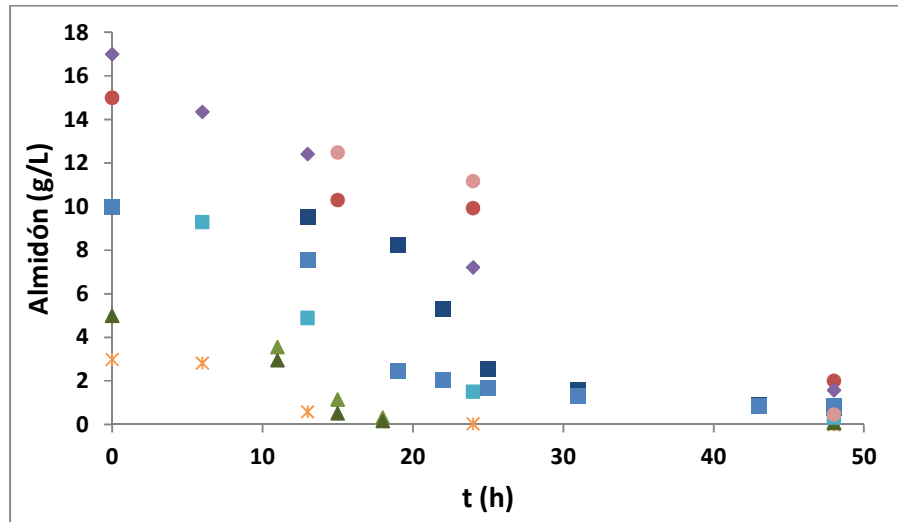


Figura 3.2. Variación de la concentración de almidón en función del tiempo.

Símbolos: (*) C/N = 3,66 y EL = 0,05 g/L, (▲) C/N = 6,25 y EL = 0,02 g/L, (▲) C/N = 6,25 y EL = 0,08 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0,05 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0,1 g/L, (●) C/N = 18,75 y EL = 0,02 g/L, (●) C/N = 18,75 y EL = 0,08 g/L, (◆) C/N = 21,34 y EL = 0,05 g/L.

3.4.1.4 Variación de pH (Y_4). En la **Figura 3.3** se presenta la variación del pH en relación al pH inicial para las experiencias definidas en el DCC. La variación del pH parece mostrar una relación directamente proporcional a la concentración inicial de almidón y al tiempo de experiencia.

3.4.2 Esporulación

El número de células que presentaron endosporas fue relativamente bajo (< al 5 %) y en la mayoría de las experiencias no se observó, inclusive a los tiempos de cultivo mayores. Sólo se observaron entre un 5 y un 8 % de células esporuladas tras 48 h de cultivo en la experiencia con menor relación C/N (3,66).

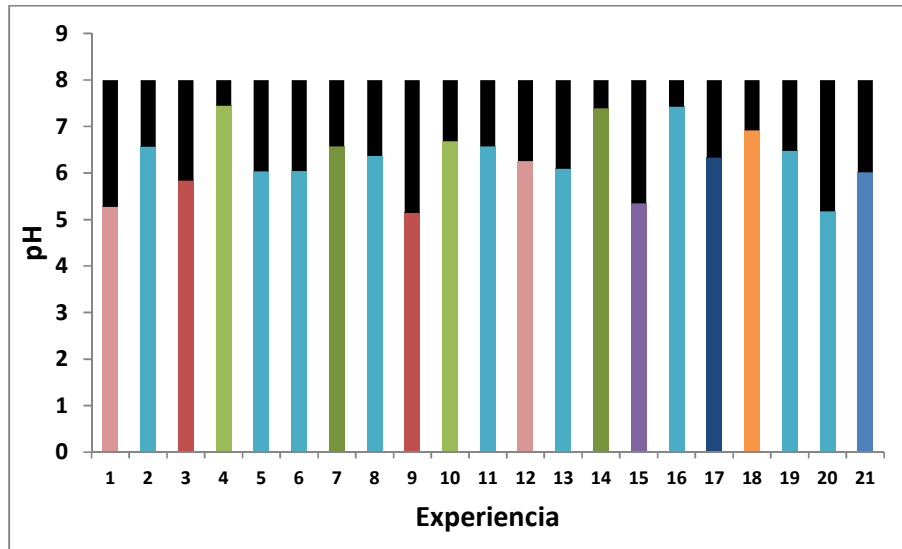


Figura 3.3. Variación del pH al tiempo final del cultivo ($T_c(h)$) para las distintas experiencias realizadas en el DCC. Símbolos: (■) C/N = 18,75 y EL = 0,02 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0,05 g/L, (■) C/N = 18,75 y EL = 0,08 g/L, (■) C/N = 6,25 y EL = 0,02 g/L, (■) C/N = 6,25 y EL = 0,08 g/L, (■) C/N = 21,34 y EL = 0,05 g/L (■) C/N = 12,5 y EL = 0 g/L, (■) C/N = 3,66 y EL = 0,05 g/L, (■) C/N = 12,5 y EL = 0,1 g/L.

3.4.3 Análisis estadístico

3.4.3.1 Determinaciones a partir de la MSR

En la **Figura 3.4** se presentan, en base a los resultados experimentales (**Tabla 3.1**), las superficies de respuesta para las relaciones óptimas entre los factores (X_i) y la producción de PHA (Y_j) determinadas para las experiencias definidas en el DCC.

En la **Tabla 3.2** se presentan las ecuaciones determinadas por MSR para las variables predichas (Y_i). Solo la respuesta correspondiente al pH presentó un modelo FO (de primer orden). El resto de las variables de respuesta presentaron modelos SO (de segundo orden).

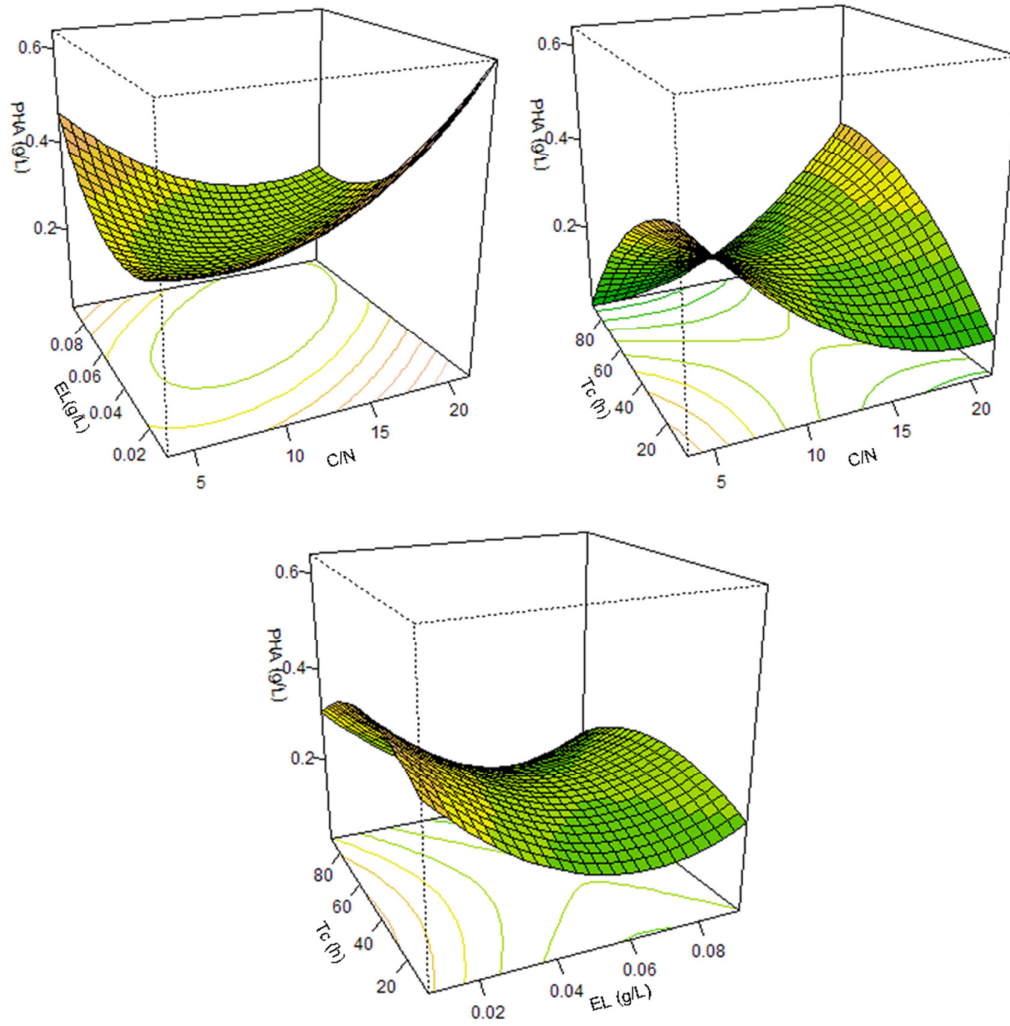


Figura 3.4. Superficies de respuesta para la variable PHA (g/L) en función de las variables analizadas (C/N, EL y Tc).

Tabla 3.2. Ecuaciones determinadas por MSR para las variables de respuesta.

Ecuación determinada por MSR	R ²
$Y_1 = PHA = 0,2476 + 0,0303 X_1 - 0,0449 X_2 - 0,0270 X_3 - 0,0623 X_1 X_2 + 0,0864 X_1 X_3 + 0,0486 X_1^2 + 0,0585 X_2^2 - 0,0370 X_3^2$	0,876
$Y_2 = Biomasa = 1,9841 + 0,1687 X_3 - 0,3985 X_3^2$	0,743
$Y_3 = Almidón = 0,8576 + 1,9923 X_1 - 2,8833 X_3 - 2,6502 X_1 X_3 + 1,9783 X_3^2$	0,858
$Y_4 = Variación pH = 1,7176 + 0,6509 X_1 + 0,5377 X_3$	0,878

X₁: relación C/N; X₂: Extracto de levadura ; X₃: Tiempo de cultivo

Al igual que lo observado en los modelos para la cepa *B. megaterium* JK4h (Dhangdhariya y col., 2015), las variables independientes C/N y Tc presentaron una incidencia altamente significativa a excepción del extracto de levadura (EL), salvo para la producción de PHA donde todas las variables parecen tener alta incidencia. Por otro lado para la biomasa solo parece tener alta incidencia el tiempo de cultivo (**Tabla 3.2**).

Los R² ajustados determinados para casi todos los modelos presentaron valores cercanos a 0,9, lo que indica un buen ajuste teniendo en cuenta que las variables no fueron transformadas, lo que generalmente mejora notablemente estos valores.

Para determinar cuán bien fue estimado el punto estacionario de la RS para el PHA, fueron simulados 200 re-ajustes del modelo, luego de codificar los residuales e ingresarlos nuevamente a los valores ajustados. Los puntos estacionarios así obtenidos fueron graficados junto con el estimado para el MSR de la variable PHA (**Anexo A**). Estos gráficos muestran algo parecido a una región de confianza para la mejor combinación de variables (Lenth, 2015).

3.4.3.2 Deseabilidad

En cualquier proceso industrial se intenta obtener la máxima productividad, definida como el máximo beneficio obtenido en el mínimo tiempo posible. Siguiendo esta idea y basándonos en las determinaciones del DCC-MSR se obtuvieron las condiciones *deseables* de las variables predictoras o factores para obtener la máxima producción de PHA al mínimo tiempo posible. Para esto se utilizó el paquete *desirability* del software R. En la **Tabla 3.3** se incluye un resumen sobre el análisis de deseabilidad.

El parámetro *s* seleccionado para el análisis de deseabilidad general tomó valores superiores a 1, debido a que se buscó el nivel máximo de deseabilidad que maximice la variable de respuesta PHA. Con este propósito el factor relación C/N fue definido como general y mínimo para encontrar la concentración de almidón óptima general y mínima que dan la máxima producción de PHA (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Deseabilidad general determinada para las condiciones óptimas

Factores	Deseabilidad general			Y_1 (g/L)	D
	X_1	X_2	X_3		
Codificados	-1*	1	-1	0,418	0,813
	0,99 [†]	-1	-0,68	0,434	0,827
Factores Decodificados	C/N	EL (g/L)	Tc (h)	PHA_v (g/L)	
	6,25*	0,8	18	0,342 ± 0,081	
	18,7 [†]	0,2	28	0,350 ± 0,069	

X_1 : C/N: relación carbon:nitrógeno, X_2 : EL: extracto de levadura, X_3 : Tc: *Tiempo de cultivo*, Y_1 : PHA predicho por medio de la deseabilidad, D : deseabilidad, PHA_v : PHA obtenido en la experiencia de validación, * deseabilidad general para la relación C/N óptima mínima, [†] deseabilidad general para la relación C/N óptima general.

3.4.3.3 Validación para las mejores condiciones experimentales

En la **Tabla 3.3** pueden observarse las condiciones determinadas por el análisis de deseabilidad y las concentraciones de PHA (con los desvíos estándar) obtenidas en esas condiciones en las experiencias de validación (PHA_v).

En la **Figura 3.5** se muestran las curvas para las cuatro variables dependientes obtenidas en las experiencias de validación (**Val**) utilizando las condiciones deseables (**CD**) determinadas para cinco tiempos de crecimiento de los cultivos. A estas condiciones se las denominó **CDA** y **CDB**, para las experiencias en las que se utilizó una relación C/N = 18,75 y 0,02 g/L EL y una relación de C/N = 6,25 y 0,08 g/L EL, respectivamente.

3.4.4 Modelado y estimación de parámetros

Para la determinación de la cinética de crecimiento y producción de PHA se emplearon los datos de las dos condiciones experimentales óptimas determinadas por deseabilidad. Estos datos incluyen a las experiencias originales de la MSR (**CDA** y **CDB**) y a las experiencias de validación para **CDA** y **CDB** (**CDAVal** y **CDBVal**). A partir de estos datos se formuló un problema de estimación de parámetros como un sistema de 6 ecuaciones diferenciales y 3 ecuaciones algebraicas, teniendo en cuenta una varianza constante en gPROMS. Ambos modelos se diferenciaron en base a las diferentes cantidades de fuente de carbono: **CDA** (y **CDAVal**), 15 g/L almidón y 0,02 g/L EL y **CDB** (y **CDBVal**), 5 g/L almidón y 0,08 g/L EL.

Como muestra la **Tabla 3.4**, el problema de estimación de parámetros para **CDB** parece ser más compleja en comparación con la realizada para **CDA**. El tiempo de CPU total, el número de iteraciones y el valor de la función objetivo inicial correspondiente a **CDA** fueron significativamente menores que los obtenidos para **CDB**.

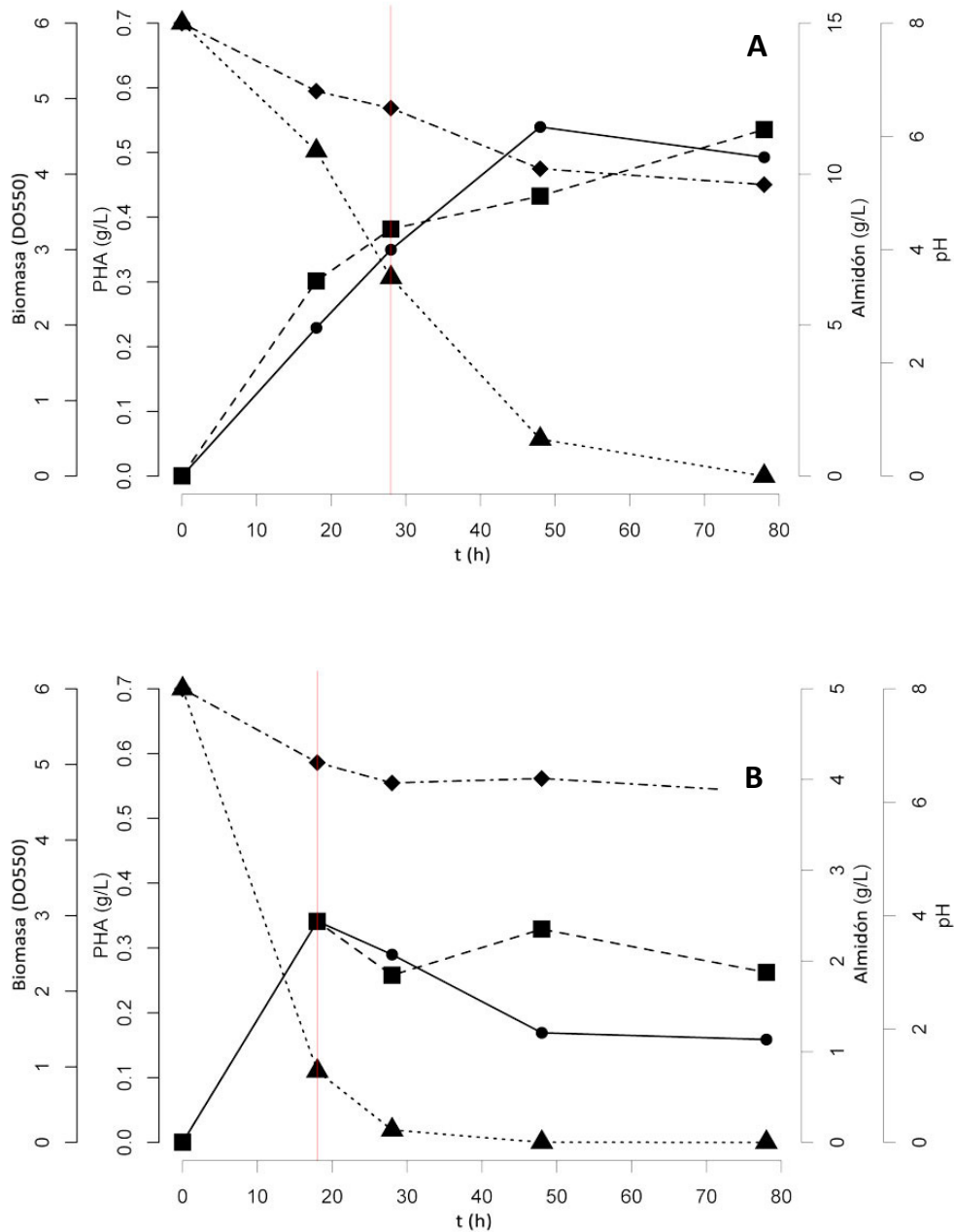


Figura 3.5. Experiencias de validación y corroboración para las condiciones óptimas determinadas por MSR y deseabilidad. (A) CDAVal: C/N = 18,7 y EL = 0,02 g/L y (B) CDBVal: C/N = 6,25 y EL = 0,08 g/L. Símbolos: (■) Biomasa (g/L), (●) PHA (g/L), (▲) Concentración almidón (g/L) y (◆) pH. La línea roja indica la deseabilidad general para las relaciones C/N óptimas general y mínima a 28 y 18 h, respectivamente.

Tabla 3.4. Métrica para el problema de estimación de parámetros

	CDA	CDB
Ecuaciones diferenciales	6	6
Ecuaciones algebraicas	3	3
Función objetivo inicial	589,9	1962,5
Función objetivo final	5,7	5,4
Iteraciones	50	85
Tiempo total CPU (s)	4,3	12,7
X^2 ^a	21,0	25,0
Residuos ponderados	17,1	18,8

^aBuen ajuste: menor residuo ponderado al valor de X^2

En la **Tabla 3.5** se presentan los valores óptimos de los parámetros estimados. Los parámetros cinéticos no estimados involucrados en la cinética se consideraron similares a los empleados por Faccin y col. (2012) y que se enumeran en la **Tabla 3.6** para **CDA** y **CDB**. Los valores nulos estimados de los parámetros k_3 y c para **CDB** señalan el requerimiento de una ecuación ligeramente diferente para representar el consumo de la fuente de carbono, en el que no se deben considerar los aportes de la fuente de nitrógeno ni el término diferencial de la biomasa residual.

En la **Figura 3.6** se presentan los valores experimentales y los perfiles simulados de las variables después de la estimación de parámetros para la calibración del modelo utilizando los datos de las experiencias **CDA** y **CDAVal**. Sobre la base de los índices de rendimiento que se presentan en la **Tabla 3.6**, el modelo propuesto para **CDA** describe adecuadamente el sistema bajo estudio.

Tabla 3.5. Conjunto de parámetros óptimos para el modelo cinético empleando *Bacillus megaterium* BBST4.

	CDA	CDB
Parámetro	Valor óptimo	
K_{S2}	7,002	5,384
k_1		0,302
k_2	-0,001	-0,002
k_3		0
k_4	0,026	10,315
k_5	22,388	0,023
k_{ph2}	0,008	$1,86 \cdot 10^{-5}$
μ_M	0,739	
a	0,030	0,025
b	0,001	0,005
c	0,175	0
Y_{RS2}	2,331	2,195

Tabla 3.6. Parámetros del modelo reportados por Faccin y col. (2012) para el modelo cinético empleando *Bacillus megaterium* BBST4.

	CDA	CDB
Parámetro	Valor óptimo	
k_d	0,011	
m_{S2}	$1,73 \cdot 10^{-6}$	
k_1	0,396	
k_3	0,989	
k_{pH1}	2,287	1,704
μ_M		1,507

La cinética ajustada es más exacta para representar el consumo de fuente de carbono y pH, obteniéndose valores de índice de coherencia (d) cercanos a 1 y errores relativos inferiores al 7 % (**Tabla 3.7**), mientras que es un poco menos precisa para la producción de biopolímero y biomasa total, donde el d es de aproximadamente 0,93 para ambos casos y los errores relativos de alrededor del 20 %.

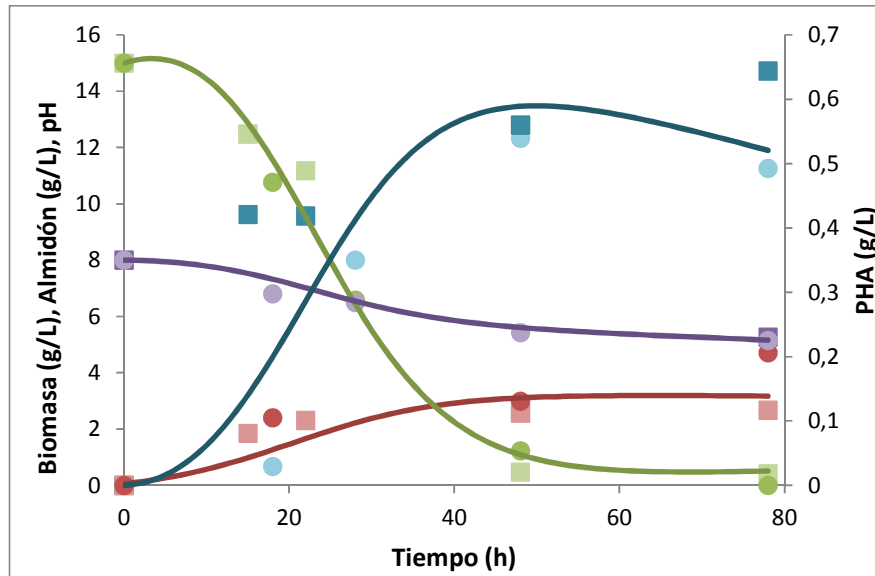


Figura 3.6. Valores experimentales y simulación obtenida para las experiencias **CDA** y **CDAVal** en función del tiempo empleando la cepa *Bacillus megaterium* BBST4. Símbolos: (■) **CDA** y (●) **CDAVal**. Modelo cinético: (—) PHA, (—) Biomasa, (—) Almidón y (—) pH.

Tabla 3.7. Error medio (*EM*), error relativo (*ER*) e índice de coherencia (*d*) de las variables del modelo de ajuste para **CDA** empleando *Bacillus megaterium* BBST4

Variables del modelo	<i>EM</i>	<i>ER</i>	<i>d</i>
<i>P</i> (PHA)	0,078	20,3 %	0,944
<i>X</i> (Biomasa)	0,086	26,2 %	0,934
<i>S</i> ₁ (Almidón)	0,107	6,4 %	0,997
<i>pH</i>	0,054	0,8 %	0,999

Una vez ajustada la cinética propuesta para las condiciones de **CDA** ésta fue validada por medio de un conjunto de datos experimentales independientes (**CDAVal**) como se muestra en la **Figura 3.6**. En comparación con el conjunto de datos utilizado para el ajuste, se puede señalar a partir de la **Tabla 3.8** que los *ER* se mantuvieron inferiores a 7 % para las variables fuente de carbono y pH. Por otro lado, mientras que el *ER* para la biomasa total fue similar al obtenido para el ajuste, el *ER* correspondiente

a la variable biopolímero se redujo casi al 62 % del *ER* determinado para el modelo **CDA**. Evidentemente, esta reducción de error para el producto, no pudo extenderse a la biomasa total debido a un aparente aumento en el error de la biomasa residual. En referencia al *d* para las variables de estado, se puede observar que todas ellas permanecieron superiores a 0,90.

Tabla 3.8. Error medio (*EM*), error relativo (*ER*) e índice de coherencia (*d*) de las variables del modelo de validación para **CDA** empleando *Bacillus megaterium* BBST4 (**CDAVal**)

VARIABLES DEL MODELO	<i>EM</i>	<i>ER</i>	<i>d</i>
<i>P</i> (PHA)	-0,039	12,7 %	0,983
<i>X</i> (Biomasa)	0,619	27,1 %	0,903
<i>S</i> ₁ (Almidón)	-0,348	6,2 %	0,997
<i>pH</i>	-0,152	2,4 %	0,986

Los datos experimentales y el modelo de calibración correspondientes a **CDB** y **CDBVal** se muestran en la **Figura 3.7**. En la **Tabla 3.9** puede observarse que para la biomasa total y el pH se obtuvo un mejor ajuste en comparación con las otras variables. Sin embargo, el valor más bajo para el *d* fue 0,930 confirmando una adecuada precisión de la cinética propuesta. Además, los *ER* más importantes, asociados con PHA y almidón, fueron superiores al 29 %. Esto último, junto con los *EM* cercanos a cero para las variables de estado, indican un ajuste satisfactorio de la cinética con el conjunto de datos utilizado para este propósito.

El proceso de validación se realizó utilizando un conjunto de datos diferente (**CDBVal**) al utilizado para el ajuste de la cinética (**CDB**, **Figura 3.7**) como se hizo en el caso anterior.

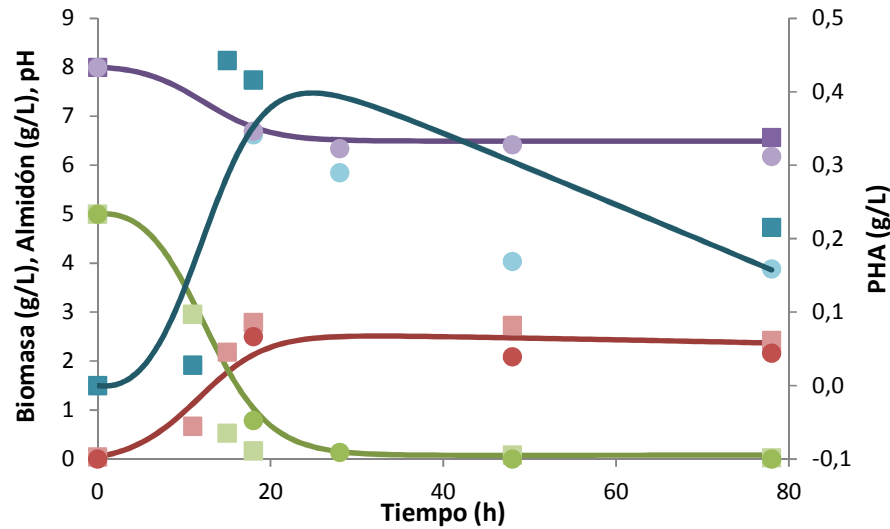


Figura 3.7. Valores experimentales y simulación obtenida para las experiencias **CDB** y **CDBVal** en función del tiempo empleando la cepa *Bacillus megaterium* BBST4.
 Símbolos: (■) **CDB** y (●) **CDBVal**. Modelo cinético: (—) PHA, (—) Biomasa, (—) Almidón y (—) pH.

Tabla 3.9. Error medio (*EM*), error relativo (*ER*) e índice de coherencia (*d*) de las variables del modelo de ajuste para **CDB** empleando *Bacillus megaterium* BBST4

Variables del modelo	<i>EM</i>	<i>ER</i>	<i>d</i>
<i>P</i> (PHA)	0,017	27,6%	0,930
<i>X</i> (Biomasa)	0,115	14,2 %	0,969
<i>S</i> ₁ (Almidón)	-0,406	28,3 %	0,969
<i>pH</i>	0,039	0,5 %	0,999

En la **Tabla 3.10** se puede observar que el ajuste para los experimentos de validación es apropiado, lo que genera que los *ER* se reduzcan de manera significativa para las variables concentración de biopolímero y consumo de almidón, reduciéndose al 66,3 % y 25,1 % de los *ER* del **CDB**, respectivamente. Por otra parte el *EM* indica un sesgo negativo del modelo observándose una subestimación de los datos experimentales. Por último, el valor de *d* para el producto, la biomasa total y el almidón

se han mejorado en este proceso de validación. Una disminución insignificante de d y ER se encontró para el pH, posiblemente, como se mencionó antes, debido a la inclusión de más datos para esta variable.

Tabla 3.10. Error medio (EM), error relativo (ER) e índice de coherencia (d) de las variables del modelo de validación para CDB empleando *Bacillus megaterium* BBST4 (CDBVal)

VARIABLES DEL MODELO	EM	ER	d
P (PHA)	-0,037	18,3 %	0,956
X (Biomasa)	-0,065	12,7 %	0,985
S_1 (Almidón)	-0,084	7,1 %	0,999
pH	-0,128	1,9 %	0,982

3.5 DISCUSIÓN

Entre los costos de producción de los PHA aproximadamente el 50 % corresponde a la fuente de carbono utilizada (Choi y Lee, 1999). Dado que el precio de la glucosa es aproximadamente el doble del precio del almidón de maíz hidrolizado, el uso de almidón como fuente de carbono conllevaría una disminución del costo de producción de aproximadamente el 25 %. Por otro lado la producción de PHAs a partir de almidón como fuente de carbono se lleva a cabo generalmente utilizando bacterias Gram-negativas. Es sabido que las bacterias Gram-negativas son importantes productores de sustancias potencialmente dañinas (endotoxinas), por lo que al momento de considerar algunas de las posibles aplicaciones de los PHAs, especialmente biomédicas y alimenticias, es conveniente el uso de bacterias Gram-positivas (Song y col., 2013).

La producción de PHA por parte de la cepa *B. megaterium* BBST4 en todos los medios estudiados sugiere una eficiente utilización del almidón como fuente de carbono. Las máximas concentraciones de PHA extraído se observaron en las

experiencias con relaciones de C/N de 6,25 y 18,75 superándose en todos los casos los 0,4 g/L.

Según los modelos determinados por MSR el extracto de levadura no parece tener incidencia en la degradación de almidón por parte de la cepa estudiada. De todas maneras, a partir de las relaciones de C/N de 18,75 se obtuvo un 132 y 82 % más de PHA empleando 0,02 g/L EL en relación a la concentración de PHA obtenida con 0,08 g/L de EL, a las 18 y 78 h de crecimiento, respectivamente. Por otro lado, a partir de relaciones de C/N de 6,25 se obtuvieron 2 y 15 % más de PHA con 0,08 g/L EL en relación a la concentración de PHA obtenida con 0,02 g/L EL, a las 18 y 78 h de crecimiento, respectivamente. Estas diferencias parecen mostrar cierta influencia del extracto de levadura con tiempos cortos de hidrólisis y altas concentraciones de almidón y la inversa, cuando las concentraciones de almidón a hidrolizar son bajas. En todos los casos las concentraciones de extracto de levadura utilizadas son muy bajas, lo que generaría un término despreciable en las ecuaciones económicas y por lo tanto en los costos de producción. En consonancia con Tanyildizi y col. (2005), en experiencias en las que analiza la influencia de altas concentraciones de extracto de levadura (hasta 6 g/L) en la optimización de la producción de α -amilasa por una cepa de *Bacillus* spp., los resultados obtenidos no se ven influenciados por el agregado de este extracto. Otros autores han encontrado una influencia positiva del extracto de levadura en cepas de *Bacillus* spp. a concentraciones de entre 1 g/L (Riaz y col., 2008) y 3 g/L (Malhotra y col., 2000). De todas maneras las concentraciones de extracto de levadura utilizadas en los trabajos mencionados son muy superiores a las empleadas en este trabajo y parecen estar más cerca de comportarse como fuentes directas de carbono/nitrógeno que como elementos traza/factores de crecimiento.

Teniendo en cuenta la necesidad de disminuir los costos de producción, la máxima productividad de PHA obtenida empleando 5 g/L de almidón fue prácticamente igual a la obtenida a partir de 15 g/L (0,0231 g/L·h y 0,0233 g/L·h, respectivamente), ambos a 18 h de crecimiento. Esto implicaría una disminución en los gastos de la fuente de carbono del 200 %. Estas productividades fueron superiores a las obtenidas con tres cepas distintas empleando almidón como fuente de carbono: con la cepa *Bacillus cereus* CFR06 empleando 1 y 2 % de almidón soluble, se obtuvieron 0,0056 y 0,0067 g/L·h, respectivamente, (Halami, 2008), con la cepa *Azotobacter chroococcum* H23 en cultivo batch con 10 % de almidón como fuente de carbono, se obtuvo 0,0149 g/L·h, (Kim, 2000) y con la cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 con 6% de almidón, se obtuvo 0,0054 g/L·h, (Song y col., 2013); todas cultivadas a 30 °C y a tiempos mayores a las 50 h de cultivo. Al igual que en el presente estudio diferentes cepas de *Bacillus* spp. y otras cepas productoras de PHAs presentan las mayores concentraciones de PHA empleando concentraciones de almidón mayores a 10 g/L y a tiempos mayores a 50 h de cultivo (Kim, 2000; Chen y col., 2006; Halami, 2008), pero generalmente no son tan altas a tiempos cortos (por ejemplo 18 h) como las producidas por la cepa *B. megaterium* BBST4. Las concentraciones de PHA obtenidas en el presente trabajo también fueron superiores a las obtenidas con la cepa *B. megaterium* JK4h, 0,342 g/L, (Dhangdhariya y col., 2015) utilizando un medio menos económico (3 % de glucosa, 0,3 % de peptona y 0,075 % de extracto de levadura) a tiempos mayores a las 18 h.

Con respecto a la hidrólisis de almidón, varios autores han demostrado que la α -amilasa generalmente parece presentar una importante pendiente positiva de actividad después de las 18 h (Mamo y Gessesse, 1999; Song y col., 2013; Goyal y col., 2005; Sodhi y col., 2005). Dicha pendiente parece iniciarse con antelación en la cepa *B. megaterium* BBST4, lo que puede observarse principalmente en las experiencias con

relaciones C/N inferiores a 12,5 (**Figura 3.2**). Según Liu y Xu (2008) la producción de α -amilasa está asociada al crecimiento celular e inducida por la presencia de sustrato en el medio. En este sentido entre las 10 y las 25 h se puede observar, en general, un buen crecimiento de la biomasa (**Figura 3.1**). Para las menores relaciones de C/N estudiadas, y en particular para 6,25, antes de las 18 h se estaría llegando a la fase estacionaria consiguiéndose en este punto el máximo crecimiento y producción de PHA. A la vez la producción de PHA parece decaer en tiempos posteriores, contrario a lo que se observa a relaciones de C/N mayores a 12,5, donde se observa que la biomasa, al igual que la producción de PHA, continúa en aumento después de las 48 h. Sin embargo, con las mayores relaciones de C/N (21,34) empleadas en este trabajo, a pesar de observarse la continuidad del crecimiento después de las 48 h, la producción de PHA no parece ser importante, pudiendo verse influenciada por el exceso de C y/o por la falta de extracto de levadura.

En concordancia con Liu y Xu (2008) y Goyal y col. (2005), quienes trabajaron con cepas de *Bacillus* spp., la hidrólisis de almidón se hace detectable antes de las 20 h de crecimiento, durante la fase de crecimiento exponencial (**Figura 3.2**). En esos momentos la concentración de α -amilasa alcanzaría en el medio un pico de producción. Estas observaciones no parecen cumplirse con concentraciones mayores de almidón (15 y 17 g/L, **Figura 3.2**), en las que la hidrólisis parece constante en el tiempo.

Según varios autores la actividad amilolítica generalmente tiene su óptimo, para cepas de *Bacillus* spp. termófilos, a 37 °C y pH entre 5 y 7,5 (Sodhi y col., 2005; Goyal y col., 2005; Liu y Xu, 2008). Aunque la cepa estudiada no es termófila parece presentar una buena actividad amilolítica en este rango de pH. Las experiencias llevadas a cabo con relaciones C/N menores a 12,5 indican una alta actividad a pH cercanos a 8, donde el pH del medio varió de 8 a un mínimo de 7,4 (C/N = 6,25 y EL = 0,08 g/L) a

las 18 h, observándose un consumo de almidón casi total antes de las 20 h, con una pendiente marcada de consumo de almidón antes de las 10 h.

Las experiencias realizadas con relaciones C/N mayores a 12,5 mostraron una actividad enzimática prácticamente constante en el tiempo, por lo que también las pendientes de consumo de almidón parecen ser relativamente constantes. Esta idea y la disminución de la actividad amilolítica con el tiempo de cultivo (Goyal y col., 2005; Liu y Xu, 2008) podrían explicar la importante concentración de almidón residual determinada a las 48 h de cultivo (**Figura 3.2**).

El punto máximo de acumulación de biopolímero tiene lugar justo antes de la esporulación, siendo el PHA degradado durante este proceso. Esto hace que el desarrollo de cualquier proceso biotecnológico de producción de PHAs sea económicamente inviable (Wu y col., 2001). A partir de los resultados observados en el presente trabajo puede decirse que las condiciones empleadas para los cultivos no favorecerían la esporulación ya que solo se observaron indicios de esporulación cuando las relaciones de C/N fueron menores a 6,25 luego de 48 h de cultivo. En base a estos resultados se puede decir que la cepa *B. megaterium* BBST4 posee la capacidad de crecer largos períodos de tiempo sin presentar esporulación en un medio sintético simple (SWS) con y sin el agregado de extracto de levadura.

Por otra parte, en este trabajo se utilizó la MSR para definir estadísticamente y por medio de la deseabilidad las condiciones óptimas de cultivo que minimizan el tiempo de cultivo maximizando la producción de PHA. Su aplicación define el efecto de las variables independientes, solas o en combinación, sobre el/los procesos estudiados. Además de analizar los efectos de las variables independientes, a partir de esta metodología experimental se puede generar un modelo matemático que describa la relación de las variables estudiadas (Papaneophytou y Kyriakidis, 2012). En contraste,

el método de optimización clásico (optimización de variables simple) no sólo es lento y tedioso, sino que tampoco representa los efectos completos de las variables del proceso y hace caso omiso de las interacciones entre dichas variables (Bas, 2007).

Las condiciones más deseables aplicando MSR resultaron ser $C/N = 18,75$ y $EL = 0,02$ g/L a 28 h de cultivo como condición óptima general y $C/N = 6,25$ y $EL = 0,08$ g/L a 18 h de cultivo como condición óptima mínima. Estas dos condiciones fueron denominadas **CDA** y **CDB**, respectivamente.

Para estas dos condiciones se propuso una cinética y se realizó una estimación de parámetros. Si bien se obtuvieron mejores resultados en el ajuste de los datos de **CDA**, con sólo dos experiencias no es posible sacar demasiadas conclusiones respecto a la bondad de los mismos. Las diferencias podrían ser atribuidas al uso de mejores puntos iniciales y cotas inferiores y superiores en el modelo de optimización implementado para el ajuste de los datos experimentales.

Los parámetros estimados en el problema de optimización (**Tabla 3.5**) para ambos casos presentaron concordancia con los presentados por Faccin y col. (2012), como por ejemplo, un valor negativo del parámetro k_2 , que ratifica el escenario propuesto por Khanna y Srivastava (2005), en el que los microorganismos también pueden consumir PHA como fuente de carbono bajo condiciones específicas. Otro aspecto relacionado con lo enunciado anteriormente es el hecho de que todos los parámetros estimados, a excepción de Y_{R/S_2} , tomaron valores considerados por el desvío estándar de los parámetros reportados en la literatura por Faccin y col. (2012). La excepción particular del parámetro Y_{R/S_2} podría ser debida al hecho de que este es altamente dependiente de la relación biomasa residual/fuente de nitrógeno empleada en cada experimento.

Los perfiles de las variables medidas (**Tabla 3.7**) resultaron ser similares a los obtenidos experimentalmente por Faccin y col. (2009). Mientras que las diferencias

observadas en la estimación de las variables pueden deberse al hecho de que el PHA y la biomasa total están altamente correlacionados (**ec. 8**), análogamente a lo propuesto por Mulchandani y col. (1989), donde la biomasa total solamente está representada por la contribución de la biomasa residual y la producción de PHA, por lo tanto, cualquier tipo de error introducido por una de estas variables, afecta de forma predecible a la otra.

Luego del ajuste de la cinética propuesta para **CDA** y **CDB** se llevó a cabo una nueva experiencia para cada condición para validar el ajuste obtenido. Para tal fin se usaron los datos de las experiencias **CDAVal** (**Tabla 3.8**) y **CDBVal** (**Tabla 3.10**) observándose una buena coherencia con la cinética propuesta, ya que todos los d fueron superiores a 0,9. Para **CDAVal** se obtuvo la mayor variación en este índice para la variable PHA, con una mejora del d de 0,944 a 0,983 en concordancia con la mejora observada en el resto de los índices para esta variable.

Aunque el ajuste realizado para **CDB** también tuvo una adecuada precisión representando con éxito la evolución de las variables medidas (**Tabla 3.10**), es altamente probable que la precisión para la variable pH se deba a la falta de información adicional, es importante al menos tener esta información, ya que es fundamental como punto inicial para poder incluir la ecuación de concentración de iones H^+ al modelo, la cual sirve para predecir el comportamiento del pH de manera aceptable.

Tanto los procesos de ajuste como los de validación representan de buena manera la tendencia de los datos medidos para las diferentes variables, excepto para la variable biomasa total en las condiciones de **CDA**. Esto puede deberse a la falta de datos para ajustar la ecuación de la biomasa residual, responsable del aumento de la biomasa total a tiempos mayores.

De los datos medidos y de los ajustes realizados se puede concluir que a tiempos menores a las 30 h se consiguen producciones de PHA razonables, no muy alejadas a las

predichas con las condiciones de deseabilidad (**Tabla 3.3**). En la **Figura 3.5** se puede observar que el pico máximo de producción de PHA (0,54 g/L) se obtendría a las 48 h, presentando aproximadamente un 54 % más de PHA que a las 28 h. La productividad fue máxima en la experiencia con una relación C/N de 6,25 y 0,08 g/L de EL a las 18 h (0,0189 g/L·h), por lo que estas condiciones (5 g/L de almidón, 0,8 g/L de urea, 0,008 g/L de EL y 18 h de cultivo) parecen ser las condiciones óptimas para la producción de PHA a partir de almidón como fuente de carbono empleando *B. megaterium* BBST4. Estas condiciones óptimas de cultivo, sumadas a la capacidad de crecer largos períodos de tiempo sin esporular, convierten a la cepa *B. megaterium* BBST4 en un productor de PHAs con potencial para ser empleado en aplicaciones de alto valor agregado como son la industria farmacéutica y biomedica.

3.6 CONCLUSIONES

Se realizó la optimización del crecimiento y producción de PHAs a partir de almidón empleando métodos estadísticos complejos, como la metodología de superficie de respuesta (RMS), la cual permitió obtener buenos resultados minimizando el tiempo y número de experimentos realizados. Se definieron 3 variables operativas (relación fuente de carbono a fuente de nitrógeno (C:N), concentración de extracto de levadura (EL) y tiempo de cultivo (Tc)) y se analizaron las variables de interés (PHA y biomasa producidos, almidón consumido y variación de pH del cultivo). Las condiciones óptimas determinadas por RMS y finalmente por deseabilidad para la producción de PHAs a partir de almidón y urea como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, fueron las siguientes: 15 g/L de almidón, 0,8 g/L de urea, y 0,02 g/L de extracto de levadura; a 30 °C y 28 h de incubación, con una producción de PHA de 0,35 g/L y una productividad máxima de 0,0125 g/L·h. Aunque a las 48 h se observó el

pico máximo de producción, que superó los 0,5 g/L, a este tiempo se obtiene un menor valor de productividad (menor a 0,011 g/L·h). A pesar de haber obtenido las condiciones óptimas previamente mencionadas como las de máxima producción de PHAs, teniendo en cuenta la ecuación económica del proceso de producción, en la que la fuente de carbono representa hasta un 50 % del valor de producción, las condiciones óptimas que minimizan estos costos y generan una buena producción de PHAs fueron las siguientes: 5 g/L de almidón, 0,8 g/L de urea, y 0,08 g/L de extracto de levadura y 18 h de incubación a 30 °C, con una producción de PHA de 0,342 g/L y una productividad de 0,019 g/L·h. De esta manera, la cepa demostró una importante eficiencia en la producción de PHAs con bajas concentraciones de fuente de carbono y a tiempos reducidos de cultivo.

Para el diseño experimental empleado en este estudio (RMS y deseabilidad) se empleó el software gratuito R, el cual permitió cumplimentar el análisis de cada etapa del desarrollo demostrando una importante flexibilidad para su utilización en este tipo de análisis estadístico complejo.

Por otra parte se propuso una cinética para este proceso y se realizó el ajuste de parámetros de la misma. La obtención de una cinética que representa los datos experimentales obtenidos permitió generar una herramienta de predicción para el seguimiento del proceso de producción de PHA en un medio basal económico a partir de almidón y urea como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

3.7 NOMENCLATURA

X	Concentración de biomasa total (g_{cell}/L)
R	Concentración de biomasa residual (g_{cell}/L)
P	Concentración de biopolímero (g_{prod}/L)
S_1	Concentración de fuente de carbono (g_{sub1}/L)
S_2	Concentración de fuente de nitrógeno (g_{sub2}/L)
t	Tiempo (h)
μ	Relación de crecimiento específico (h^{-1})
μ_M	Relación de crecimiento específico máximo (h^{-1})
k_1	Parámetro cinético en la acumulación de producto ec. 11 (g_{prod}/g_{cell})
k_2	Parámetro cinético en la acumulación de producto ec. 11 ($g_{prod}/g_{cell} h$)
k_3	Parámetro cinético en el consumo de la fuente de carbono ec. 12 (g_{sub1}/g_{cell})
k_4	Parámetro cinético en el consumo de la fuente de carbono ec. 12 (g_{sub1}/g_{prod})
k_5	Parámetro cinético en el consumo de la fuente de carbono ec. 12 ($g_{sub1}/g_{cell} h$)
K_{S2}	Constante de saturación basado en la concentración de la fuente de nitrógeno (g_{sub2}/L)
Y_{R/S_2}	Producción de biomasa residual basado en la fuente de nitrógeno (g_{cell}/g_{sub2})
m_{S2}	Coefficiente de mantenimiento basado en la fuente de nitrógeno ($g_{sub2}/g_{cell} h$)
k_d	Relación de muerte celular (h^{-1})
H	Concentración de iones hidrógeno (mol_{H^+}/L)
a	Constante de ajuste en la ec. 10 ($g_{cell}/L h$)
b	Constante de ajuste en la ec. 12 ($g_{sub1}/g_{sub2} h$)
c	Constante de ajuste en la ec. 12 (h^{-1})
k_{pH1}	Constante en la ec. 14 (L/g_{cell})
k_{pH2}	Constante en la ec. 14 ($L/g_{cell} h$)

N	Número total de mediciones
θ	Conjunto de parámetros a estimar
NE	Número de experimentos
NV_i	Número de variables medidas en el experimento i
NM_{ij}	Número de mediciones de la variable "j" en el experimento "i"
σ_{ijk}^2	Varianza de la medición "k" de la variable "j" en el experimento "i"
z_{ijk}^*	Valor "k" medido para la variable "j" en el experimento "i"
z_{ijk}	Valor "k" predicho para la variable "j" en el experimento "i"

EM	Error medio
y_i	Valores observados
\bar{y}	Media de los valores observados
\hat{y}	Valores simulados
n_{obs}	Número de observaciones
ER	Error relativo
d	Índice de coherencia

3.8 REFERENCIAS

- Bas, D., Boyaci, I. H. (2007) Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.*, 78 836-845.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008) Response surface methodology (MSR) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
- 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*. *Proc. Biochem.*, 41:2289-2296.
- Choi, J., Lee, S.Y. (1999) Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:13-21.
- Derringer, G., Suich, R. (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.*, 12, 214-219.
- Dhangdhariya, J. H., Dubey, S., Trivedi, H. B., Pancha, I., Bhatt, J. K., Dave, B. P., Mishra, S. (2015) Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. *Intern. J. Biol. Macromol.*, 76, 254-261.
- Faccin, D. J. L., Correa, M. P., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Secchi, A. R., Cardozo, N. S. M. (2012) Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 87:325-333.
- Faccin, D. J. L.; Martins, I.; Cardozo, N. S. M.; Rech, R.; Ayub, M. A. Z.; Alves, T. L. M.; Gambetta, R.; Secchi, A. R. (2009) Optimization of C/N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84, 1756-1761.

-
- Gentleman, R., Huber, W., Carey, V. J. (2011) R Language. *Intern. Enc. Stat. Sci.*, 1159-1161.
- Goyal N., Gupta, J. K., Soni, S. K. (2005) A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb. Technol.*, 37 723-734.
- Halami P.M. (2008) Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:805-812.
- Harrington, J. (1965) The desirability function. *Ind. Qual. Control*, 21, 494-498.
- Hatambeygi, N., Abedi, G., Talebi, M. (2011) Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology. *J. Chromatogr. A*, 1218, 5995-6003.
- Ihaka, R., Gentleman, R. (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comp. Graph. Stat.*
- Khanna, S., Srivastava, A.K. (2005) A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production. *Biotechnol. Prog.*, 21:830-838.
- Khanna, S., Srivastava, A. K. (2006) Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. *Biochem. Eng. J.*, 27, 197-203.
- Kim, B.S. (2000) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.*, 27 774-777.
- Kuhn, M. (2015) Desirability: Desirability Function Optimization and Ranking. R package version 1.9. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=desirability>
- Lenth, R.V. (2010) Response-Surface Methods in R, Using rsm. *J. Stat. Soft.*, 32(7), 1-17.

- Lenth, R.V. (2015) Response-surface illustration: Vignette for rsm package. R package version 2.7-4. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=rsm>
- Liu, X.D., Xu, Y. (2008) A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Biores. Technol.*, 99 4315-4320.
- López, J. A., Bucalá, V., Villar, M. A. (2010) Application of dynamic optimization technique for poly(β -hydroxybutyrate) production in a fed-batch bioreactor. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 1762-1769.
- Malhotra, R., Noorwez, S. M., Satyanarayana, T. (2000) Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 378-384.
- Mamo, G., Gessesse, A. (1999) Purification and characterization of two raw starch digesting thermostable α amylases from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 25:433-438.
- Mulchandani, A., Luong, J. H. T., Groom, C. (1989) Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30:11-17.
- Najafpour, G. D., Shan, C. P. (2003) Enzymatic hydrolysis of molasses. *Biores. Technol.*, 86 91-94.
- Nakamura, L. K. (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31:56-63.
- Nelder, J. A., Mead, R. (1965) A Simplex Method for Function Minimization. *Comp. J.*, 7:308-313.
- P.S.E. Ltd. (2004) gPROMS Advanced User Guide-Release 2.3. Process Systems Enterprise Ltd. London.

- Papaneophytou, C. P., Kyriakidis, D. A. (2012) Optimization of polyhydroxyalkanoates production from *Thermus thermophilus* HB8 using response surface methodology. *J. Polym. Environ.*, 20:760-773.
- Patwardhan, P. R., Srivastava, A. K. (2004) Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochem. Eng. J.*, 20: 21-28.
- Pochon, J., Tardieu, L. (1962) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle, Paris.
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Raje, P., Srivastava, A. K. (1998) Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Biores. Technol.*, 64:185-192.
- Ramsay, J. A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C., Ramsay, B. A. (1994) Extraction of poly(3-hydroxybutyrate) using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.*, 8:589-594.
- Riaz, A., Qadar, S., Anwar, A., Iqbal, S., Bano, S. (2008) Production and characterization of thermostable α -amylase from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. *Internet J. Microbiol.*, 6(1).
- Salas, C. (2008) Por qué comprar un programa estadístico si existe R?. *Ecol. Austral*, 18(203):223–231.
- Schaeffer, A. B., Fulton, M. D. (1933) A simplified method of staining endospores. *Science*, 77:194.
- Schleifer, K.H. (2009) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology SE - 3., 5:19-1317.

- Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P., Gaillard, J. L., Corroler, D. (2013) Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng.*, 116(3):302-308.
- Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., Soni, S. K. (2005) Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Proc. Biochem.*, 40(2), 525-534.
- Song, Y., Matsumoto, K. I., Tanaka, T., Kondo, A., Taguchi, S. (2013) Single-step production of polyhydroxybutyrate from starch by using α -amylase cell-surface displaying system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.*, 115(1):12-14.
- Subramaniam, M., Baradaran, A., Rosli, M. I., Rosfarizan, M., Khatijah, Y., Raha, A. R. (2012) Effect of signal peptides on the secretion of β -cyclodextrin glucanotransferase in *Lactococcus lactis* NZ9000. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.*, 22(6):361-372.
- Switzar, L., Giera, M., Lingeman, H., Irth, H., Niessen, W. M. A. (2011) Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling. *J. Chromatogr. A*, 1218: 1715–1723.
- Talebpour, Z., Ghassempour, A., Abbaci, M., Aboul-Enein, H. Y. (2009) Optimization of microwave-assisted extraction for the determination of glycyrrhizin in menthazin herbal drug by experimental design methodology. *Chromatogr.*, 70, 191-197.
- Tanyildizi, M. S., Özer, D., Elibol, M. (2005) Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Proc. Biochem.*, 40(7):2291-2296.

- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T. (2007) Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. *J. Biotechnol.*, 132:251-258.
- Willmott, C. J. (1981) On the validation of models. *Phys. Geogr.*, 2, 184-194.
- 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.
- Yuan, J., Huang, J., Wu, G., Tong, J., Xie, G., Duan, J. A., Qin, M. (2015) Multiple responses optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology (MSR) for rapid analysis of bioactive compounds in the flower head of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Ind. Crops Prod.*, 74:192-199.

CAPÍTULO 4. Extracción y caracterización de los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 a partir de distintas fuentes de carbono

4.1 INTRODUCCIÓN

Los poli(β -hidroxialcanoatos), PHAs, son termoplásticos biodegradables que poseen propiedades finales similares a polímeros sintéticos ampliamente usados como poli(etileno) y poli(propileno). En la producción de PHAs a gran escala el costo del producto depende tanto del proceso como de la pureza del mismo. A su vez, la productividad y pureza del PHA obtenido dependen principalmente del microorganismo utilizado y de los métodos de extracción y purificación empleados (Valapil y col., 2007). La mayoría de los procesos de separación propuestos para la recuperación de PHAs implican el uso de solventes de extracción tales como diclorometano, carbonato de propileno, anhídrido acético, carbonato de etileno, dicloroetano o cloroformo (Berger y col., 1989; Valapil y col., 2007). Sin embargo, el más usado a nivel laboratorio es la extracción con cloroformo en ebullición en Soxhlet (Kannan y Řeháček, 1970; Łabuzek y Radecka, 2001; Heinrich y col., 2012). Otros procesos de recuperación emplean hipoclorito para el tratamiento de la biomasa. Este tratamiento es eficaz en la solubilización de los componentes celulares, pero el hipoclorito puede degradar de forma importante el PHA obtenido (Hahn y col., 1994; Ramsay y col., 1990). Por este motivo es necesario optimizar el proceso de extracción de modo tal de no degradar el PHA (Berger y col., 1989). El tratamiento con hipoclorito puede ser menos agresivo si es combinado con otros métodos. A partir de la digestión de hipoclorito de sodio y la

extracción con cloroformo se logran pérdidas de PHB sustancialmente inferiores (Hahn y col., 1994).

Una vez obtenido y purificado el biopolímero se debe confirmar que este sea PHA y determinar de qué PHA se trata, para esto deben ser determinadas las características físico-químicas del biopolímero extraído. Para determinar la estructura molecular y las propiedades finales, los PHAs son sometidos a diferentes técnicas analíticas, siendo las siguientes las más comúnmente utilizadas:

4.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica no destructiva que requiere poco tiempo de preparación de la muestra y permite una rápida caracterización de la estructura molecular de materiales poliméricos complejos. Esta herramienta es utilizada habitualmente para determinar la presencia de enlaces característicos de la estructura molecular de los PHAs (Kansiz, 2000; Oliveira y col., 2007; Valapil y col., 2007).

4.1.2 Resonancia magnética nuclear (NMR)

La resonancia magnética nuclear se ha utilizado durante muchos años ya que representa una potente herramienta para la determinación de la estructura molecular. Con esta técnica se ha determinado, principalmente en solución empleando cloroformo deuterado, la estructura, dinámica y disposición de grupos o cadenas laterales en diferentes PHAs (Doi y col., 1986, Łabuzek y Radecka, 2001; Luo y col., 2006; Numata y col., 2013; Tripathi y col., 2012; Ten y col., 2015).

4.1.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha surgido como una poderosa técnica experimental para la determinación de propiedades térmicas de biomacromoléculas. Mediante la medida del calor involucrado en las transiciones de

fase del material es posible obtener información sobre temperaturas y calores involucrados en dichas transiciones. Esto hace posible obtener información sobre los procesos de cristalización y fusión de los biopolímeros y analizar sus características en los estados intermedios involucrados (Spink, 2008). Su uso en el análisis de las propiedades térmicas de los PHAs es ampliamente reconocido (Hahn y col., 1994; Oliveira y col., 2007; Valapil y col., 2007; Reddy y col., 2015; Domínguez-Díaz y col., 2015).

4.1.4 Cromatografía de exclusión de tamaños o permeación de geles (GPC)

Las propiedades finales de los PHAs dependen de su masa molecular (Domínguez-Díaz y col., 2015). Para determinar la distribución de masas molares y los pesos moleculares promedio suele utilizarse la cromatografía por permeación de geles (GPC). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para los PHAs por diferentes investigadores (Bürger y col., 1993; Łabuzek y Radecka, 2001; Oliveira y col., 2007; Valapil y col., 2007; Ten y col., 2015).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Optimizar la extracción del PHA producido por *B. megaterium* BBST4

4.2.2 Caracterizar los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 empleando almidón, melaza de caña de azúcar y glicerol como fuentes de carbono y urea como única fuente de nitrógeno.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 a partir de distintas fuentes de carbono

Todos los PHAs estudiados fueron obtenidos empleando la cepa *Bacillus megaterium* BBST4. Esta cepa fue almacenada a -70 °C en caldo Tripticasa-soja (Britania B0210206, Argentina) con 20 % de glicerol.

Para las experiencias se utilizó como medio de cultivo base la solución salina de Winogradsky (SW) (**Anexo B**). Esta SW se complementó con 3 % de glicerol (SWG, **Anexo B**), 0,5 % de almidón (SWS, **Anexo B**) o 2 % de melaza de caña de azúcar (SWM, **Anexo B**), como fuentes de carbono y energía, y 0,1 % de urea como única fuente de nitrógeno. Todas las soluciones fueron preparadas con agua bidestilada. La SW se autoclavó a 1 atm durante 15 min. El glicerol y la melaza de caña de azúcar se autoclavaron con la SW mientras que el almidón y la urea se esterilizaron por filtración (**Anexo B**). Para cada fuente de carbono se emplearon por triplicado Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio. Los cultivos fueron realizados en un agitador Gerhardt SW 20 (Dinamarca) con baño termostatzado a 150 rpm y 30 °C. El pH inicial fue de 8 y los Erlenmeyers se retiraron a las 48 h de cultivo para determinar la biomasa y extraer y caracterizar el PHA producido.

4.3.2 Técnicas de extracción de PHAs empleando cloroformo

A continuación se describen los tres métodos de extracción ensayados para la extracción de PHAs con el medio SWG. La cepa *B. megaterium* BBST4 fue recuperada en caldo Tripticasa-soja e incubada a 30 °C en un agitador orbital durante 24 h. De este caldo se tomó una alícuota por medio de un ansa estéril la cual fue transferida a una placa con SWGA (con 3 % de glicerol y 0,1 % de urea). La placa fue incubada durante

48 horas a 30 ° C. Una colonia fue tomada con ansa estéril y transferida a un Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de SWG y este Erlenmeyer fue incubado a 30 °C y 150 rpm durante 48 h. Las células fueron recogidas mediante centrifugación (Rolco CM 4080, Argentina) durante 15 min a 2.000 g, posteriormente fueron lavadas dos veces con solución salina (NaCl 0,85 % p/v), y finalmente suspendidas en la misma solución. La densidad óptica de esta suspensión celular fue ajustada a una absorbancia de 0,2 a 550 nm (DO550), correspondiente a 10⁸ unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL), utilizando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, EE.UU.). Se utilizó 1 mL de esta suspensión de células como inóculo para los experimentos realizados en Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio. Los cultivos se incubaron durante 48 h a 30 °C y 150 rpm. El volumen de cada muestra fue centrifugado a 2.000 g por 15 min con el fin de recoger todas las células de la muestra. El pellet acumulado fue lavado dos veces con agua destilada, congelado a -70 °C y liofilizado (RIFICOR L-A-B3-C, con una bomba de vacío WELCH 1402). La biomasa liofilizada se pesó en una balanza analítica de 5 dígitos (Mettler AE 163, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, UK) y fue posteriormente empleada para la extracción del PHA.

A continuación se describen las técnicas de extracción estudiadas. Cada técnica se ensayó por triplicado.

4.3.2.1 Cloroformo en ebullición (*CHCl₃-Soxhlet*)

Se empleó la técnica descrita por Łabuzek y Radecka (2001). Las células liofilizadas se suspendieron en cloroformo en un matraz de fondo redondo. El PHA contenido en las células fue extraído con cloroformo en ebullición en Soxhlet durante series de tiempo de 6 a 7 h durante 2 días. La solución resultante se concentró por evaporación del solvente. Finalmente, el PHA obtenido se purificó por precipitación con

un volumen igual de hexano, se separó por filtración y se secó a peso constante en estufa a 37 °C. El contenido total de PHA de cada muestra fue obtenido por pesada en balanza analítica.

4.3.2.2 Hipoclorito y cloroformo en ebullición ($CHCl_3$ - $NaClO$)

Se empleó la técnica descrita por Valappil y col., 2007. 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 las células. Posteriormente, esta mezcla fue centrifugada a 6.000 g (centrífuga PK131, Thermo Electron Industries, Francia) y el sólido fue lavado dos veces con agua destilada, acetona, etanol y dietil éter. Finalmente, el material sólido fue sometido a extracción utilizando cloroformo en Soxhlet por 24 h. La solución de PHA en cloroformo fue concentrada por evaporación y el PHA fue purificado por precipitación utilizando hexano (Łabuzek y Radecka 2001; Chuah y col. 2013). El precipitado obtenido fue centrifugado y secado hasta peso constante en estufa a 37 °C.

4.3.2.3 Dispersión de cloroformo e hipoclorito (Dispersión $CHCl_3$ - $NaClO$)

Se empleó la técnica descrita por Hahn (1994). En esta técnica se utiliza una dispersión de cloroformo:hipoclorito:células con una relación 1:1:0,08 (mL:mL:g). El hipoclorito de sodio se encuentra a una concentración de 30 % (v/v, en agua) y las células corresponden a gramos de biomasa liofilizada. Esta mezcla es mantenida durante 90 min a 30 °C en un agitador a 150 rpm y luego centrifugada a 6.000 g durante 10 min. Se obtienen tres fases separadas. La fase superior contiene el hipoclorito de sodio, la fase intermedia contiene el material celular sin biopolímero y las células no lisadas, y la fase inferior corresponde a la solución de cloroformo con el PHA. La fase superior fue eliminada por extracción con pipeta y la solución de PHA en cloroformo es obtenida

por filtración. El PHA fue recuperado de la solución y purificado por precipitación con hexano (Łabuzek y Radecka 2001; Chuah y col. 2013).

4.3.2.4 Adaptación y puesta a punto de la técnica de mayor eficiencia

La técnica de extracción de PHA con cloroformo e hipoclorito de sodio descrita por Valappil y col. (2007) fue modificada en base a pruebas propias incorporando variantes de la técnica descrita por Manna y col. (1999) con la intención de mejorar la eficacia del proceso de extracción de PHA. Las células liofilizadas derivadas de cada muestra fueron lisadas por medio de digestión química con solución de hipoclorito de sodio (5,5 % v/v en agua) a 37 °C por 1 h con agitación constante y luego centrifugadas a 6.000 g. El residuo o pellet obtenido fue lavado dos veces con agua destilada, acetona y etanol, sucesivamente. Finalmente, cada pellet fue sometido a extracción con cloroformo en ebullición durante 15 min y filtrado con papel de filtro Whatman GF/C (47 mm, 1820047). El PHA disuelto en cloroformo fue purificado mediante precipitación con hexano y recuperado por evaporación del solvente (Manna et al. 1999; Chuah y col. 2013). La concentración de PHA fue definida como gramos de biopolímero por litro de cultivo celular (g/L).

4.3.3 Propiedades físico-químicas de los biopolímeros y equipamiento utilizado para las técnicas de caracterización de PHAs

Todas las técnicas analíticas que se describirán a continuación fueron empleadas en la caracterización de los PHAs producidos a partir de las tres fuentes de carbono estudiadas (medios SWG, SWS y SWM), a excepción de la técnica de GPC que sólo fue aplicada al PHA producido a partir de glicerol (PHA_G).

4.3.3.1 Espectroscopía de FTIR

Los PHAs obtenidos fueron disueltos en cloroformo y gotas de dichas soluciones fueron colocadas sobre una ventana de NaCl obteniéndose finalmente una delgada película del biopolímero por evaporación del solvente. Los espectros se obtuvieron en un equipo FTIR Nicolet Nexus (Thermo Scientific, EE.UU.) en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} empelando 40 barridos por cada muestra.

En base a los espectros FTIR se determinó el índice de cristalinidad (CI) (para esta determinación se utilizaron películas de PHA con un tiempo determinado desde su preparación: 12 h o más de evaporación del solvente (Xu y col., 2002)). El índice de cristalinidad (IC) se calculó como la relación entre las intensidades de las bandas a 1382 cm^{-1} y 1185 cm^{-1} de acuerdo a lo propuesto por Bloembergen y col. (1986). Xu y col. (2002) demostraron que la banda de referencia en 1382 cm^{-1} sólo se puede utilizar para PHAs de rápida cristalización, pero no es adecuado para co-polímeros que contengan monómeros de cadena corta y media longitud (scl-mcl-PHA). Por lo tanto, Xu y col. (2002) sugirieron un nuevo índice de cristalinidad (CI_1) definido como la relación entre las absorbancias de las bandas en 1230 cm^{-1} y 1453 cm^{-1} . Posteriormente, Luo y col. (2006) sugirieron otro índice en el que la banda en 1453 cm^{-1} puede ser considerada como banda de referencia para la medición del grado de cristalinidad. Este nuevo índice de cristalinidad (CI_2) se basa en la relación entre la intensidad de las bandas a 1453 cm^{-1} y 1185 cm^{-1} . A modo de comparación en este trabajo se calcularon los distintos índices de cristalinidad propuestos por los diferentes autores de modo tal de poder estimar el índice de cristalinidad de los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4.

4.3.3.2 Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ y HSQC)

La estructura molecular de los PHAs obtenidos fue determinada por resonancia magnética nuclear en un equipo Bruker Avance III-300 (Top spin 3.2) a 300 MHz

usando como solvente CDCl_3 (Aldrich, 99,8% de átomos D, conteniendo 0,003% v/v de TMS). Se registraron los espectros ^1H - y ^{13}C -NMR de una dimensión y el espectro HSQC (coherencia cuántica simple heteronuclear) de dos dimensiones. Para cada análisis se emplearon aproximadamente 10 mg de muestra y 1 mL de solvente. Para ^1H -NMR se emplearon los siguientes parámetros: 11,25 μs de duración del pulso de 90° , 6009,615 Hz de amplitud espectral, con 8 escaneos y un retraso de relajación de 1 segundo. Para el ^{13}C -NMR se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como referencia interna (a 77,0 ppm). Los escaneos utilizados para ^{13}C y HSQC fueron de 4096 y 128, respectivamente. La composición del PHA se obtuvo en base al espectro ^1H -NMR empleando la relación de las áreas integradas de las señales de los hidrógenos de los grupos metilo y metileno. La determinación de similitudes espectrales y la correlación entre los espectros y la estructura de los PHA predichas se determinaron con el software MestReNova versión 9.0.1 (Mestrelab Research S.L., 2014).

4.3.3.3 Propiedades térmicas (DSC)

Las propiedades térmicas de los biopolímeros extraídos se midieron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro Perkin Elmer Pyris 1, calibrado con indio y n-heptano como estándares. Para cada muestra de PHA de aproximadamente 10 mg se llevó a cabo un ciclo de calentamiento-enfriamiento-calentamiento en el rango de temperaturas de 30 a 200 $^\circ\text{C}$ con una velocidad de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$. Las propiedades térmicas se calcularon empleando el enfriamiento (cristalización) y el segundo calentamiento (fusión).

4.3.3.4 Masas moleculares (GPC)

La distribución de masas molares y los pesos moleculares promedio en número (M_n) y en peso (M_w), se obtuvieron mediante cromatografía por exclusión de tamaño (GPC). El sistema utilizado está conformado por una bomba Waters 515 con un detector

de índice de refracción Waters 410, fueron empleadas tres columnas Phenogel lineal de 5 μm y una pre-columna de 5 μm (Phenomenex). Como solvente se utilizó cloroformo a 30 °C con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 200 μL , la calibración se realizó con estándares de poliestireno (PS) y se utilizaron las siguientes constantes de Mark-Houwink: $K_{\text{PS}} = 4,9 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}$ y $\alpha_{\text{PS}} = 0,794$ para el PS y $K_{\text{PHB}} = 11,8 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}$ y $\alpha_{\text{PHB}} = 0,78$ para el PHA.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 PHA obtenido con cada técnica de extracción

El PHA obtenido con cada técnica de extracción estudiada se determinó en base al porcentaje de PHA obtenido por extracción en relación al peso seco de células obtenidas del volumen final de cada experiencia (en g de biomasa/L de medio). Los resultados se presentan en la **Tabla 4.1**. De estos resultados se desprende que en iguales condiciones de crecimiento, la técnica basada en la dispersión de hipoclorito-cloroformo presentó el menor porcentaje de polímero extraído (menor a 3 %) en comparación con la técnica en la que se obtuvo el máximo porcentaje de PHA extraído y que emplea hipoclorito y cloroformo en etapas separadas (en la que el PHA obtenido fue cercano a 7 %). Por lo que se seleccionó esta última técnica y se modificaron algunos pasos para mejorar la extracción de PHAs. A partir de esta técnica modificada $(\text{CHCl}_3\text{-NaClO})_{\text{mod.}}$ el PHA obtenido fue mayor al obtenido con la técnica original, lográndose cerca de 11% de PHA extraído (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Extracción de PHA con las distintas técnicas estudiadas

	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	PHA (%)
CHCl ₃ -Sohxlet	2,9759±0,0581	0,15±0,02 ^a	5,06
CHCl ₃ -NaClO	3,0733 ±0,0329	0,21±0,03 ^a	6,83
Dispersión	3,0067 ±0,0615	0,08±0,01 ^b	2,55
CHCl ₃ -NaClO _{mod.}	2,8895 ±0,0388	0,31±0,02 ^c	10,73

a, b y c: diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$)

4.4.2 Caracterización

4.4.2.1 Espectroscopía de FTIR

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 a partir *B. megaterium* BBST4 empleando glicerol, almidón y melaza de caña de azúcar como fuentes de carbono. Los enlaces químicos de cada biopolímero fueron identificados en base a sus bandas características. Esta técnica de caracterización sólo fue empleada para confirmar la producción de PHAs debido a que mediante FTIR no es posible identificar los diferentes monómeros dada la similitud entre los grupos químicos que los componen (López Jiménez, 2011). Los espectros FTIR de los PHAs extraídos se presentan en la **Figura 4.1**. Los mismos corresponden a los PHAs producidos tras 24 h de cultivo a 30 °C y 150 rpm. Puede observarse que los espectros FTIR para las tres muestras tienen varias similitudes y ciertas diferencias con el espectro de un PHB puro (PHB Industrial, Brasil). Del mismo modo, los espectros de estos PHAs presentan grandes similitudes con los PHAs obtenido por varios autores con distintas cepas de *Bacillus* (Valappil y col., 2007; Vishnuvardhan Reddy y col., 2009; Domínguez-Díaz y col., 2015). Las señales de estiramiento correspondientes al carbonilo del grupo éster de los PHAs pueden observarse típicamente entre 1750 y 1720 cm⁻¹ (Kansiz, 2000; Shahid y col., 2013). Esta señal se presenta en 1722 cm⁻¹ en el PHB

homopolímero, de forma similar a lo observado en el PHB puro producido por la cepa *Ralstonia eutropha* PHB⁻⁴ (Luo y col., 2006), mientras que se ubica entre 1723 y 1724 cm^{-1} en las tres muestras de PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4. Otras bandas características de los PHAs se ubican entre 1450 y 1000 cm^{-1} y corresponden a deformaciones de los grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_2), así como a estiramientos del grupo CO (Kansiz, 2000). En las tres muestras de PHAs obtenidas en este trabajo se puede observar entre 1453 y 1456 cm^{-1} la banda correspondiente a la deformación asimétrica del enlace C–H de los grupos CH_2 que en el PHB puro se ubica entre 1452 y 1453 cm^{-1} . La banda alrededor de 1380 cm^{-1} está relacionada con los movimientos de deformación simétricos de los grupos CH_3 y se observa en las tres muestras de PHA y en la del PHB puro. Del mismo modo pueden ubicarse la banda correspondiente a las conformaciones de cadenas helicoidales del PHB alrededor de 1230 cm^{-1} y la banda característica de la vibración simétrica del grupo C–O–C alrededor de 1133 cm^{-1} (Xu y col., 2002) en las 4 muestras (**Figura 4.1**), mientras que la banda características de la vibración asimétrica del grupo C–O–C se ubica entre 1184 y 1186 cm^{-1} en los espectros de los PHAs, pero se observa en 1181 cm^{-1} para el PHB puro. Las bandas restantes características de los PHAs que corresponden a la vibración del enlace C–O del grupo éster se pueden observar bien definidas entre 1000 y 1300 cm^{-1} . La banda originada por los H correspondientes a los grupos OH terminales se observa en 3436 cm^{-1} en los espectros de los PHAs, mientras que se observa en 3434 cm^{-1} en el espectro del PHB puro.

En la **Tabla 4.2** se presentan los CIs determinados para los tres PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 a partir de FTIR. Se puede observar que para los tres PHA obtenidos los CIs son menores al correspondiente al PHB comercial, mientras que

el CI del PHB comercial fue muy similar a los determinados por Xu y col. (2002) y Luo y col. (2006).

En base a los CI₁, el PHA que menor porcentaje de comonómeros diferentes al 3-hidroxi-butirato (HB) debería presentar es el PHA_G mientras que el PHA_M debería tener el mayor porcentaje de comonómeros. Sin embargo los resultados serían diferentes si se utiliza el CI o el CI₂, ya que el PHA que menor porcentaje de comonómeros diferentes al 3-hidroxi-butirato (HB) debería tener es el PHA_M mientras que el PHA_G debería tener el mayor porcentaje de dichos comonómeros.

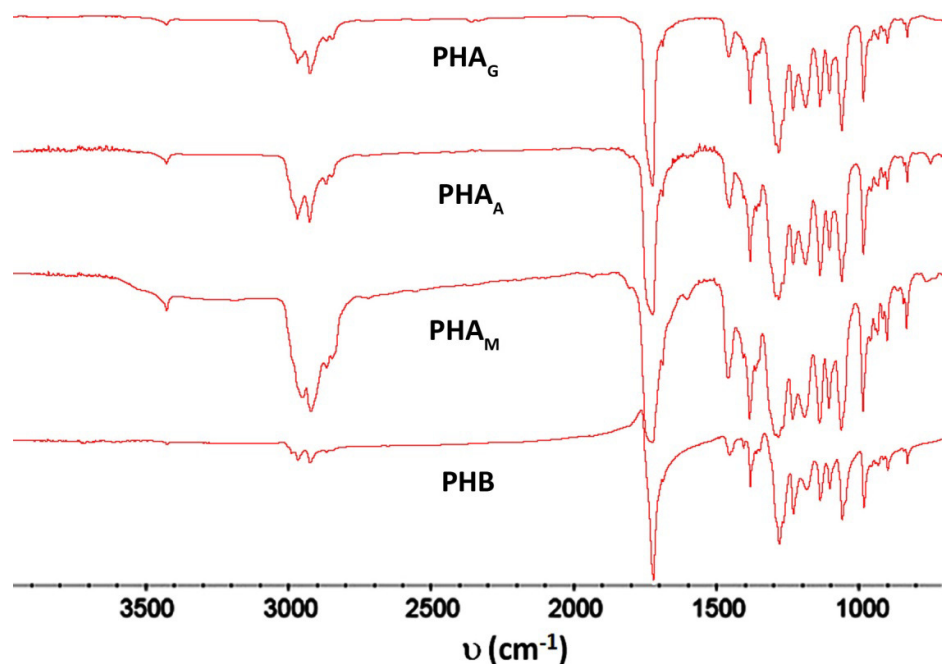


Figura 4.1. Espectros FTIR del PHB comercial y los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 a partir de distintas fuentes de carbono. **PHA_G**: PHA empleando glicerol, **PHA_A**: PHA empleando almidón, **PHA_M**: PHA empleando melaza de caña de azúcar y **PHB**: PHB comercial.

Tabla 4.2. Índices de cristalinidad (CIs) determinados para el PHB comercial y los tres PHAs producidos por la cepa *B.megaterium* BBST4 a partir de FTIR y DSC.

Muestra	Altura de pico				CI	CI ₁	CI ₂
	1453 cm ⁻¹	1382 cm ⁻¹	1230 cm ⁻¹	1185 cm ⁻¹			
PHB	0,21	0,49	0,52	0,25	1,96	2,51	0,83
PHA _A	0,14	0,32	0,24	0,28	1,15	1,70	0,50
PHA _M	0,30	0,55	0,39	0,40	1,38	1,30	0,75
PHA _G	0,08	0,20	0,18	0,18	1,09	2,14	0,46

PHB: PHB comercial, PHA_A: PHA producido a partir de almidón como fuente de carbono, PHA_M: PHA producido a partir de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, PHA_G: PHA producido a partir de glicerol como fuente de carbono. CI: Índice de cristalinidad definido por Bloembergen y col. (1986), CI₁: Índice de cristalinidad definido por Xu y col. (2002), C₂: Índice de cristalinidad definido por Luo y col. (2006).

4.4.2.2 Estructura molecular (¹H-NMR, ¹³C-NMR y HSQC)

Los espectros de ¹H-NMR de los PHAs producido por la cepa *B. megaterium* BBST4 se presentan en las **Figuras 4.2.A** y **4.2.B**.

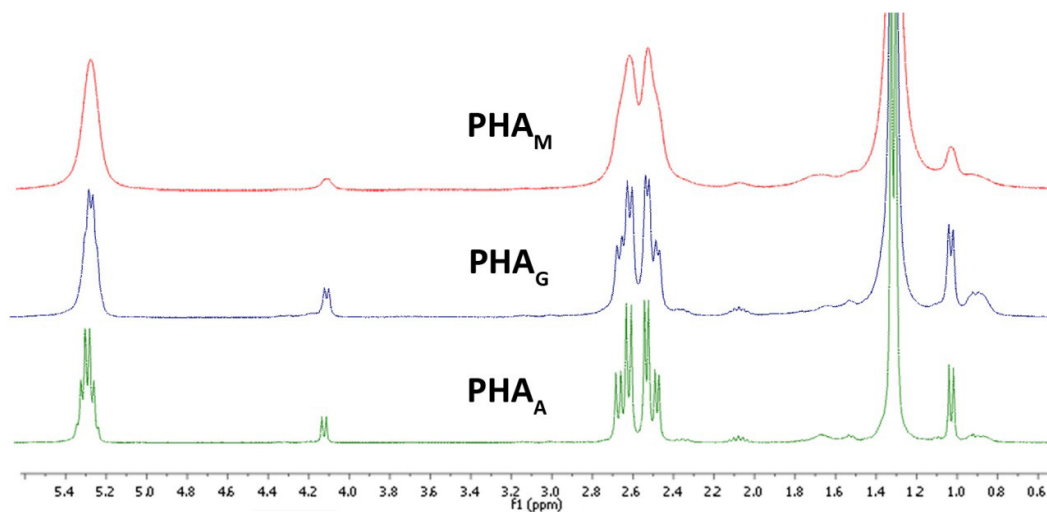


Figura 4.2.A. Espectro ¹H-NMR. (—) PHA empleando melaza de caña de azúcar, (—) PHA empleando glicerol y (—) PHA empleando almidón.

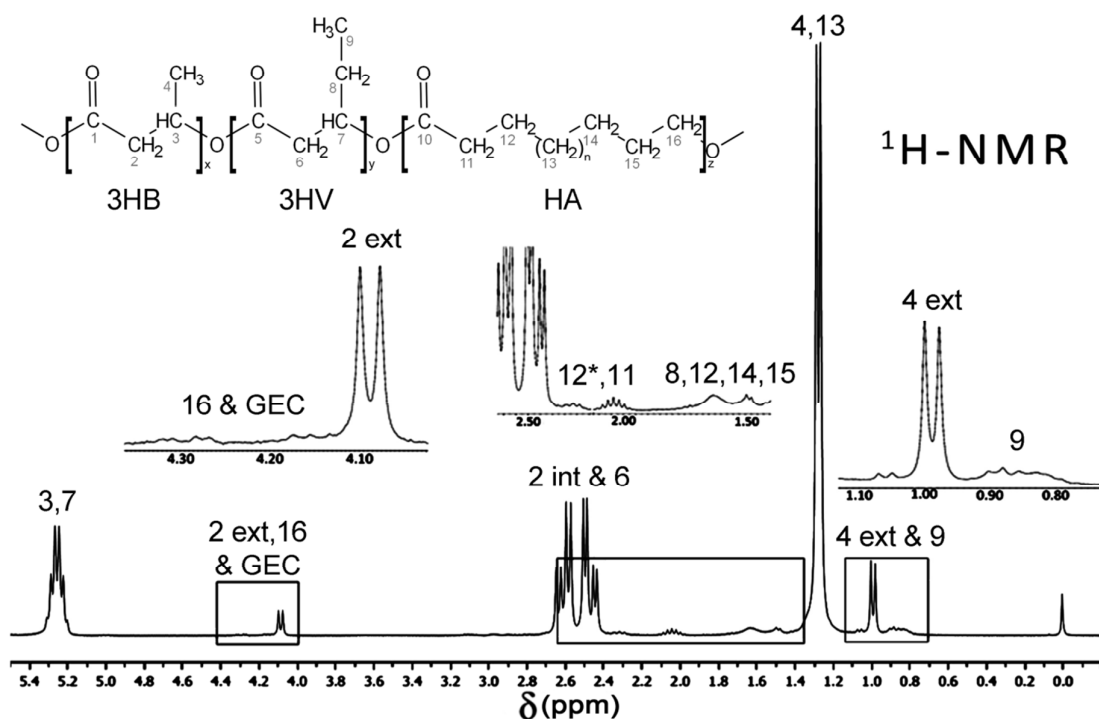


Figura 4.2.B. Espectro $^1\text{H-NMR}$ del PHA_A .

Los tres espectros $^1\text{H-NMR}$ parecen presentar bandas muy similares, aunque el espectro del PHA_M presenta menos resolución en los picos obtenidos. De todas maneras, de la **Figura 4.2.A** se desprende que los espectros de los tres PHAs presentan altas similitudes y que probablemente las diferencias observadas se deben a la cantidad de muestra utilizada o a la cantidad de escaneos realizados. En base al $^1\text{H-NMR}$ se determinó que los dobletes y multipletes entre 0,83 y 0,88, 1,1 y 1,4, 2,03 y 2,34, 4,08 y 4,10 ppm, corresponden a los hidrógenos de los grupos CH_3 , CH_2 y CH , típicos de poli(hidroxicanoato)s de cadena media (mcl-PHA). El doblete presente entre 2,29 y 2,63 ppm y el multiplete cuya señal se encuentra entre 5 y 5,3, pertenecen a los grupos metileno (CH_2) y metino (CH), respectivamente, y típicamente corresponden al hidroxibutirato (HB) (Kulprecha y col., 2009). Los picos que presumiblemente corresponden a hidrógenos de los grupos CH_2 y CH_3 de hidroxialcanoatos (HA) e hidroxibutirato (HB), respectivamente, podrían solaparse en 1,25 y 1,29 ppm.

En las **Figuras 4.3.A y 4.3.B**, correspondientes a espectros de ^{13}C -NMR, los picos presentes en 14, 22,6 a 40,8, 67,3 a 71,8 y 169,2 ppm corresponden a los carbonos de los grupos CH_3 , CH_2 , CH y $\text{C}=\text{O}$, respectivamente, y se corresponden con las estructuras del 3HV y HAs de cadena media (mcl-PHA) observadas en el espectro ^1H -NMR.

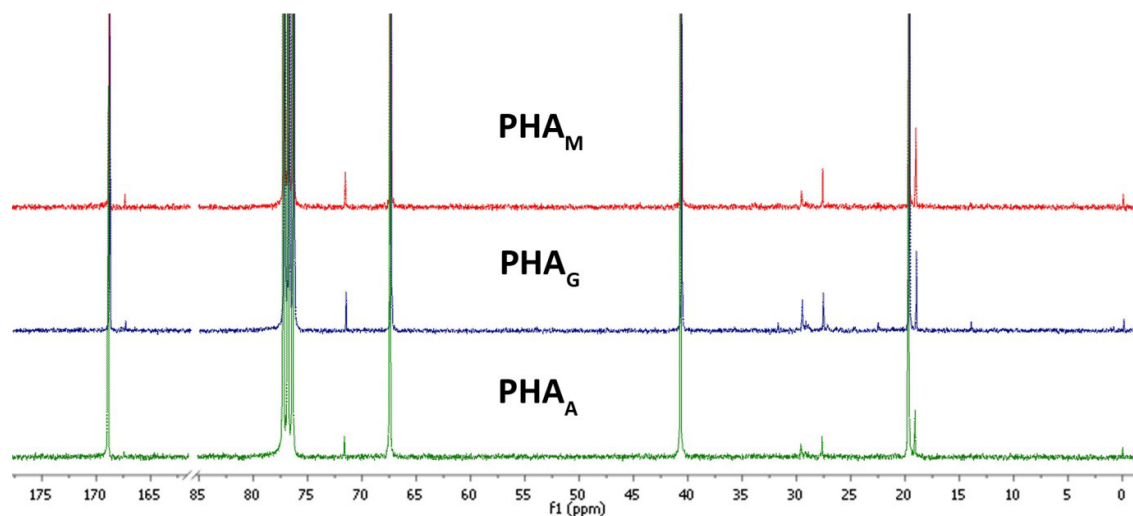


Figura 4.3.A. Espectro ^{13}C -NMR. (—) PHA empleando melaza de caña de azúcar, (—) PHA empleando glicerol y (—) PHA empleando almidón.

Por otra parte, los picos observados en 19,8, 40,8, 67,6 y 169,1 ppm, corresponden a los carbonos de los grupos CH_3 , CH_2 , CH y $\text{C}=\text{O}$, respectivamente, del hidroxibutirato (HB). La composición de los biopolímeros obtenidos se determinó utilizando los datos de integración de las áreas del espectro ^1H -NMR, tomándose como referencia el espectro del PHA_A , que presentó la mejor resolución. Por medio de esta integración se estableció que el PHA producido por la cepa *B. megaterium* BBST4 estaría compuesto por 3HB (~ 89,3 mol%) y un porcentaje de monómeros de 3HV (~ 5,6 mol%) e hidroxialcanoatos de cadena de longitud media (mcl-HA, por sus siglas en inglés) (~ 5,2 mol%).

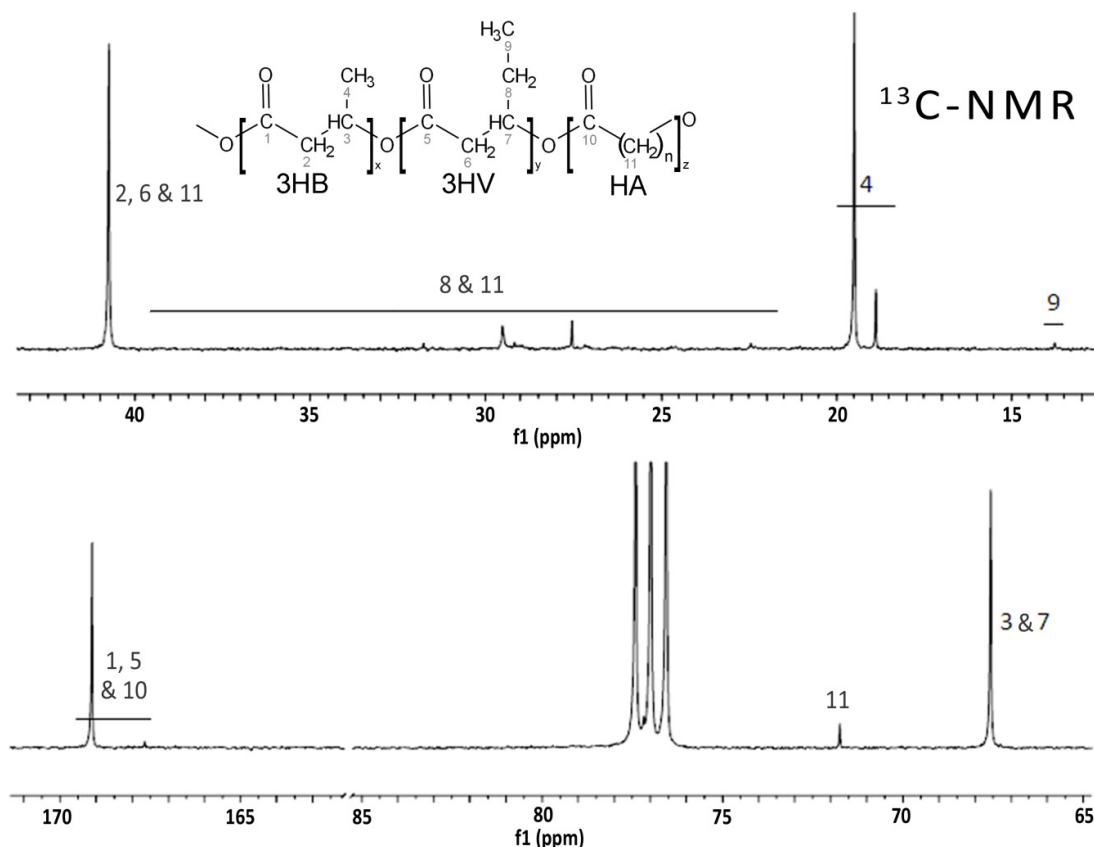


Figura 4.3.B. Espectro ^{13}C -NMR del PHAG.

Para confirmar las asignaciones de los desplazamientos químicos, se empleó HSQC (**Figura 4.4**). Las asignaciones de pico cruzadas observadas en este espectro se presentan en la Tabla 4.3. Las asignaciones observadas entre 0,90 ppm y 14,2 ppm, y entre 1,53 ppm y 26,7 ppm, pueden ser atribuidas a las señales de la cadena lateral de 3HV conformada por los grupos CH_3 y CH_2 , respectivamente. Las otras asignaciones de pico cruzadas pueden atribuirse a los grupos CH_2 de monómeros de mcl-HA, probablemente con extensión interna de cadena (es decir, 6HHx, 7-hidroxihexanoato, entre otros), a excepción de la señal en 27,5 ppm y 2,06 ppm, que podrían dar una indicación de la presencia de grupos CH_2 de mcl-HA de cadena lateral extendida o de 4HB (Shahid y col., 2013).

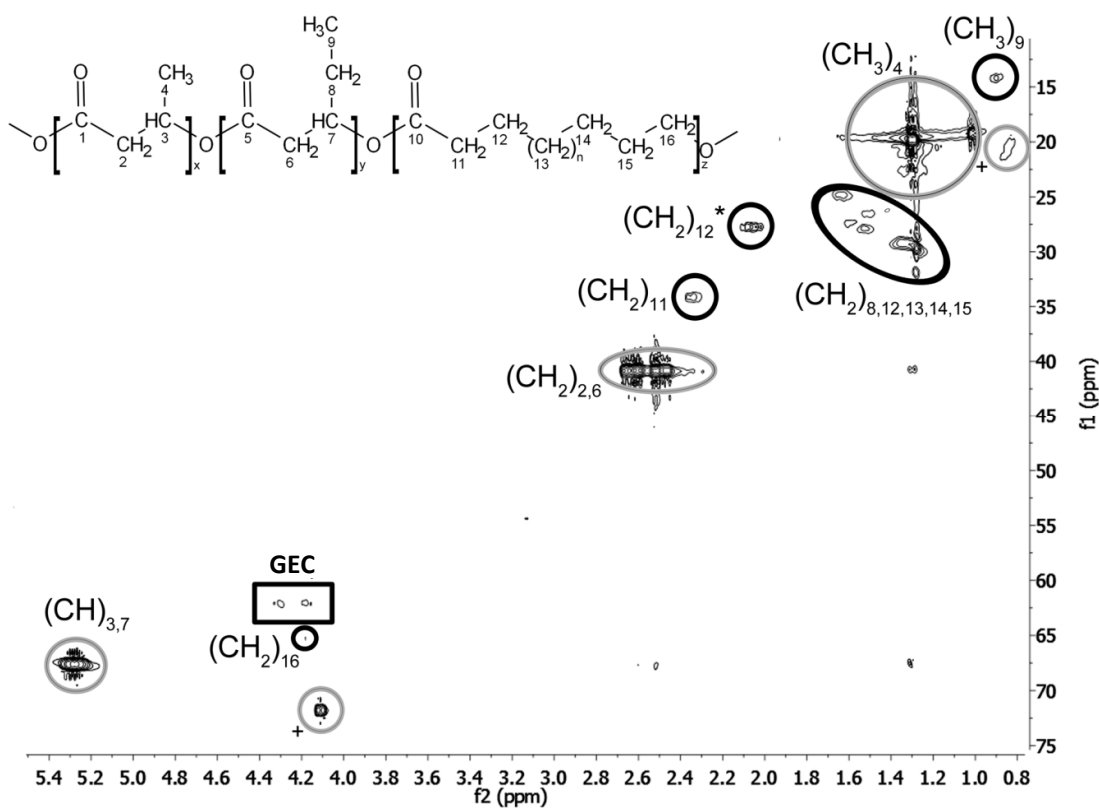


Figura 4.4. Espectro HSQC del PHA_G.

Los picos de protones en 4,15 a 4,29 ppm pueden estar relacionados con la señal entre 61,8 y 62,5 ppm en el espectro de carbono (Figura 4.4). Estos picos probablemente muestren señales de hidrógeno de los grupos CH₂ de glicerol (dos dobletes dobles), generados por la esterificación terminal de la cadena de PHA con los grupos hidroxilo del glicerol (Figuras 4.2.B y 4.4), que produce un PHA protegido terminalmente (GEC, por sus siglas en inglés) (Kulpreecha y col., 2009).

Tabla 4.3. Asignaciones cruzadas de pico para el PHA producido por la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 a pH inicial de 8 y 48 h de incubación.

Grupo [†]	δ (ppm)	
	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
(COO) _{1,5,10}	169.2-169.1	-
(CH) _{3,7}	66.4-68.6	5.24-5.30
(CH ₂) _{2,6}	48.9-41.9	2.45-2.67
(CH ₂) ₈	26.7	1.53
(CH ₂) ₁₁	34.2	2.34
(CH ₂) ₁₂	24.9	1.63
(CH ₂) ₁₂ [*]	27.5	2.06
((CH ₂) ₁₃) _n	29.2-31.9	1.27-1.31
(CH ₂) ₁₄	26.1	1.42
(CH ₂) ₁₅	27.7	1.61
(CH ₂) ₁₆	65.1	4.18
(CH ₃) ₄	18.6-21.8	1.35-1.23
(CH ₃) ₉	14.2	0.90

[†] los números de grupo siguen las asignaciones que se muestran en las figuras 4.3.A y 4.4.

^{*} para el 4HB o mcl-HA con extensión de lateral de la cadena

4.4.2.3 Propiedades térmicas (DSC)

En la **Figura 4.5** se presentan los termogramas correspondientes al segundo calentamiento para el PHA producido por la cepa *B. megaterium* BBST4 a partir de las tres fuentes de carbono utilizadas y para el PHB homopolímero. El valor de temperatura de fusión (T_m) obtenido para los tres PHAs fue observado en torno a 153 °C, siendo levemente superior para el PHA obtenido a partir de almidón como fuente de carbono (155,9 °C). En todos los casos son menores al T_m obtenido para el PHB homopolímero producido por la misma cepa utilizando glucosa como única fuente de carbono ($T_m = 170,6$ °C, López Jiménez, 2011). Además, en los tres PHAs obtenidos se observa un segundo pico de fusión a menores temperaturas (alrededor de 132 °C) siendo este pico levemente superior para el PHA obtenido a partir de almidón como fuente de carbono

(135,2 °C). La temperatura de cristalización se observó en torno a los 60 °C para los tres PHAs.

El índice de cristalinidad de los biopolímeros obtenidos se calculó según la relación entre la entalpía de fusión de cada PHA y la entalpía de fusión de un cristal perfecto de PHB (149,37 J/g, Barham y col., 1984), y se compararon con los ICs determinados por FTIR (Tabla 4.5).

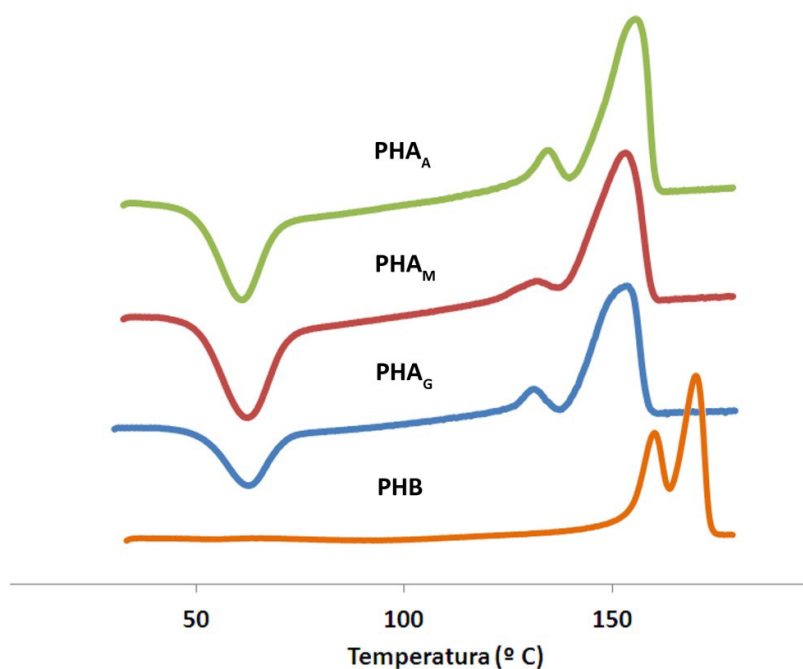


Figura 4.5. Termogramas correspondientes al segundo calentamiento de los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4. Líneas: (—) PHA empleando almidón, (—) PHA empleando melaza de caña de azúcar y (—) PHA empleando glicerol y (—) PHB comercial.

Se puede observar que los índices de cristalinidad de los PHAs fueron muy similares y menores que el IC_{DSC} del PHB producido con la misma cepa utilizando glucosa como única fuente de carbono (IC_{DSC} = 0,62; López Jiménez, 2011).

Tabla 4.4. Propiedades térmicas de los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 así como de un PHB homopolímero obtenidas por DSC.

Muestra	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	IC_{DSC}
PHB*	170,60	91,83	0,62
PHA _M	153,49	55,25	0,37
PHA _A	155,85	56,58	0,38
PHA _G	153,52	54,54	0,37

*PHB producido por la misma cepa empleando glucosa como fuente de carbono (López Jiménez, 2011), PHA_A: PHA producido a partir de almidón como fuente de carbono, PHA_M: PHA producido a partir de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, PHA_G: PHA producido a partir de glicerol como fuente de carbono, T_m : temperatura de fusión, ΔH_m : entalpía de fusión, IC_{DSC} : índice de cristalinidad determinado por DSC.

4.4.2.4 Masas moleculares (GPC)

Debido a algunos problemas relacionados con el equipamiento, solamente fue analizado el PHA obtenido con el medio SWG (3% de glicerol y 0,08 % de urea). La masa molar promedio en número (M_n) fue de 15.800 g/mol y la masa molar promedio en peso (M_w) fue de 29.700 g/mol, por lo tanto el índice de polidispersidad (M_w/M_n) obtenido fue de 1,88. El PHA extraído presentó valores de M_n y M_w relativamente bajos si se comparan con un PHB homopolímero reportado en la literatura cuyo M_w está en el intervalo de 1,0 a 3,0 10^6 g/mol (Valentin y col., 1997; Luo y col., 2006).

4.5 DISCUSIÓN

4.5.1 Técnicas de extracción

En este trabajo se introdujeron algunas modificaciones a las técnicas descritas por Manna y col. (1999) y Valappil y col. (2007). La concentración de PHA obtenida utilizando la técnica modificada fue mayor a la obtenida con las otras técnicas propuestas, por lo que fue empleada para todas las extracciones en las experiencias

realizadas (**Capítulos 2, 3 y 5**) lográndose porcentajes de PHA extraído de hasta el 30% (en relación al peso liofilizado de las células, en g/L de medio) en medio SWG con extracto de levadura en muy bajas concentraciones (**Capítulo 2**).

4.5.2 Espectroscopía de FTIR

En relación al espectro obtenido para el PHB comercial, la absorbancia de la banda cristalina en 1230 cm^{-1} muestra una menor altura en los espectros de los PHAs con respecto a la altura de la banda amorfa en 1185 cm^{-1} . Esto mismo fue observado por Luo y col. (2006) con el aumento de hidroxioctanoato (HO) en el biopolímero producido por la cepa *R. eutropha* PHB⁴ a partir de octanoato y gluconato como fuentes de carbono y energía. Por esto, la disminución de los CIs de los PHAs en comparación con el CI del PHB comercial es un indicativo de la presencia de otros monómeros diferentes al 3-hidroxibutirato en la estructura de los PHAs. En comparación con los CIs determinados por Xu y col. (2002) y Luo y col. (2006) para el PHB puro y otros PHAs, los valores de CIs para los PHAs producidos por *B. megaterium* BBST4 se encuentran en un rango de CI intermedio, por lo que el contenido de hidroxialcanoatos de cadena corta o media en los biopolímeros deberían ser menores a los mínimos porcentajes reportados por estos autores. Los trabajos citados analizan copolímeros con relaciones de hidroxialcanoatos (HA) a hidroxibutirato (HB) (HA:HB) superiores a 0,08. Teniendo en cuenta este valor, el alto CI observado para los PHAs producidos por la cepa *B. megaterium* BBST4 pueden deberse a tasas bajas de HA:HB (de alrededor de 0,04).

4.5.3 Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$)

En base a los espectros de $^1\text{H-NMR}$, y en acuerdo con otras técnicas de caracterización empleadas, los biopolímeros producido por *B. megaterium* BBST4 empleando distintas fuentes de carbono estarían compuestos principalmente por HB con un fracción de HA (aproximadamente 4 mol%) de longitud de cadena corta o media. Un espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ similar a los observados para los PHAs producidos por *B. megaterium* BBST4 fue obtenido empleando *Cupriavidus necator* DSMZ 545 (Muestra A) utilizando residuos de la producción de biodiesel (López Jimenez, 2011). Este autor determinó que el PHA producido por *C. necator* DSMZ 545 (Muestra A) correspondía a P(3-HB-co-3HV) en coincidencia con los valores reportados para este copolímero por Kamiya y col. (1989), aunque la fracción estimada por López Jimenez (2011) fue de un 12 mol% de 3HV. Es importante destacar que un PHA con un contenido de HB de aproximadamente 94 mol% tendrá propiedades mecánicas similares al polietileno de baja densidad (LDPE) (Luo y col., 2006).

Zhu y col. (2009) propusieron que el glicerol puede esterificarse con el PHB produciendo una finalización temprana de la cadena y generando así polímeros de cadena más corta. Esta esterificación se puede observar en el espectro $^1\text{H-NMR}$ de un PHA por la presencia en el polímero de hidrógenos del glicerol, mostrando picos distintivos en la región comprendida entre 3,6 y 4,2 ppm. Los picos observados alrededor de esta zona aparecen muy acentuados y se observan en los espectros $^1\text{H-NMR}$ de las tres muestras de PHA producidos por la cepa a partir de tres fuentes de carbono distintas, dos de las cuales no contienen ningún aporte de glicerol. De todas maneras, contemplando esta alternativa, se determinaron las tasas entre las áreas del pico entre 4,08 y 4,10 y un pico de referencia del PHB (en este caso se empleó específicamente el pico del grupo metileno entre 5 y 5,3 ppm) de los tres PHAs. Los

valores obtenidos para esta tasa fueron muy similares para los 3 PHAs (aproximadamente 1,33). Esto indica que la presencia de estos picos no debería corresponder específicamente a la esterificación con glicerol terminal, inclusive para el PHA_G, sino probablemente a la presencia de otro tipo de monómero de HA en el polímero.

El espectro de RMN de protón del PHA producido por *B. megaterium* BBST4, presenta picos característicos similares a los observados para el PHA producido por la cepa *Bacillus cereus* UW85 (Łabuzek y Radecka, 2001) y por *Bacillus megaterium* DSM 509 (Shahid y col., 2013) empleando β-caprolactona y glicerol como fuentes de carbono, respectivamente. Por otro lado se realizaron análisis de verificación de la correlación entre los espectros obtenidos y espectros simulados de moléculas de PHA propuestas, variando secuencialmente los carbonos de los grupos R (2 a 16 C) en posiciones externas e internas de las moléculas de PHA simuladas. Se observó en general una alta coincidencia (81 %) entre los espectros de los PHA y una molécula simulada de PHA compuesta por HB y monómeros de HV e HA de 14 carbonos, con una pureza del 97,8 % en la representación de este compuesto en el espectro y sin inconsistencias en el análisis.

4.5.4 Propiedades térmicas (DSC)

Los valores de temperatura de fusión (T_m) para los PHAs producidos por *B. megaterium* BBST4 fueron en los tres casos inferiores a los valores reportados en la literatura para el PHB, 173 a 176 °C (Hahn y col., 1995) y menores al T_m obtenido para un PHB homopolímero producido por la misma cepa utilizando glucosa como única fuente de carbono ($T_m = 170,6$ °C; López Jiménez, 2011). Los T_m obtenidos fueron similares a los del PHA producido por la cepa *C. necator* DSMZ ($T_m = 155$ °C)

empleando residuos de la producción de biodiesel (López Jimenez, 2011) y al del PHA producido por *Ralstonia eutropha* PHB-4 recombinante con 93,4% en moles de HB y 6,6% en moles de HA con 6 a 12 átomos de carbono ($T_m = 154$ °C) (Shen y col., 2011). En este sentido, el segundo pico de fusión observado, a temperaturas más bajas, podría atribuirse a la presencia de comonómeros en el polímero, aunque también puede deberse a cristales imperfectos. La temperatura de cristalización observada para los tres PHAs fue intermedia a la observada para un copolímero y una mezcla de PHB y polihidroxihexanoato (PHHx) (69,1 °C y 58,6 °C, respectivamente) obtenido con la cepa *Pseudomonas putida* KT2442 (Tripathi y col., 2012). También fue intermedia a la de los co-polímeros de PHA producidos por *C. necator* DSMZ 545 (72,61 °C y 44,11 °C) empleando residuos de la producción de biodiesel (López Jimenez, 2011). Estos datos son relevantes debido a que una disminución en la temperatura de fusión aumenta la procesabilidad de los biopolímeros minimizando su degradación. El índice de cristalinidad de los PHAs obtenidos en este trabajo se corresponde con valores de IC_{DSC} de copolímeros conteniendo porcentajes de HA de cadena corta o media menores a 7,6 % según lo determinado para los PHAs obtenidos por Luo y col (2006). Por otra parte, una disminución en el grado de cristalinidad aumenta la velocidad de degradación ya que las regiones amorfas se degradan más rápidamente que las regiones cristalinas (Valappil y col., 2007), esto facilitaría de manera considerable la utilización de estos biopolímeros en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, entre otras (López Jiménez, 2011).

Los resultados obtenidos a partir de DSC mostraron que tanto la temperatura como la entalpia de fusión varían con el contenido de 3HB en la estructura del PHA. Por lo que una disminución en el porcentaje de HB o un aumento en el porcentaje de HA en el polímero genera una disminución en dichos valores. Además, algunos autores

han demostrado que si los monómeros que se incorporan en la estructura del PHA son HA de cadena media o larga se verán modificadas considerablemente las propiedades del PHA, obteniéndose biopolímeros con propiedades específicas para ciertas aplicaciones biomedicas (Lenz y Marchessault, 2005; Nobes y col., 1998).

4.5.5 Masas moleculares (GPC)

El PHA_G extraído presentó valores de M_n y M_w relativamente bajos, si son comparados con los del PHB obtenido de la cepa *R. eutropha* PHB-4 cultivada en un medio con gluconato como única fuente de carbono, ($M_n = 1.345.000$ g/mol y $M_w = 1.625.000$ g/mol; Luo y col., 2006). Según algunos autores estos valores de M_n y M_w probablemente estén relacionados a las condiciones y tiempos específicos de cultivo (Kusaka y col., 1997; Madison y Huisman, 1999). Por otro lado, los valores de M_n y M_w obtenidos en el presente trabajo son similares a los reportados para el PHA producido por la cepa *R. eutropha* PHB-4 con 80,2% de HB y 19,8% de HA (Shen y col., 2011). El índice de polidispersión (M_w/M_n) obtenido en este trabajo (1,88) es comparable con los reportados para PHAs sintetizados por diferentes *Bacillus* spp. utilizando diversas fuentes de carbono (Tajima y col., 2003; Valappil y col., 2007). También es comparable con el PHA obtenido a partir de *R. eutropha* PHB-4 con distintas concentraciones de HA en el polímero de PHA (Shen y col., 2011).

4.6 CONCLUSIONES

Se logró poner a punto una técnica de extracción de PHAs con la que se obtuvo una mayor eficiencia que la obtenida con las tres técnicas inicialmente implementadas para tal fin. Esta técnica fue utilizada con éxito en todas las experiencias realizadas para esta tesis.

Los resultados de caracterización mostraron que el PHA producido por *B. megaterium* BBST4 cuando crece en un medio basal salino mínimo con glicerol, almidón o melaza de caña de azúcar como fuentes de carbono y urea como única fuente de nitrógeno presenta aproximadamente un 89,3 mol% de 3HB, un 5,6 mol% de 3HV y un 5,2 mol% de monómeros de mcl-HA, probablemente con extensión interna de la cadena. En base a la información recabada de la bibliografía se puede concluir que en esta tesis se presenta el primer reporte sobre la producción de copolímeros de PHA empleando una cepa de *Bacillus* spp. a partir de distintas fuentes de carbono renovables.

4.7 REFERENCIAS

- Barham, P., Keller, A., Otun, E. L., Holmes, P. (1984) Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *J. Mater. Sci.*, 19, 2781-2794.
- Berger, E., Ramsay, J. A., Ramsay, C., Chavarie, C. (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB Biomass. *Biotechnol. Technol.*, 3:227-232.
- Bloembergen, S., Holden, D. A., Hamer, G. K., Bluhm, T. L., Marchessault, R. H. (1986) Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 19:2865-2871.
- Burger, H. M., Muller, H., Seebach, D., Bornsen, K. O., Schar, M., Widmer, H. M. (1993) Matrix-assisted laser desorption and ionization as a mass spectrometric tool for the analysis of poly[(r)-3-hydroxybutanoates]. Comparison with Gel Permeation Chromatography. *Macromolecules*, 26:4783-4790.
- Chuah, J. A., Yamada, M., Taguchi, S., Sudesh, K., Doi, Y., Numata, K. (2013) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. *Polym. Degrad. Stab.*, 98(1):331-338.

- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K. (1986) Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules*, 19(11):2860-2864.
- Domínguez-Díaz, M., Meneses-Acosta, A., Romo-Uribe, A., Peña, C., Segura, D., Espin, G. (2015) Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. Polym. J.*, 63:101-112.
- 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. *Biotechnol. Bioeng.*, 44:256-261.
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Lee, S. Y. (1995) Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:34-39.
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2(1):59.
- Kamiya, N., Yamamoto, Y., Inoue, Y., Chujo, R. (1989) Microstructure of bacterially synthesized poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Macromol*, 22(4),1676-1682.
- Kannan, L. V., Rehacek, Z., (1970) Formation of poly- β -hydroxybutyrate by *Actinomycetes*. *Indian J. Biochem.*, 7:126-129.
- Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., McNaughton, D., (2000) Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia*

- coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3415-3420.
- Kulprecha, 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*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107:240-245.
- Kusaka, S., Abe, H., Lee, S. Y., Doi, Y. (1997) Molecular mass of poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 47(2), 140-143.
- Łabuzek, S., Radecka, I. (2001) Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *J. Appl. Microbiol.*, 90(3):353-357.
- Lenz, R. W., Marchessault, R. H. (2005) Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6(1):1-8.
- López Jiménez, J.A. (2011) Polímeros de Interés Industrial. Síntesis y Caracterización de Polihidroxibutirato (PHB). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- Luo, R., Chen, J., Zhang, L., Chen, G. (2006) Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2Ps from *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Biochem. Eng. J.*, 32:218-225.
- Madison, L.L. y Huisman, G.W. (1999) Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 63(1), 21-53.
- Manna, A., Banarjee, R., Paul, A. K. (1999) Accumulation of Poly(β -hydroxybutyric acid) by Some Soil *Streptomyces*. *Curr. Microbiol.*, 39:153-158.
- 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*. *J. Environ. Polym. Deg.*, 6(2):99-107.
- Numata, K., Morisaki, K., Tomizawa, S., Ohtani, M., Demura, T., Miyazaki, M., Doi, Y. (2013) Synthesis of poly- and oligo(hydroxyalkanoate)s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polym. J.*, 45(10):1094-1100.
- 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 Technol.*, 98(3):633-638.
- Ramsay, J. A., Berger, E., Ramsay, B. A., Chavarie, C. (1990) Recovery of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid Granules by a Surfactant-Hypochlorite Treatment. *Biotechnol. Technol.*, 4:221-226.
- Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P., Gaillard, J. L., Corroler, D. (2013) Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 302-308.
- Shen, X. W., Shi, Z. Y., Song, G., Li, Z. J., Chen, G. Q., (2011) Engineering of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC2 Ps of *Pseudomonas stutzeri* via site-specific mutation for efficient production of PHA copolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91:655-665.
- Spink, C. H. (2008) Differential Scanning Calorimetry, *Meth. Cell Biol.*, 84(7):115-141.
- Tajima, K., Igari, T., Nishimura, D., Nakamura, M. (2003) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *J. Biosci. Bioeng.*, 95:77-81.
- Ten, L. N., Chae, S. M., Yoo, S. A. (2015) Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by cyanobacterium *Anabaena* sp. BD47. *Chem. Nat. Comp.*, 51(2):350-351.

- Tripathi, L., Wu, L. P., Chen, J., Chen, G. Q. (2012) Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate-block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a β -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. *Microb. Cell Fact.*, 11:1-11.
- 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. *J. Biotechnol.*, 132(3):251-258.
- Valentin, H. E., Dennis, D. (1997) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *J. Biotechnol.*, 58:33-38.
- Venkateswar Reddy, M., Mawatari, Y., Yajima, Y., Seki, C., Hoshino, T., Chang, Y. C. (2015) Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from alkylphenols, mono and poly-aromatic hydrocarbons using *Bacillus* sp. CYR1: A new strategy for wealth from waste. *Bioresource Technol.*, 192:711-717.
- Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M., Mahmood, S. K. (2009) Production of PHB and P(3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(3):391-397.
- Xu, J., Guo, B. H., Yang, R., Wu, Q., Chen, G. Q., Zhang, Z. M. (2002) In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, 43:6893-6899.
- Zhu, C., Nomura, C. T., Perrotta, J. A., Stipanovic, A. J., Nakas, J. P. (2010) Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *Biotechnol. Prog.*, 26:424-430.

CAPÍTULO 5. Determinación del PHA extraíble a partir de células liofilizadas mediante FTIR y herramientas estadísticas

5.1 INTRODUCCIÓN

5.1.1 Técnicas para la determinación de la producción celular de PHAs: Determinación directa por extracción química y determinación indirecta.

Aunque los PHAs son producidos a nivel industrial, una de las principales limitaciones de su uso generalizado es su costo de producción. Por esta razón, la optimización de la producción de PHAs es un tema de abordaje necesario para contribuir a reducir costos y maximizar la productividad de los procesos actuales. Para ayudar en el desarrollo de procesos de fermentación más eficientes y para monitorear la producción, se requiere una rápida retroalimentación sobre el estado de la fermentación en términos del contenido de PHA en las células (Kansiz y col., 2000). Para determinar el contenido de PHA en la biomasa celular han sido desarrollados diferentes métodos: 1) extracción química, en particular utilizando cloroformo u otros disolventes orgánicos para obtener el PHA extraíble de las células (Valappil y col., 2007; Heinrich y col., 2012; Ibrahim y Steinbüchel, 2009) o 2) mediciones indirectas, las que indican la concentración de PHA intracelular, tales como cromatografía gaseosa, entre otras (Kansiz y col., 2000; Braunegg y col., 1978; Arcos-Hernandez y col., 2010; Jarute y col., 2004). Sin embargo, para obtener información sobre el rendimiento real del proceso, se requiere la determinación del PHA extraíble, que sólo puede llevarse a cabo a través de técnicas de extracción química. Por otro lado, las técnicas de extracción requieren un proceso largo y complicado de preparación de muestra, tales como liofilización, lisis celular, extracción y purificación. Por lo que además de su dificultad intrínseca, no es posible la obtención de resultados en tiempo real, lo que las hace poco

útiles en la toma de decisiones rápidas para la evaluación de cepas productoras, así como de las diferentes condiciones operativas (Jarute y col., 2004). La falta de un método económico, rápido y fiable para cuantificar PHAs en sistemas de cultivo es un gran obstáculo para lograr el control en línea y la optimización.

5.1.2 Determinación indirecta de la concentración de PHA por FTIR y métodos estadísticos.

La espectroscopia infrarroja por medio de la Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica empleada comúnmente para estudiar estructuras moleculares pero también puede aplicarse a una gran colección de células microbianas intactas, captando en los espectros resultantes la composición bioquímica completa de la muestra (Naumann y col., 1991), lo que permite tomar una instantánea de la situación metabólica de la célula a nivel químico. El potencial del FTIR en la identificación de microorganismos está bien documentado (Wenning y Scherer, 2013). Por lo tanto, con esta técnica se puede proporcionar un análisis químico completo, útil para resolver una amplia gama de problemas analíticos a través de espectros de muestras gaseosas, líquidas o sólidas.

La información molecular específica en la región espectral del infrarrojo medio (MID-FTIR) se puede utilizar para diferentes propósitos. Esta información permite la identificación rápida de las sustancias puras y la determinación cuantitativa de varios analitos en matrices complejas (Jarute y col., 2004). Dado que los espectros de FTIR se pueden considerar como el perfil químico de una muestra, pueden ser usados para predecir la concentración de un analito dado (por ejemplo, PHA). Schuster y col. (1999) han utilizado la espectroscopia FTIR para el seguimiento del estado fisiológico de las células bacterianas como un método indirecto para la determinación de la etapa de

fermentación. Por otro lado, Salman y col. (2002) han utilizado FTIR con el fin de obtener información cuantitativa sobre el estado fisiológico del organismo. Otra característica atractiva de la espectrometría infrarroja es el hecho de ser una técnica no destructiva, que requiere pasos mínimos de preparación de la muestra, una pequeña cantidad (0,4 a 1 mg) y una mínima manipulación de la muestra, siendo también una técnica rápida (tiempo de procesamiento ~ 30 min) que no requiere el uso de solventes (Schmitt y col., 2002).

Se pueden observar las variaciones en las bandas de los espectros en diferentes etapas del crecimiento de una cepa dada, correspondientes a los principales constituyentes celulares tales como proteínas, lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y PHA (Kansiz y col., 2000; Dean y col., 2010; Naumann, 2000). Por otra parte, la espectroscopia infrarroja ha sido utilizada para la detección (Helm y Naumann, 1995; Hong y col., 1999; Misra y col., 2000) y la cuantificación (Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004; Arcos-Hernandez y col., 2010) de PHA dentro de las células bacterianas intactas tomadas del cultivo. Sin embargo, las cuantificaciones por IR empleadas se basan en metodologías que utilizan accesorios FTIR más caros y menos comunes, como ATR (Jarute y col., 2004; Arcos-Hernandez y col., 2010), o transmitancia sobre películas de células con microscopia IR (Kansiz y col., 2000), en lugar de utilizar una metodología clásica y de bajo costo, como la transmitancia empleando pastillas de KBr (Smith, 2011).

La mayoría de los análisis espectroscópicos cuantitativos, requieren el uso de análisis estadísticos multivariados o quimiometría (Sivakesava y col., 2001). Los trabajos de cuantificación existentes fueron desarrollados utilizando muestras de células enteras como material estándar para la calibración (Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004; Arcos-Hernandez y col., 2010), como una interesante alternativa al uso directo de

PHA puro; dado que en última instancia, estos estudios se basan en la incidencia de los picos de este material en el espectro infrarrojo de las células.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Evaluar por medio de herramientas estadísticas, tales como análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), regresión por mínimos cuadrados parciales con una variable dependiente (PLSR1, por sus siglas en inglés) y análisis de regresión lineal simple (SLRA, por sus siglas en inglés), la relación entre los espectros FTIR de una cepa de *Bacillus megaterium* y el contenido de PHA extraíble presente en las células, con el fin de desarrollar una metodología rápida para predecir la concentración final de PHA utilizable.

5.2.2 Desarrollar una técnica alternativa, económica y fiable para cuantificar el PHA intracelular extraíble por medio de FTIR empleando métodos estadísticos, utilizando un sólido pulverizable como referencia, obtenido de las células bajo investigación, que permita la preparación de pastillas de KBr.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Cepa, medio y tipo de cultivo utilizados (fermentaciones discontinuas o batch y estado sólido)

La cepa bacteriana productora de PHA utilizada en este estudio fue la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 (GenBank número de acceso de base de datos: HM119600.1).

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes (**Anexo B**): SW: solución de Winogradsky (Pochon y Tardieu, 1962) a pH 8; SWG: solución de Winogradsky con 1 g/L de urea como fuente de nitrógeno y 30 g/L de glicerol como única fuente de

carbono y energía y SWGA: SWG con 1,2 % de agar-agar ultra puro para las fermentaciones en estado sólido (FES).

5.3.2 Métodos de cultivo

5.3.2.1 Fermentaciones discontinuas o batch

Un primer grupo de cultivos, designado como SWG1, se llevó a cabo en Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo SWG estéril. El inóculo se obtuvo de un cultivo de 48 h de *B. megaterium* en SWGA a 30 °C. Las colonias aisladas se suspendieron en agua destilada. La absorbancia de la suspensión se ajustó en 0,2 a 550 nm (DO550) (correspondiente a 10^8 células/mL). A continuación, 1 mL de esta suspensión celular se inoculó en 100 mL SWG. La incubación se realizó en un baño termostatzado (Gerhardt SW 20, Dinamarca) a 30 °C y 150 rpm. Los cultivos se realizaron por triplicado. A las 18, 30 y 48 h de incubación, se retiraron tres Erlenmeyers de la incubadora (designados SWG1A-18, SWG1A-30 y SWG1A-48) y la biomasa se recogió a partir de todo el volumen por centrifugación a 6.000 g durante 15 min en una centrífuga ALC-Multispeed PK131 (Thermo Electron Corporation, Francia). El pellet de biomasa obtenido se lavó dos veces con agua destilada, luego se suspendió en 10 mL de agua destilada, se congeló a -70 °C y se liofilizó (RIFICOR LA-B3-C, con una bomba de vacío WELCH 1402). Por último, se determinó el peso de células liofilizadas. El noventa por ciento (p/p) de las células liofilizadas se utilizó para la extracción de PHA, y el 10 % restante se utilizó para obtener los espectros FTIR de las células liofilizadas. Aunque la cepa y las condiciones experimentales fueron las mismas, se debe considerar que este es un proceso biológico, por lo tanto, pequeños cambios, ya sea en el equipo o en el inóculo podrían producir ligeras variaciones en los resultados. Por lo tanto, con el fin de incluir estas variaciones y para obtener resultados más

representativos, se realizaron dos repeticiones de la experiencia SWG1 (designadas SWG1B y SWG1C). Otro grupo de cultivos batch se llevó a cabo empleando el medio SWG con el fin de evaluar el potencial predictivo del método PLSR1. Uno de los cultivos (designado SWG2A) se llevó a cabo por triplicado a 30 °C, y se retiraron tres Erlenmeyers a las 10 y 18 h (SWG2A-10 y SWG2A-18, respectivamente). Por otra parte se llevó a cabo un cultivo a 40 °C durante 18, 30 y 48 h (designados SWG2B-18, SWG2B-30 y SWG2B-48, respectivamente). Las características de todos los cultivos realizados se presentan en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Cultivos realizados para la calibración, validación y predicción del contenido de PHA por FTIR.

Muestra	Tiempo (h)	T (°C)	Medio ^a	Calibración y Validación ^b , Predicción ^c	Predicción ^d
SWG1A-18	18	30	líquido	X	
SWG1A-30	30	30	líquido	X	
SWG1A-48	48	30	líquido	X	
SWG1B-18	18	30	líquido	X	
SWG1B-30	30	30	líquido	X	
SWG1B-48	48	30	líquido	X	
SWG1C-18	18	30	líquido	X	
SWG1C-30	30	30	líquido	X	
SWG1C-48	48	30	líquido	X	
SWG2A-10	10	30	líquido		X
SWG2A-18	18	30	líquido		X
SWG2B-18	18	40	líquido		X
SWG2B-30	30	40	líquido		X
SWG2B-48	48	40	líquido		X
SWGA-25	25	30	sólido		X
SWGA-30	30	30	sólido		X
SWGA-48	48	30	sólido		X

^aMedios compuestos por SW, a pH 8, con 3 % de glicerol y 0,08 % de urea, ^bMuestras de calibración y validación para Tt2 en el análisis de PLSR1, ^cMuestras de predicción para Tt1 en PLSR1 y SLRA y ^dMuestras de predicción para Tt1 y Tt2 en PLSR1

5.3.2.2 *Fermentaciones en estado sólido*

La cepa *B. megaterium* BBST4 también se cultivó en medio sólido (SWGA) a 25, 30, y 48 h a 30 °C. Las colonias se obtuvieron de la placa por medio de dos lavados de la superficie con agua destilada, obteniéndose una suspensión de células. Esta suspensión se concentró por centrifugación a 6.000 g, efectuando dos lavados con agua destilada. El sólido se suspendió luego en 5 mL de agua destilada, se congeló a -70 °C, se liofilizó y se obtuvo el peso de células liofilizadas. El noventa por ciento (p/p) de dichas células se utilizó para la extracción de PHA, y el 10 % restante se utilizó para obtener los espectros FTIR de las células liofilizadas intactas. Este cultivo fue designado SWGA (**Tabla 5.1**).

5.3.3 Preparación de muestras y mediciones FTIR

5.3.3.1 *PHA y material de pre-extracción (MPE) como estándar de calibración*

La extracción de PHA se realizó utilizando la modificación de la técnica de extracción con cloroformo descrita por Manna y col. (1999) y Valappil y col. (2007), descrita en el **Capítulo 4**, y el PHA así obtenido se denominó CEPHA (PHA extraído con cloroformo). Las células liofilizadas fueron lisadas por digestión química usando una solución de hipoclorito de sodio (5,5% v/v en agua) a 37 °C durante 1 h con agitación constante, y luego centrifugadas a 6.000 g. El sólido obtenido se lavó dos veces con agua destilada, acetona y etanol sucesivamente. El pellet luego de los lavados se denominó Material de Pre-Extracción (MPE). Parte del MPE se empleó para la preparación de pastillas de KBr y el MPE restante se sometió a una extracción con cloroformo en ebullición durante 15 minutos. Luego, el PHA se purificó por precipitación con hexano y se recuperó por filtración y evaporación del solvente. Las muestras de MPE correspondientes a SWG1 fueron pesadas y de cada una de ellas se

tomó un miligramo para ser utilizado en la determinación de los espectros FTIR para las pruebas de calibración. El peso del biopolímero para las calibraciones se referenció como porcentaje de PHA en las células liofilizadas y en el MPE de SWG1.

5.3.3.2 Espectros FTIR de transmisión empleando pastillas de KBr

Para la preparación de pastillas de KBr es necesario obtener un polvo fino de la muestra a analizar. Dado que esta es una tarea difícil de conseguir con el PHA puro, se estudió la factibilidad de usar el MPE para la preparación de las pastillas de KBr. Los espectros FTIR de MPE se compararon con los del PHA puro producido por la cepa, a fin de utilizar el MPE como material estándar para la calibración por FTIR. Un miligramo de cada tipo de material (células intactas liofilizadas o MPE) se mezcló completamente con 99 mg de KBr de grado espectroscópico, utilizando un mortero y una maja de ágata. Las mezclas así obtenidas se emplearon para preparar las pastillas de KBr por medio del empleo de una prensa mecánica (6 Ton de presión durante 10 minutos). Antes de las mediciones, las pastillas se secaron a 100 °C durante 4 h para eliminar la humedad atmosférica (Misra y col., 2000; Smith, 2011). Se emplearon pastillas de KBr para la adquisición de los espectros y cuantificación del PHA dado que el KBr es el material transparente para infrarrojo más utilizado, ya que proporcionan una buena calidad de espectros (Smith, 2011). Los espectros se registraron utilizando un espectrómetro FTIR Nicolet Nexus (USA). Para cada medición, se realizaron 100 barridos que fueron promediados en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Para reducir al mínimo las diferencias entre los espectros debido a los cambios en la línea de base, estas líneas de base fueron corregidas por medio del algoritmo de corrección automática de la línea de base del software OMNIC, con exclusión de las bandas de CO_2 (Kansiz y col., 2000). Para cada muestra, se prepararon tres pastillas de KBr y se registraron seis espectros de diferentes zonas de cada pastilla

de KBr para mejorar la precisión y garantizar un espectro representativo de cada muestra. En el análisis estadístico se utilizó un promedio de los espectros obtenidos para cada pastilla. Para poder realizar comparaciones se obtuvieron los espectros FTIR del PHB puro comercial y del PHA extraído de *B. megaterium* en ventanas de NaCl, a partir de la evaporación de soluciones de los biopolímeros en cloroformo.

5.3.4 Herramientas de análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R, un lenguaje y entorno para el cálculo estadístico (R Core Team, 2015). En el Análisis de Componentes Principales (PCA), se determinaron las similitudes entre los espectros del MPE y el PHA producido por la cepa con el objetivo de utilizar el MPE como material de calibración. Para predecir el porcentaje de PHA extraíble en muestras de células liofilizadas, se utilizaron la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR1) y el análisis de regresión lineal simple (SLRA).

Se realizó un análisis estadístico de los espectros incluido la detección de posibles valores atípicos (outliers). Para descartar estos valores atípicos se calcularon las elipses (Hotelling T^2 con un 95 % de confianza) y los residuos, para evaluar las distancias de las muestras en el espacio del modelo y en el espacio de los residuos, respectivamente (es decir, la medición de la variación dentro del modelo y la variación fuera del modelo para cada muestra). Además, los gráficos de *Leverage* y los residuos studentizados ayudaron a observar la falta de ajuste de los valores de referencia con sus respectivos espectros (Arcos-Hernandez y col., 2010).

5.3.4.1 Análisis Multivariado

Se utilizó un análisis multivariado, empleando PCA y PLSR1, para determinar diferentes correlaciones. El análisis PLSR1 se utilizó para correlacionar los espectros FTIR obtenidos a partir de las células liofilizadas y el MPE, con el porcentaje de PHA extraído (CEPHA). De este modo, las curvas de correlación obtenidas pueden emplearse para predecir el porcentaje de PHA extraíble de células intactas. Para la calibración y la validación se realizaron dos pruebas: **prueba 1** (Tt1), donde se usó MPE en lugar de PHA como material estándar de calibración, y **prueba 2** (Tt2), donde se utilizaron células liofilizadas obtenidas de las series SWG1 como material estándar de calibración.

Para todos los análisis multivariados se utilizaron los espectros originales y sus derivadas primera y segunda (obtenidas mediante algoritmos del software OMNIC). Las derivadas pueden eliminar algunas de las contribuciones espectrales de una muestra que no han sido mejoradas mediante la corrección de la línea de base y/o funciones de normalización. Las técnicas de derivadas espectrales también pueden ser consideradas como técnicas de mejora de pseudo-resolución, debido a que las derivadas son capaces de poner de relieve ligeras variaciones en las pendientes y bandas de contorno haciendo más comprensible la información espectral. Por lo tanto, las ventajas de las derivadas espectrales se pueden combinar para reducir el número de factores necesarios para obtener un mínimo *error cuadrático-medio de predicción* (RMSEP, por sus siglas en inglés) eliminando la necesidad de factores adicionales para modelar las variaciones espectrales que no están relacionadas con el analito de interés (Kansiz y col., 2000).

Se determinaron, el coeficiente de correlación, R^2 , que evalúa el ajuste del modelo a los datos de calibración, junto con dos tipos de errores: El *error cuadrático-medio de validación cruzada* (RMSECV, por sus siglas en inglés) y el *error cuadrático-medio de predicción* (RMSEP). Se evaluó el comportamiento de los modelos de calibración

utilizando la validación cruzada por medio del método de “dejar uno afuera” (*leave one out cross-validation*) (Mevik y Wehrens, 2007).

El R^2 se calcula a partir de un gráfico de valores medidos versus predichos, donde los valores de R^2 más cercanos a 1 indican la mejor coherencia entre los valores medidos y predichos. El RMSECV indica la capacidad predictiva del modelo con el conjunto de calibración y el número óptimo de factores que se utilizará, mientras que el RMSEP evalúa la respuesta del modelo de calibración establecido frente a un conjunto de muestras independientes utilizados como prueba (Jarute y col., 2004).

5.3.4.1.1 Calibración con muestras de MPE (Tt1)

Para determinar, por medio de PCA, si los espectros de MPE y PHA se correlacionan se seleccionaron dos regiones en las que los mismos son similares; estas regiones se limitaron a 700-1480 cm^{-1} y 1710-1800 cm^{-1} para la región más estrecha y de 700-1480 cm^{-1} y 1710-3050 cm^{-1} para la región más amplia. El pico observado a $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$, reportado como banda de amida I (Kansiz y col., 2000; Dziuba y col., 2009), fue restado para eliminar su influencia en la correlación de espectros. Los espectros de MPE se compararon con los de un PHB comercial (PHB Industrial, Brasil) y con los PHA producidos por *B. megaterium* empleando tres fuentes de carbono diferentes: glicerol, almidón y melaza de caña de azúcar (**Figura 5.1**). Por otro lado, dichos espectros se compararon con los espectros de células liofilizadas de las experiencias SWG1. Para eliminar las diferencias de peso entre estas muestras, todos los espectros fueron normalizados (MPE, PHA, y muestras de células liofilizadas) utilizando como referencia la banda característica del PHA en 1280 cm^{-1} (zona de estiramiento del grupo C-O-C).

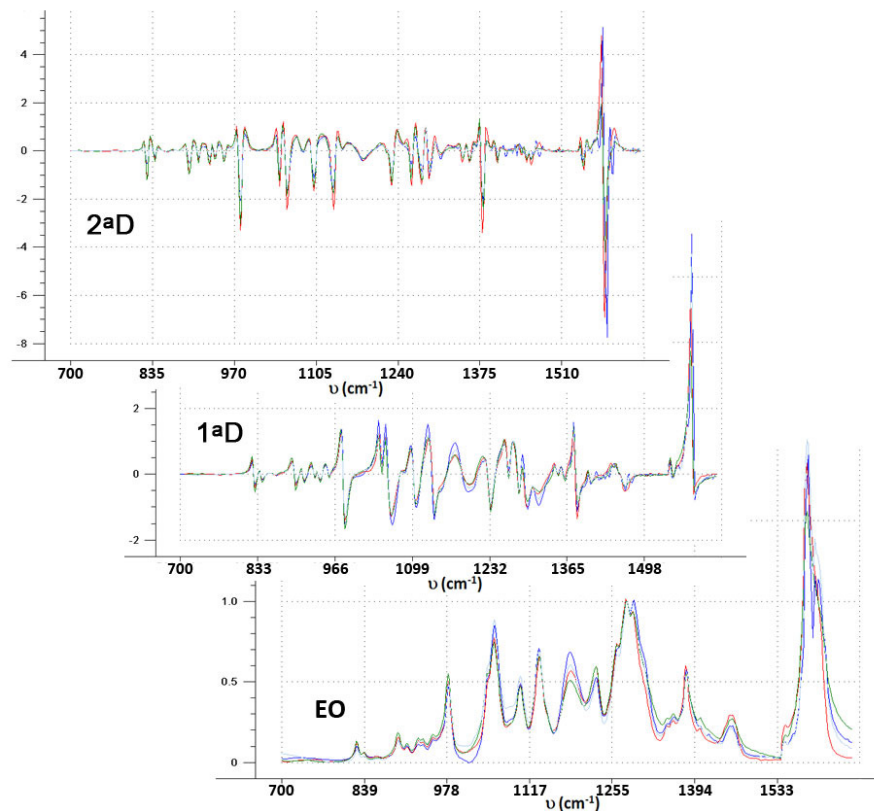


Figura 5.1. Espectros del MPE y los PHAs, producidos por la cepa en estudio empleando distintas fuentes de carbono. Comparación entre espectros originales (EO), primeras (1ªD) y segundas (2ªD) derivadas. Espectros: (—) MPE, (—) PHA a partir de almidón, (—) PHA a partir de glicerol y (—) PHA a partir de melaza.

Doce muestras de MPE con diferente concentración de PHA (0-50 %), cubriendo el rango de producción de PHA de la cepa, fueron utilizadas para la calibración con PLSR1. Luego, se obtuvo una curva de calibración teniendo en cuenta los espectros FTIR y los valores reales de PHA extraído. Los espectros no fueron normalizados para la calibración, la validación y la predicción con PLSR1.

5.3.4.1.2 Calibración con muestras de células liofilizadas (Ti2)

Para obtener las curvas de calibración con esta técnica se utilizaron los datos de los espectros de las células liofilizadas de SWG1. El conjunto completo de datos utilizados en la calibración se basó en tres experiencias con nueve repeticiones, junto

con tres pastillas de KBr para cada réplica y de seis espectros de cada pastilla. Todos los espectros se normalizaron, a fin de eliminar las diferencias de peso entre las muestras, utilizando como referencia la banda característica de las proteínas a $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$ (banda de amida I) (Kansiz y col., 2000; Dziuba y col., 2009).

5.3.4.1.3 Predicción

Se llevaron a cabo predicciones para 3 grupos de muestras independientes (experiencias SWG2) con contenido de PHA conocido. Por otra parte, con la calibración a partir de MPE se predijo el contenido de PHA de las muestras SWG1, cuyo contenido de PHA también era conocido. En todos estos casos se calculó el *error cuadrático medio de predicción* (RMSEP) (Arcos-Hernandez y col., 2010) como un indicador de precisión de la predicción.

5.3.4.2 Análisis de regresión lineal simple (SLRA)

Mediante una curva de calibración basada en la ley de Lambert-Beer (Smith, 2011), se empleó el MPE como estándar para estimar la cantidad de PHA extraíble. Con el fin de probar la predicción de PHA extraíble (CEPHA) se utilizaron en un SLRA la altura de pico o el área del pico de bandas características de los espectros FTIR del PHA producido por *B. megaterium*. Las curvas de calibración se obtuvieron en base a diferentes técnicas de filtrado aplicadas a los espectros originales (Naumann, 2000). Se analizaron cuatro alturas y áreas de las señales correspondientes a los picos presentes en los espectros de los PHAs, del MPE y de las células liofilizadas (1: 1263 cm^{-1} , estiramiento del grupo C-O; 2: 1292 cm^{-1} , estiramiento del grupo C-O; 3: 1381 cm^{-1} , flexión del metilo C-H ($-\text{CH}_3$) y 4: 1725 cm^{-1} , estiramiento del grupo carbonilo del éster (C=O)). Además, en el análisis de los picos estudiados se utilizaron cuatro técnicas de filtrado empleando algoritmos de los programas peak fit y OMNIC (T₁: residuos, por algoritmo de peak fit; T₂: segunda derivada, por algoritmo de peak fit; T₃:

deconvolución, por algoritmo de peak fit y T₄: primera derivada por algoritmo del OMNIC). Los métodos de filtrado eliminan las frecuencias no deseadas de las señales a analizar. La técnica de los residuos utiliza un filtro básico, donde los picos están determinados por la identificación de máximos locales en un flujo de datos suavizado. Los filtros por derivadas aumentan la resolución de los espectros obtenidos (Dziuba y col., 2009), y pueden considerarse como métodos de pre-procesamiento que minimizan efectos de línea de base generales y amplifican señales de alta frecuencia (ruido) del IR. Por otra parte se pueden utilizar filtros por deconvolución para mejorar la resolución y al mismo tiempo reducir el ruido (Lasch, 2012).

Los valores de los coeficientes de correlación (R^2) y errores estándar (SE) se calcularon como una medida del ajuste de la calibración. La pendiente (m) se utilizó para el análisis de predicción (**Tabla 5.5**) con el fin de definir las mejores curvas de calibración.

5.3.4.2.1 Calibración

Las curvas de calibración para determinar la concentración de PHA extraído (CEPHA), expresado como porcentaje en relación a la biomasa (X_i), se calcularon utilizando espectros de MPE para los cuatro picos estudiados (Y_i) empleando diferentes técnicas de filtrado, a través de la siguiente ecuación:

$$Y_i = m X_i \quad (1)$$

5.3.4.2.2 Predicción

En un paso final, las curvas de calibración fueron utilizadas con el fin de predecir la cantidad de PHA presente en las muestras liofilizadas de *B. megaterium* obtenidas a diferentes tiempos de fermentación (SWG1). El porcentaje de PHA de las muestras

SWG1 se obtuvo por extracción con cloroformo y se aplicó SLRA entre el PHA predicho y el medido PHA.

5.4 RESULTADOS

El espectro IR de células liofilizadas es el resultado de la contribución de todas las moléculas presentes en la célula. El espectro refleja la composición química global, ya que cada compuesto químico en la muestra hace su propia contribución distintiva. La estructura química de cada componente y su contribución a la totalidad del espectro está directamente relacionada con la concentración del componente en la muestra. Sobre esta base es posible cuantificar diferentes analitos (Kansiz y col., 2000). Helm y Naumann (1995) emplearon FTIR en células de *Bacillus* spp. pero sólo para la identificación del PHA en la muestra.

La **Figura 5.2** muestra espectros sin normalizar representativos del PHA y el MPE (**Figura 5.2A**) y de las muestras de células liofilizadas obtenidas en tres momentos de cultivo diferentes (**Figura 5.2B**) de la cepa *B. megaterium*, en el intervalo de 1800-800 cm^{-1} . Los 3 espectros de la **Figura 5.2B** corresponden a muestras del grupo SWG1 obtenidas a las 18, 30 y 48 h de cultivo en los que se puede observar el aumento del pico en $\sim 1726 \text{ cm}^{-1}$ (banda del grupo éster del PHA) que se corresponde con el aumento en la concentración de PHA extraíble de las células. Las características espectrales complejas observadas en la **Figura 5.2B** son típicas de muestras biológicas. Estos espectros contienen regiones representativas de los principales componentes celulares, tales como el PHA, las proteínas celulares (Naumann y col., 1991; Kansiz y col., 2000) y los polisacáridos (Oust y col., 2004; Lasch, 2012), entre otros. Las principales bandas del PHA son las correspondientes a las señales de estiramiento del grupo carbonilo del éster (1750 a 1720 cm^{-1}) y las bandas entre 1450 y 1000 cm^{-1}

correspondientes a deformaciones de los grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_2), así como a estiramientos del grupo CO (Kansiz y col., 2000; Shahid y col., 2013).

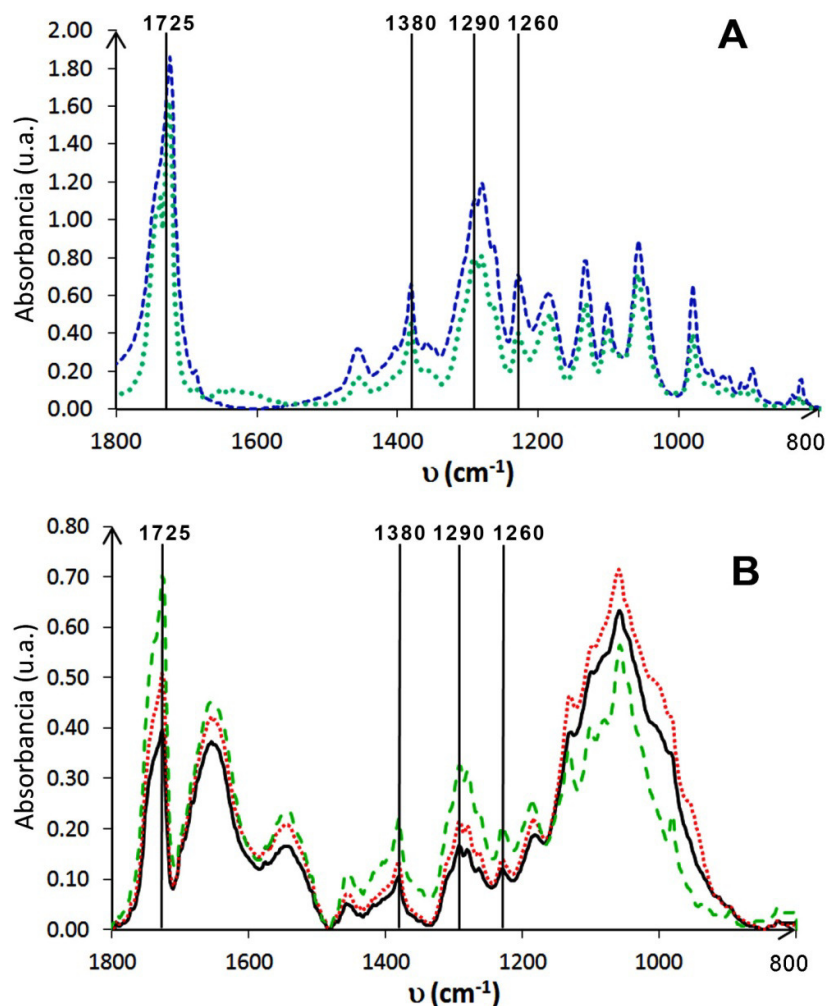


Figura 5.2. Espectros FTIR con los principales picos del PHA producido por la cepa *B. megaterium* BBST4. A) MPE y PHA obtenido, y B) células liofilizadas de *B. megaterium* BBST4 (SWG1). Símbolos: A) (- - -) PHA y (.....) MPE. B) Células liofilizadas: (—) $t = 18$ h, (.....) $t = 30$ h y (- - -) $t = 48$ h.

5.4.1 Análisis estadístico para la determinación de la producción de PHA

Se utilizó el análisis de PCA para observar la correlación entre el PHA y el MPE, con el fin de utilizar el MPE en lugar de PHA puro en pastillas de KBr para la

calibración (Tt1 en PLSR1 y SLRA). Los análisis por PLSR1 y SLRA se utilizaron para determinar la correlación entre los porcentajes de PHA extraído y PHA predicho.

El PLSR1 ha sido utilizado con mayor frecuencia en muchos campos de la química, como la analítica, la física y la clínica. Por otro lado, el control de los procesos industriales también puede beneficiarse del uso de esta metodología (Geladi y Kowalski, 1986; Martens, 2001). Este método se ha diseñado para ser utilizado en situaciones en las que hay muchas variables predictoras posiblemente correlacionadas y relativamente pocas muestras, por lo que puede ser aplicado con éxito en las ciencias naturales. Este tipo de análisis son frecuentes en química, donde los avances desde los años setenta en espectroscopía han revolucionado el análisis químico (Martens, 2001; Wold, 2001). Debido a su mayor robustez, el PLSR1 es una buena alternativa a los métodos clásicos de regresión lineal múltiple y regresión por componentes principales. Los parámetros del modelo no cambian significativamente cuando se incluyen nuevas muestras de calibración desde la población total, lo que es un indicativo de la robustez del método (Geladi y Kowalski, 1986).

Por medio de SLRA, es posible encontrar la mejor línea recta (de regresión) entre el porcentaje de PHA extraído y el PHA predicho, reduciendo al mínimo los residuos. La línea resultante se conoce como curva de calibrado, y su ecuación puede ser empleada para predecir la concentración de muestras desconocidas (Mark y Workman, 2003).

5.4.2 PCA: Correlación entre PHA y MPE

La comparación de los espectros originales y sus derivadas primera y segunda para el PHB comercial, el MPE y los PHAs producidos por *B. megaterium* indican la presencia de picos similares en altura y área. La similitud entre PHB homopolímero,

PHAs (3 muestras) y MPE (3 muestras) se presenta en la **Figura 5.3** por medio de elipses de confianza (Hotelling T^2 con una confianza del 95 %).

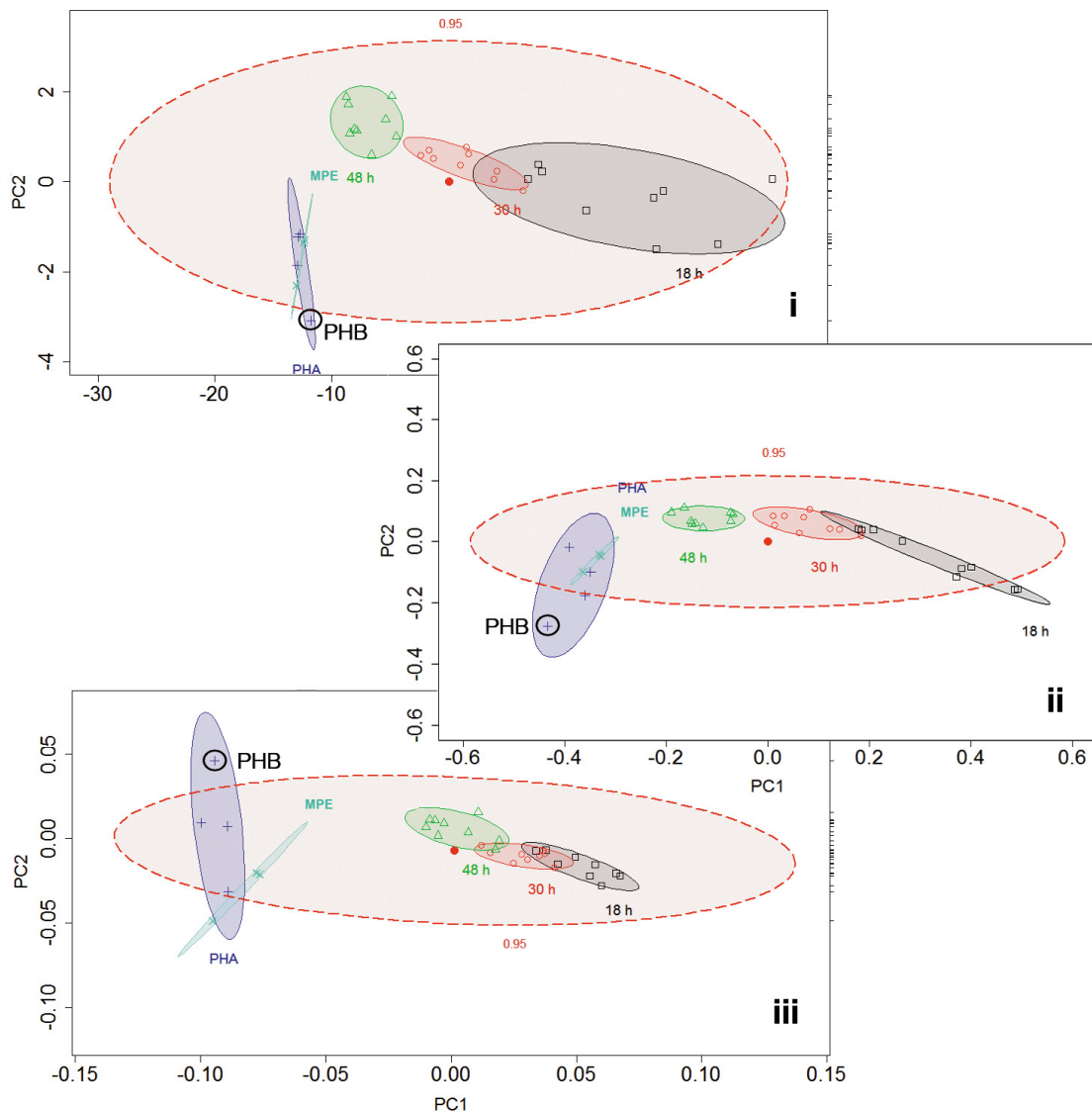


Figura 5.3. Separación especial por puntuaciones (scores) de PC1 y PC2 del PCA empleando elipses de confianza (Hotelling T^2 con una confianza del 95 % para todas las muestras y 75 % para cada grupo). i) Espectros originales, ii) Derivada primera, y iii) Derivada segunda. Símbolos: (×): MPE, (+) PHA y PHB comercial, Células liofilizadas: (□) t = 18 h, (○) t = 30 h y (△) t = 48 h.

Los espectros de las muestras de células liofilizadas pueden ser agrupados basándose en el análisis de PCA. Por lo tanto, en un espacio de correlación de componentes principales (PC1 y PC2), es posible observar diferentes agrupaciones (PHA, MPE y muestras liofilizadas en diferentes tiempos de fermentación). Los puntos que quedan fuera de las elipses corresponden a muestras con espectros FTIR no tan similares al resto del grupo.

El aumento en el contenido de PHA con el tiempo de cultivo observado en la **Figura 5.3** presenta buena coherencia con el aumento en la absorbancia observada en la **Figura 5.2**. En concordancia con lo reportado por Kansiz y col. (2000) y Jarute y col. (2004), cada espectro individual está directamente relacionado con la concentración relativa de PHA en la muestra. Por otro lado, también es posible definir diferentes grupos en concordancia con el análisis de PCA, cuando estas muestras se comparan en base a un análisis de clúster (determinado por la distancia euclidiana, con 50 iteraciones). Los grupos de puntos que se muestran en la **Figura 5.3** indican una similitud significativa entre el espectro del MPE y los espectros de los PHAs, así como la similitud observada entre los espectros de las muestras de células liofilizadas (SWG1) obtenidas en tres momentos diferentes de cultivo. Las diferencias entre los espectros del MPE y el PHA con respecto al espectro del PHB homopolímero observadas en la **Figura 5.3** para el análisis de PCA, podrían corroborar la presencia de otros monómeros distintos del 3-hidroxiбутирато en los PHAs producido por *B. megaterium* (Porrás y col., 2014 y **Capítulo 4**).

En base a las similitudes mencionadas se utilizó el MPE en lugar del PHA puro para desarrollar curvas de calibrado a partir de PLSR1 (Tt1) y SLRA, para luego predecir el PHA extraíble de células intactas liofilizadas.

5.4.3 Cuantificación de PHA en células liofilizadas

5.4.3.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR1). Calibración con muestras de MPE (Tt1) y muestras de células liofilizadas (Tt2). Predicciones

En la **Tabla 5.2** se presenta un resumen que incluye los coeficientes de correlación (R^2) entre el contenido de PHA medido y predicho, junto con el *error cuadrático medio de validación cruzada* (RMSECV). Después de la eliminación de los valores atípicos, el número de muestras se redujo de 81 a 78 y de 27 a 26 (Tt2). No fueron detectados valores atípicos para Tt1. Los modelos PLSR1 presentaron coeficientes de correlación satisfactorios (R^2). A partir del Tt1 se obtuvieron los mejores valores (0,996, 0,997 y 0,999), mejores a los obtenidos a partir del Tt2 (0,985, 0,968 y 0,963) para los espectros originales y para la primera y segunda derivada, respectivamente. Los errores encontrados en la validación cruzada fueron menores a partir de los modelos desarrollados usando el Tt2 (0,75, 0,91 y 1,15 %) que los obtenidos a partir del Tt1 (1,43, 1,65 y 1,70 %), nuevamente para los espectros originales y sus derivadas primera y segunda, respectivamente.

Tabla 5.2. Calibración con muestras de MPE (Tt1) y con muestras de células liofilizadas (Tt2).

Muestra ^a	Rango ^b	O ^c	N ^d	Espectros originales		Primera derivada		Segunda derivada	
				R^2	RMSECV (%)	R^2	RMSECV (%)	R^2	RMSECV (%)
MPE	1	-	12	0,996	1,43 (1) ^e	0,996	1,69 (2)	0,999	1,70 (4)
MPE	2	-	12	0,995	1,46 (1)	0,997	1,65 (2)	0,999	1,82 (4)
SWG1	3	3	81	0,985	0,75 (9)	0,968	0,91 (6)	0,957	1,16 (6)
SWG1	4	3	81	0,983	0,80 (9)	0,965	0,94 (6)	0,963	1,15 (6)
SWG1	3	1	27	0,981	1,63 (7)	0,873	1,71 (1)	0,841	1,99 (1)
SWG1	4	1	27	0,886	2,05 (6)	0,873	1,71 (1)	0,842	1,96 (1)

^aMPE: Material Pre-Extracción, SWG1: primeros tres cultivos, ^bRango 1 = 700-1481 cm^{-1} y 1710-3050 cm^{-1} , Rango 2 = 700-1481 cm^{-1} y 1710-1800 cm^{-1} , Rango 3 = 700-3650 cm^{-1} , y Rango 4 = 900-1800 cm^{-1} , ^cOutliers, ^dNúmero de muestras empleado para la calibración, ^eValores entre paréntesis: corresponden al número mínimo de factores necesarios para obtener un mínimo MSEP.

Estos modelos de calibración fueron definidos como óptimos para las predicciones. Sin embargo, todos los RMSECV encontrados fueron bajos, demostrando la bondad de las calibraciones para la predicción del PHA extraíble en las muestras.

Los RMSEP que se presentan en la **Tabla 5.3** permiten tener una representación de la bondad de ajuste de la predicción. Cuando se aplicaron los modelos óptimos de calibración para la predicción de los tres grupos independientes de muestras (**Tabla 5.3**, serie B), los RMSEP fueron altos para los determinados a partir de Tt1 con los espectros originales (20,4, 17,1 y 7,3 %, para las experiencias SWG2A, SWG2B, y SWGA, respectivamente). Mientras que los RMSEP no fueron tan altos para las predicciones determinadas a partir de Tt2 (1,11, 2,5 y 5,6 %, para SWG2A, SWG2B y SWGA, respectivamente).

Tabla 5.3. Error cuadrático medio de predicción (RMSEP) para los valores predichos determinados utilizando los modelos de calibración empleando MPE (Tt1) y células liofilizadas (Tt2).

Serie ^a	Exp ^b	N ^c	RMSEP											
			Espectros originales (%)				Primera derivada (%)				Segunda derivada (%)			
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
A	1	9	17,5	18,5			2,6	2,6			5,9	6,0		
		27*	17,2	18,2			2,4	2,3			5,7	5,9		
	2	9	15,8	16,9			1,6	1,6			2,6	2,7		
		27*	15,8	16,9			1,6	1,6			2,7	2,8		
	3	9	13,4	14,5			2,7	2,7			1,9	1,9		
		27*	13,3	14,3			2,6	2,6			1,7	1,7		
B	4	18*	20,4	21,9	1,1	7,2	0,7	0,7	1,1	0,9	2,4	2,4	0,6	0,5
	5	27*	17,1	18,4	4,0	2,5	1,2	1,2	4,6	3,5	3,5	3,6	4,0	4,0
	6	27*	7,3	8,4	5,6	11,1	6,0	6,0	6,9	6,8	3,2	3,3	7,0	7,1

S1: Tt1 (Rango 1), S2: Tt1 (Rango 2), S3: Tt2 (Rango 3), y S4: Tt2 (Rango 4). ^aSerie A (SWG1): predichos a partir de Tt1, Serie B: predichos a partir de Tt1 y Tt2, ^b1: Muestras SWG1A, 2: Muestras SWG1B, 3: Muestras SWG1C, 4: Muestras SWG2A, 5: Muestras SWG2B y 6: Muestras SWGA; ^cNúmero de muestras utilizadas para la predicción; *3 réplicas para cada muestra

Cabe señalar que los RMSEP obtenidos con los modelos de calibración a partir de las derivadas primera y segunda de los espectros para Tt1 fueron mucho menores a los obtenidos para los espectros originales. Este hecho puede deberse a la falta de normalización en esta prueba, problema que se resolvió, al menos parcialmente, mediante la aplicación de las derivadas.

De hecho, los RMSEP obtenidos a partir de Tt1 para la derivada primera mostraron valores relativamente bajos, incluso inferiores a los de la RMSECV de los modelos de calibración para SWG2A y SWG2B (cultivos líquidos) (0,7 y 1,2 %, para el rango 2), y también mejores a los obtenidos a partir de Tt2 (0,9 y 3,5 %, para el rango 4). Los RMSEP obtenidos para las predicciones de SWGA (cultivo sólido) fueron altos en todos los casos, mientras que los mejores valores de RMSEP se obtuvieron a partir de Tt1 con los modelos para la derivada segunda (3,2 y 3,3 % para los rangos 1 y 2, respectivamente). Las predicciones para SWG1 (**Tabla 5.3**, serie A) a partir del Tt1, también presentaron RMSEP relativamente bajos al utilizar los modelos obtenidos a partir de la derivada primera (2,7 a 1,6 %, y similares en ambos rangos).

5.4.3.2 Análisis De Regresión. Funciones determinadas por SLRA

La **Tabla 5.4** presenta los valores obtenidos para los modelos de calibración determinados por SLRA.

Los picos en 1263 cm^{-1} y 1381 cm^{-1} para las técnicas de filtrado 1 a 3, exhibieron una correlación muy alta con el porcentaje de CEPHA obtenido ($R^2 > 0,99$), tanto empleando la altura como el área de dichos picos. Sin embargo, el SE obtenido fue menor utilizando la altura del pico (menor o igual a 0,013), mientras que el mejor SE se logró empleando la técnica 4 y la altura del pico a 1292 cm^{-1} .

Tabla 5.4. Comparación de R^2 y SE para todos los picos y técnicas de filtrado para la calibración.

Pico	1263 cm^{-1}		1292 cm^{-1}		1381 cm^{-1}		1725 cm^{-1}	
	R^2	SE	R^2	SE	R^2	SE	R^2	SE
T1	0,995	0,234	0,992	0,351	0,997	0,261	0,976	1,732
T2	0,998	0,170	0,986	0,703	0,997	0,213	0,984	1,583
T3	0,998	0,128	0,983	0,807	0,996	0,204	0,967	2,179
T4	0,922	0,079	0,905	0,025	0,946	0,050	0,959	0,193
Altura	R^2	SE	R^2	SE	R^2	SE	R^2	SE
T1	0,995	0,013	0,979	0,041	0,991	0,012	0,958	0,097
T2	0,996	0,011	0,977	0,041	0,992	0,012	0,974	0,076
T3	0,998	0,006	0,978	0,043	0,994	0,012	0,965	0,097
T4	0,893	0,005	0,951	0,003	0,946	0,006	0,977	0,017

Técnicas de filtrado. T1: Residuales, T2: Derivada segunda, T3: Deconvolución, T4: Derivada primera.

Los valores de R^2 y m para SWG1, se determinaron después de la eliminación de los valores atípicos (1 outlier, 26 muestras finales) y son presentados en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5. Comparación de R^2 y m para todas las técnicas de análisis de regresión basadas en cada curva de calibrado.

Pico	1263 cm^{-1}		1292 cm^{-1}		1381 cm^{-1}		1725 cm^{-1}	
	R^2	m	R^2	m	R^2	m	R^2	m
T1	0,390	1,7575	0,454	1,5926	0,399	1,9215	0,440	1,8615
T2	0,769	1,4347	0,848	1,2199	0,811	1,4343	0,515	1,4313
T3	0,658	2,1081	0,689	1,4906	0,574	1,8265	0,105	1,7658
T4	0,850	1,2969	0,824	1,0112	0,871	1,0640	0,744	1,0225
Altura	R^2	m	R^2	m	R^2	m	R^2	m
T1	0,836	1,1158	0,880	1,0073	0,875	1,2179	0,745	1,1587
T2	0,801	1,1854	0,874	1,0022	0,868	1,1749	0,770	1,1678
T3	0,857	1,3944	0,902	0,9998	0,829	1,2214	0,731	1,1580
T4	0,859	1,2879	0,801	0,9369	0,860	1,1422	0,803	1,1667

Técnicas de filtrado. T1: Residuales, T2: Derivada segunda, T3: Deconvolución, T4: Derivada primera. m : pendiente.

Se puede observar una correlación lineal, basada en la altura de pico, significativa en casi todos los casos. Aunque la calibración con la altura del pico a 1292 cm^{-1} no presentó el mejor R^2 , exhibió la mayor correlación en la predicción del porcentaje de PHA ($R^2 = 0,902$ con el filtro de deconvolución), y con m prácticamente igual a la unidad.

En la **Figura 5.4**, se puede observar la distribución de los datos, junto con los intervalos de confianza y predicción, para el mejor modelo de predicción determinado por SLRA.

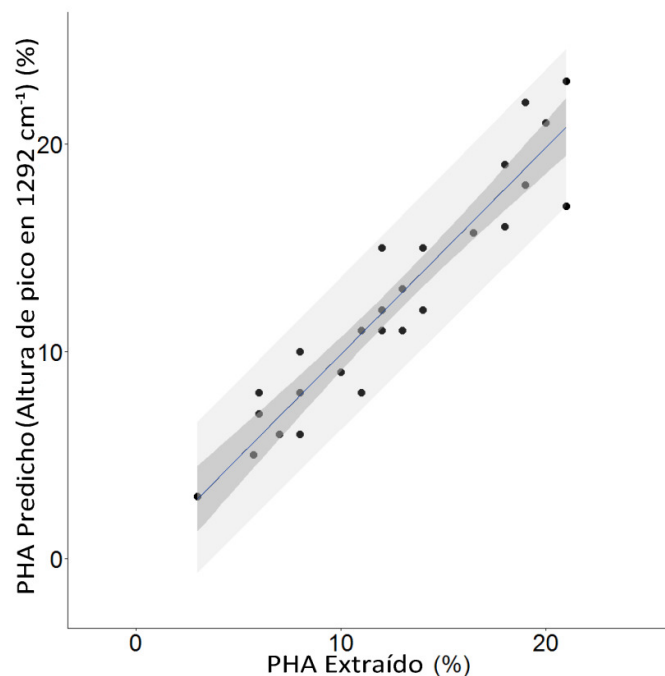


Figura 5.4. Curva de regresión para la relación del porcentaje de PHA extraído (CEPHA) y el porcentaje de PHA predicho con la mejor técnica (deconvolución) determinada por SLRA para el pico a 1292 cm^{-1} . Intervalo de predicción (gris) e intervalo de confianza (gris claro).

5.5 DISCUSIÓN

Para el análisis de PLSR1, los errores determinados para la calibración (RMSECV) determinados a partir de Tt1 fueron superiores, en todos los casos, a los valores de RMSECV determinados a partir de Tt2 con todas las réplicas de las muestras.

Esto puede deberse a la menor cantidad de muestras empleadas para Tt1. Sin embargo, todos los RMSECV obtenidos en el presente trabajo fueron menores a los obtenidos por otros autores en calibraciones para diversas cepas de *Escherichia coli* (Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004). Con respecto a los R^2 , en todos los casos los mejores valores se obtuvieron a partir Tt1, incluso cuando son comparados con los R^2 determinados para cepas de *E. coli* (Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004). Además, utilizando los modelos de calibración de las derivadas primera y segunda basados en Tt1, los errores de predicción (RMSEP) fueron menores, en casi todos los casos, cuando son comparados con las predicciones obtenidas por otros autores para varias cepas de *E. coli* (Jarute y col., 2004).

En base a los resultados de PLSR1, las predicciones de Tt1 utilizando las derivadas primera y segunda, muestran ser una alternativa de ajuste buena y robusta para determinar rápidamente el CEPHA en muestras liofilizadas en las cuales no se conoce el contenido de PHA. El *error cuadrático medio de validación cruzada* (RMSECV) es el método más utilizado para la estimación de error en quimiometría (Wehrens y col., 2000). Por otra parte, el *error cuadrático medio de calibración* (RMSEC, por sus siglas en inglés) no parece ser un buen estimador del error de predicción, ya que es sesgado (siendo generalmente demasiado optimista), debido a que los datos son utilizados tanto para la construcción del modelo como para la estimación del error (Wehrens y col., 2000; Gemperline, 2006; Garcia y Filzmoser, 2015). Esta es la razón por la que no se presentan RMSEC en el presente trabajo.

La metodología propuesta, de empleo de pastillas de KBr y en particular del MPE como material de calibración estándar en lugar de PHA, proporciona un método rápido y confiable para predecir la cantidad de PHA extraíble. Además, es un método fácil y accesible que sólo requiere equipamiento básico de FTIR. La calibración obtenida con

una cantidad relativamente baja de muestras dio predicciones adecuadas del contenido de PHA en muestras de células liofilizadas. Recientemente se han llevado a cabo pruebas preliminares de comparación entre células secadas en estufa (60 °C) hasta peso constante y células liofilizadas de las mismas muestras. Las predicciones obtenidas mostraron valores de RMSEP muy similares para ambos métodos de secado, lo que permitiría una mayor disminución del tiempo para la determinación del PHA extraíble (datos no mostrados). Esta metodología podría aplicarse a otras cepas productoras de PHA, ya que se basa en una determinación estadística de las características de los picos de los espectros de FTIR con el fin de predecir la concentración de PHA en muestras de células.

Además de su uso potencial, el MPE permite el uso de herramientas estadísticas más simples, debido a la correlación entre sus características de pico (altura y área) con el porcentaje de PHA extraíble. Es por ello que en el presente trabajo, en una segunda etapa, se aplicó un análisis de regresión lineal simple (SLRA), que demostró ser capaz de producir resultados adecuados y también ser útil para mejorar la eficiencia de todo el proceso de determinación.

Finalmente, el ruido observado en los espectros originales, generado por la superposición de picos relacionados con diferentes enlaces de moléculas presentes en los componentes celulares, interfiere con la observación de picos característicos. En el presente trabajo, estos ruidos se lograron eliminar, al menos parcialmente, por medio de técnicas de filtrado. No se han encontrado referencias sobre la cuantificación de PHA basado en FTIR y análisis multivariado en cepas bacterianas Gram positivas. El uso del análisis de los espectros FTIR obtenidos por transmisión empleando pastillas de KBr, con el empleo de técnicas estadísticas, ha demostrado ser flexible y rápido para predecir el porcentaje de PHA extraíble en una cepa de *B. megaterium*. El nuevo estándar

(MPE), utilizado como material de calibración, fue aislado directamente de la cepa, y resultó ser un material relativamente simple y fácil de obtener en la práctica.

5.6 CONCLUSIONES

Las herramientas desarrolladas para determinar la concentración de PHA extraíble en muestras de células intactas empleando espectros FTIR, resultaron ser confiables empleando tanto métodos estadísticos relativamente simples (análisis por regresión lineal simple, SLRA) como métodos estadísticos más complejos (análisis multivariado con regresión por cuadrados medios parciales, PLSR).

En ambos casos, el empleo de pastillas de KBr y equipamiento básico de FTIR como transmisión demostró ser una nueva alternativa capaz de predecir la cantidad de PHA extraíble con un rápido procesamiento de las muestras. Por otra parte para obtener la curva de calibración se encontró un nuevo estándar proveniente de un paso intermedio de la extracción del PHA (denominado material de pre-extracción o MPE).

Mediante herramientas estadísticas y técnicas de filtrado comúnmente utilizadas para procesar la información contenida en el espectro IR se determinó una alta correlación entre las características espectrales del MPE y el porcentaje de PHA extraíble.

En el desarrollo de estas herramientas se empleó también el paquete estadístico R, el cual demostró una alta flexibilidad para el manejo de los datos tanto para los análisis estadísticos más simples (SLRA) como para los análisis estadísticos complejos (PLSR y PCA). Esto convierte al software R, gratuito y de código abierto, en una herramienta con gran potencial para ser empleada en diferentes análisis estadísticos.

5.7 REFERENCIAS

- Arcos-Hernandez, M. V., Gurieff, N., Pratt, S., Magnusson, P., Werker, A., Vargas, A., Lant, P. (2010) Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *J. Biotechnol.*, 150:372-379.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R. M. (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 6:29-37.
- Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., Pittman, J. K. (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in fresh water microalgae. *Biores. Technol.*, 101:4499-4507.
- Dziuba, B., Babuchowski, A., Nalecz, D., Niklewicz, M. (2007) Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int. Dairy J.*, 17:183-189.
- Garcia, H., Filzmoser, P. (2015) Multivariate statistical analysis using the R package chemometrics. Vienna, Austria.
- Geladi, P., Kowalski, B. R. (1986) Partial least-squares regression: a tutorial. *Anal. Chim. Acta*, 185:1-17.
- Gemperline, P. (2006) Practical guide to chemometrics (2nd Ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., Steinbüchel, A. (2012) Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2:59.
- Helm, D., Naumann, D. (1995) Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 126:75-80.

- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:523-526.
- Ibrahim, M. H. A., Steinbüchel, A. (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* mw1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:6222-6231.
- Jarute, G., Kainz, A., Schroll, G., Baena, J. R., Lendl, B. (2004) On-line determination of the intracellular poly(β -hydroxybutyric acid) content in transformed *Escherichia coli* and glucose during PHB production using stopped-flow attenuated total reflection FTIR spectrometry. *Anal. Chem.*, 76:6353-6358.
- Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., Mc Naughton, D. (2000) Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3415-3420.
- Lasch, P. (2012) Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 117:100-114.
- Manna, A., Banarjee, R., Paul, A. K. (1999) Accumulation of poly(β -hydroxybutyric acid) by some soil streptomycetes. *Curr. Microbiol.*, 39:153-158.
- Mark, H., Workman, J. Jr. (2003) *Statistics in Spectroscopy* (2nd Ed.). Elsevier, USA.
- Martens, H. (2001) Reliable and relevant modelling of real world data: a personal account of the development of PLS Regression. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 58:85-95.
- Mevik, B. H., Wehrens, R. (2007) The PLS package: principal component and partial least squares regression in R. *J. Stat. Soft.*, 18:1-24.

- Misra, A. K., Thakur, M. S., Srinivas, P., Karanth, N. G. (2000) Screening of poly- β -hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biotechnol. Lett.*, 22:1217-1219.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. (1991) Microbiological characterization by FTIR spectroscopy. *Nature*, 351:81-82.
- Naumann, D. (2000) Infrared spectroscopy in microbiology, In: Encyclopedia of analytical chemistry, R. A. Meyers Ed., John Wiley & Sons Ltd, 102-131.
- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J. A., Kohler, A. (2004) FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *J. Microbiol. Meth.*, 59:149-162.
- Pochon, J., Tardieu, L. (1962) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle, Paris.
- Porras, M. A., Cubitto, M. A., Villar, M. A. (2014) Quantitative determination of intracellular PHA in *Bacillus megaterium* BBST4 strain using Mid FTIR spectroscopy. *XIV Latin American Symposium on Polymers and XII Ibero American Congress on Polymers*. http://www.eventweb.com.br/slap2014/home-event/schedule.php?sessao=&q=porras&area=todas&tipo=todos&busca_por=tudo#trabalhos
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>.
- Ramsay, J. A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C., Ramsay, B. A. (1994) Extraction of poly(3-hydroxybutyrate) using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.*, 8:589-594.
- Salman, A., Erukhimovitch, V., Talyshinsky, M., Huleihil, M. (2002) FTIR spectroscopic method for detection of cells infected with herpes viruses. *Biopolym.*, 67:406-412.

- Schmitt, J., Beekes, M., Brauer, A., Udelhoven, T., Lasch, P., Naumann, D. (2002) Identification of scrapie infection from blood serum by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal. Chem.*, 74:3865-3868.
- Schuster, K.C., Mertens, F., Gapes, J. R. (1999) FTIR spectroscopy applied to bacterial cells as a novel method for monitoring complex biotechnological processes. *Vib. Spectrosc.*, 19:467-477.
- Shahid, S., Mosrati, R., Ledauphin, J., Amiel, C., Fontaine, P., Gaillard, J. L., Corroler, D. (2013) Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 302-308.
- Sivakesava, S., Irudayaraj, J., Demirici, A. (2001) Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26:185-190.
- Smith, B. C. (2011) Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy. CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T. (2007) Large-scale production and efficient recovery of PHA with desirable material properties, from newly characterized *Bacillus cereus* SPV. *J. Biotechnol.*, 132:251-258.
- Wehrens, R., Putter, H., Buydens, L. M. C. (2000) The bootstrap: a tutorial. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 54:35-52.
- Wenning, M., Scherer, S. (2013) Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:7111-7120.
- Wold, S. (2001) Personal memories of the early PLS development. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 58:83-84.

CAPÍTULO 6. Conclusiones generales y trabajo futuro

6.1. CONCLUSIONES GENERALES

Por la metodología de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se determinó la capacidad de producción de PHAs en distintas cepas aisladas de sedimentos del Estuario de Bahía Blanca. Esta metodología permitió la selección de la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 para continuar los estudio de optimización debido a su mayor producción de PHAs.

La cepa *B. megaterium* BBST4 fue capaz de crecer y producir PHAs a partir de distintas fuentes de nitrógeno y distintas fuentes de carbono y energía en un medio salino mínimo.

A partir de un medio de cultivo económico compuesto por una solución basal salina (solución Winogradsky modificada), la cepa *B. megaterium* BBST4 pudo crecer y producir concentraciones de hasta 30 % de PHA empleando fuentes de carbono y nitrógeno renovables y económicas, como glicerol, almidón, melaza de caña de azúcar y urea.

La producción de PHA fue optimizada empleando herramientas con alta robustez estadística, como es la metodología de superficie de respuesta, y alta predictibilidad, como es el modelado matemático.

Se demostró que la cepa *B. megaterium* BBST4 es capaz de producir co-polímeros de PHAs, lo cual permitiría emplear el PHA producido en aplicaciones de alto valor agregado como la industria farmacéutica y medicinal. Este es el primer reporte sobre una cepa de *Bacillus* spp. productora de este tipo de co-polímeros de PHA a partir de distintas fuentes de carbono renovables

Se desarrolló una nueva estrategia de cuantificación del PHA extraíble producido por la cepa *B. megaterium* BBST4, mediante el empleo de un nuevo estándar de calibración y técnicas estadísticas simples y complejas (análisis por regresión lineal simple y análisis multivariado (PLSR y PCA), respectivamente) logrando acotar los tiempos y esfuerzos empleados en las determinaciones convencionales. Estas herramientas son un aporte para agilizar, con suficiente precisión, la determinación de la producción de PHA extraíble en células intactas y sin el uso de solventes contaminantes. Esta metodología se podría adaptar a otras cepas productoras lo cual significa un aporte para futuros estudios en el tema.

El empleo de software estadístico gratuito y de código abierto (R) permitió una alta eficiencia en todos los análisis estadísticos realizados en la tesis. Esto genera una alternativa sin costo económico alguno para la generación de nuevas herramientas estadísticas y de análisis de resultados experimentales complejos, lo que permite crear diseños experimentales que acorten el tiempo de trabajo, maximizando y optimizando las posibilidades de experimentación.

6.2. TRABAJO FUTURO

Se continuará con el aislamiento de cepas productoras de PHA a partir de muestras de sedimentos marinos y residuos agroindustriales y el ensayo de nuevos sustratos económicos, que sirvan para la producción de co-polímeros de alto valor agregado.

En este sentido se plantea:

- La optimización del proceso de producción de PHAs a partir de glicerol empleando como medio de cultivo los residuos derivados de la producción industrial del biodiesel, para disminuir el impacto ambiental que puede generar a futuro la

acumulación en exceso de este residuo, y así lograr una disminución aun mayor de los costos del medio de crecimiento y producción de PHAs propiciando además un producto de valor agregado a la industria generadora de este tipo de combustibles.

- El escalado del proceso de obtención de PHAs a partir de almidón para lograr optimizar la producción de co-polímeros a gran escala, a partir de una fuente de carbono de alta producción en la región y por lo tanto asequible a bajo costo.
- Optimizar la producción de PHAs a partir de melaza de caña de azúcar y otros medios de cultivos provenientes de fuentes renovables (residuos del lavado de la industria de la papa, orujo de la industria aceitunera y otros residuos de la industria oleícola) siguiendo el protocolo de diseño experimental y modelado establecidos en la tesis, para contar con otras alternativas económicas de fuentes de carbono. Esto permitiría establecer la/s alternativas de mayor viabilidad económica.
- Aislar nuevas cepas siguiendo los protocolos descritos en la tesis para continuar en la búsqueda de bacterias con potencial para utilizar residuos industriales y con capacidad de producir PHAs con distintas propiedades.
- Continuar con la optimización de procesos alternativos de extracción más amigables con el medioambiente, teniendo en cuenta los solventes utilizados en la industria con la posibilidad de disminuir costos de producción acoplando procesos (e.g., producción de PHAs mediante el empleo de residuos de la industria como medio de cultivo y acoplando el proceso de extracción con el uso de los solventes que emplea la misma industria, como pueden ser: alcoholes, acetonas, NaOH, entre otros).
- Continuar con la optimización de procesos alternativos de cuantificación de PHAs, rápidos y no destructivos, para lograr obtener con mayor precisión las condiciones y tiempos de cultivo óptimos aplicables en línea.

ANEXO A

A.1. EL SOFTWARE ESTADÍSTICO

La estadística es una ciencia aliada de la investigación científica. En 1955, Neyman proclamó a la estadística como “la sirvienta de todas las ciencias”, ejemplificando su importancia en el estudio de la existencia y evolución, la medicina, la psicología, la industria y la astronomía. La estadística no sólo ha contribuido enormemente al desarrollo de las anteriores, sino también en muchas otras disciplinas científicas (Salas, 2008). Mediante la estadística se evalúan cuantitativamente hipótesis de investigación, se desarrollan modelos predictivos, se estiman parámetros y se analizan experimentos, entre otras aplicaciones. En disciplinas que requieren de un trabajo intensivo en laboratorio, como la microbiología, se emplean diversos “diseños experimentales” que no son más que modelos estadísticos para el análisis de los experimentos. El uso de un software estadístico es importante tanto en la ciencia básica como en la aplicada. En la práctica, tanto investigadores como profesionales emplean algún programa estadístico para realizar pruebas de hipótesis, ajustes de modelos y análisis de diseños experimentales complejos (Salas, 2008). Muchas veces deben analizarse grandes bases de datos y una gran cantidad de variables. Microsoft Excel[®] es una planilla de cálculo ampliamente usada debido a que es parte de la instalación típica de computadoras con sistema operativo Microsoft Windows[®], y con la ayuda de algunos “add-ins” puede también ejecutar algunos procedimientos estadísticos (Zhu y Kuljaca 2002). Sin embargo, su uso en análisis estadístico sigue siendo bastante limitado. Además, se ha mostrado la baja calidad de los procedimientos estadísticos de este software (McCullough y Wilson 1999, 2002, 2005).

SPSS, Stata, Systat y SAS son softwares estadísticos típicamente citados en artículos de revistas científicas. Son programas comerciales y, por lo tanto, tienen una

orientación y administración enfocadas a aquellos mercados y usuarios que les proporcionan los mayores beneficios. Los tres primeros poseen estructuras similares (aunque con diferencias en sus procedimientos), estos ofrecen un uso sencillo de las opciones, acceso rápido a datos y procedimientos, generación de salidas y gráficos.

SPPS es un programa con una interfaz gráfica de usuario amigable, y sólo a través de ésta se accede a sus opciones (abrir los datos y ejecutar cálculos).

SAS (SAS Institute Inc., 2007) ha sido por largos años el software más utilizado en la comunidad estadística y, por lo tanto, también se ha propagado su uso entre investigadores de diferentes disciplinas. SAS, a diferencia de SPSS, es un programa que requiere el ingreso de comandos (sintaxis) para ejecutar gran parte de sus rutinas y opciones. Por lo tanto, necesita del conocimiento de la sintaxis antes de su uso. SAS ha llegado a ser el programa estándar empleado en ensayos clínicos y por la industria farmacéutica en los Estados Unidos.

Nacido en el año 1992, R (Ihaka y Gentleman 1996; R Development Core Team 2015) es un programa estadístico oficialmente presentado en 1997. Es un lenguaje de programación de uso libre y se rige por la licencia general pública de la fundación de software libre (<http://www.gnu.org/>) y por lo tanto de distribución gratuita y código abierto, con una amplia variedad de métodos estadísticos, computacionales y de visualización disponibles (Huber, 2011). Desarrollado como un gran proyecto colaborativo de estadísticos de diversos países y disciplinas que aumenta exponencialmente año tras año (**Figura A.1**), también es un programa basado en comandos, en el que se puede acceder a todos los procedimientos y opciones a través de sintaxis computacional (Salas, 2008).

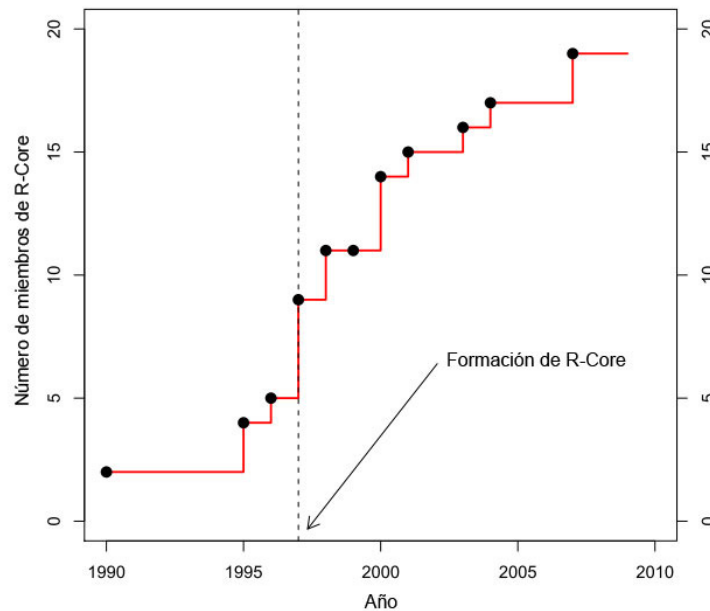


Figura A.1. Crecimiento del equipo R-Core. Los puntos representan los cambios en la membresía (modificado de Fox, 2009).

Otros dos softwares estadísticos de uso común en ciencia, como son Design-Expert y The Unscrambler, dedicados a determinados análisis específicos, como es el diseño de experimentos (DOE) y el análisis multivariado (MVA) se incluyen en la **Tabla 1A** donde puede observarse una comparación general entre estos cinco paquetes en relación a aspectos fundamentales que debe presentar un software estadístico.

Los artículos académicos son ricos en información ya que aportan una medida de la calidad del software empleado en ellos. En publicaciones académicas y científicas es probable que aparezca un paquete de software popular como una herramienta de análisis o incluso un objeto de estudio. El software que se utiliza en artículos académicos y científicos es un potencial indicativo de la línea que la próxima generación de analistas seguirá. Google Académico ofrece una manera de medir dicha actividad (Muenchen, 2015) (**Tabla A.1**).

Tabla A.1. Comparación de aspectos generales entre los programas estadísticos SPSS, SAS, R, Design-Expert y The Unscrambler (modificado de Salas, 2008).

Aspecto	Programa estadístico				
	SPSS®	SAS®	R	Design-Expert®	The Unscrambler®
Costo (US\$)	1.500 (2009)	7.200 (2009)	Gratis (2015+)	1.095 (2015)	1.500 (2005)
Amigabilidad con el usuario	Excelente	Baja-Regular	Baja-Regular	Buena	Regular-Buena
Manejo de datos	Baja	Buena	Buena	Buena	Buena
Calidad de gráficos	Regular	Buena-Excelente	Excelente	Regular-Buena	Regular-Buena
Control de procesos	Baja	Excelente	Excelente	Baja	Baja
Código fuente disponible	No	No	Si	No	No
Variedad análisis estadísticos	Buena	Buena-Excelente	Excelente	Baja (DOE)	Baja (MVA)
Documentación	Excelente	Buena	Buena-Excelente	Excelente	Buena-Excelente
Soporte técnico	Bueno	Bueno	Bajo	Bueno	Bueno
Sistema operativo	Windows®	Windows® Macintosh® Linux	Windows® Macintosh® Linux	Windows®	Windows®
Citas GA (2015+)	32.300	26.100	12.100	1.660	763

DOE: Diseño de experimentos, MVA: Análisis multivariado, GA: Google Académico. 2015+: dicho año y posteriores.

En la **Figura A.2** se puede observar el número de artículos encontrados para cada paquete de software para el último ejercicio completo de 2014. Los paquetes más utilizados corresponden a SPSS, SAS y R. En las **Figuras A.3 y A.4** se puede observar, con dos mediciones distintas, el crecimiento de R para uso académico por sobre SPSS y SAS. En el caso de la **Figura A.3** entre 2013 y 2014, mientras R presentó un crecimiento en el número de artículos en los que aparece citado, SPSS y SAS presentaron un decrecimiento inversamente proporcional a R en las citas. Esta tendencia

se puede observar también en la **Figura A.4**. En la **Figura A.5** se puede observar el crecimiento exponencial que viene presentando el software estadístico R en número de paquetes dedicados a distinto tipo de análisis, por lo que todo indicaría un enorme potencial de R de cara al futuro como herramienta estadística multifacética.

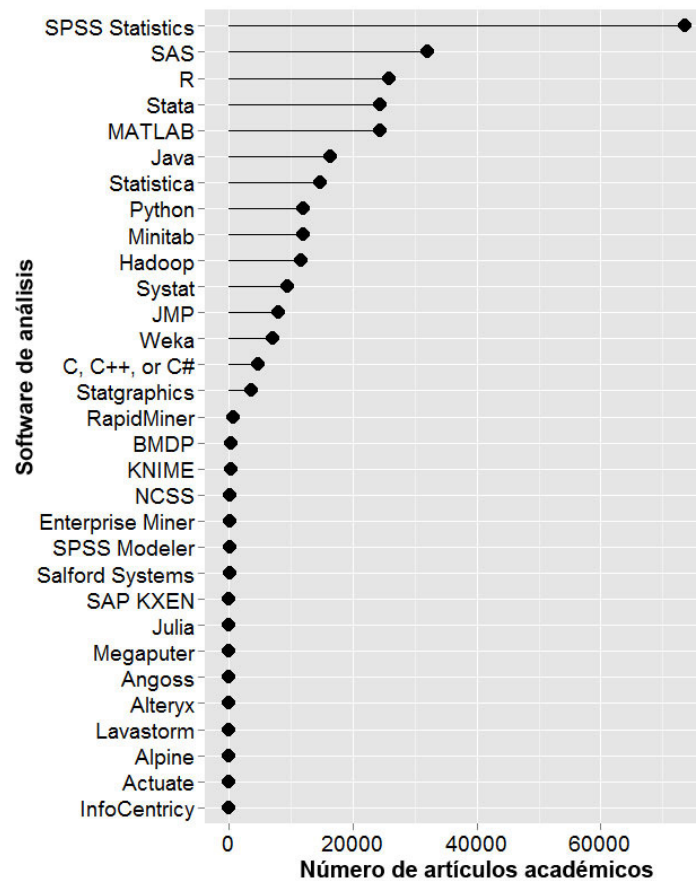


Figura A.2. Número de artículos académicos encontrados en el año 2014 para cada paquete de software (modificado de Muenchen, 2015).

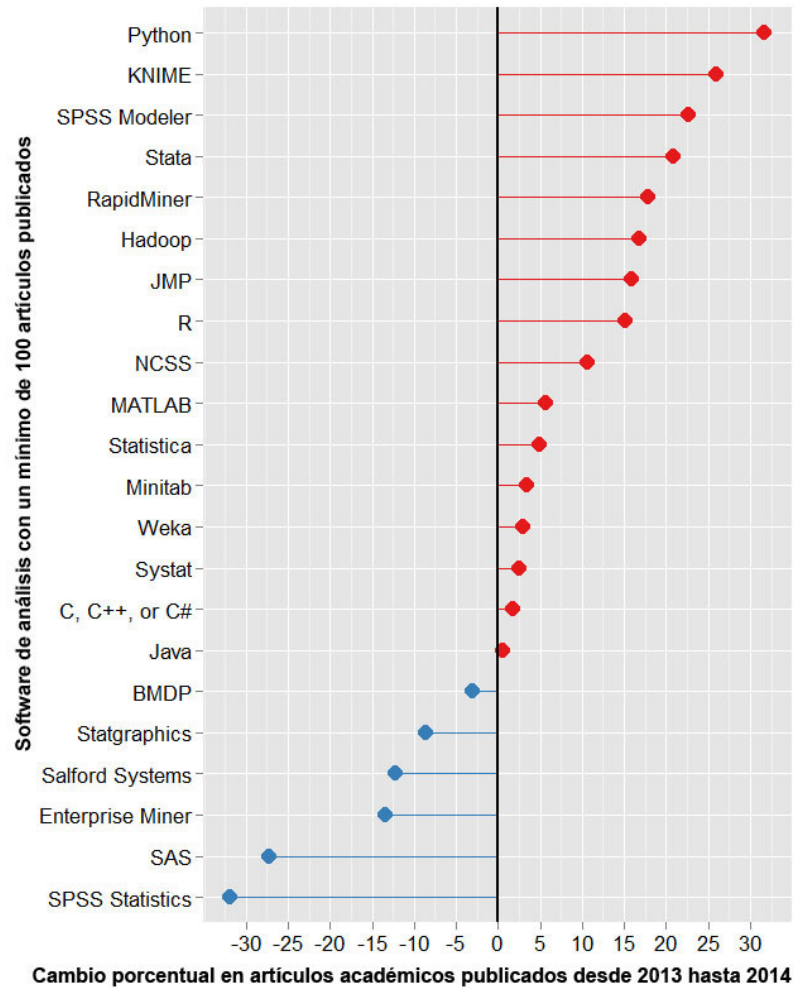


Figura A.3. Cambio en el número de artículos académicos que citan cada software en los dos últimos años previos más recientes (2013-2014). Los softwares que se muestran en rojo están creciendo en número de citas, mientras que los que se muestran en azul van decreciendo en número de citas (modificado de Muenchen, 2015).

Finalmente cabe destacar que en muchos proyectos de investigación se destinan grandes sumas de dinero a la adquisición de software estadístico, que bien podría ser destinado a otros ítems si se emplea un software estadístico gratuito.

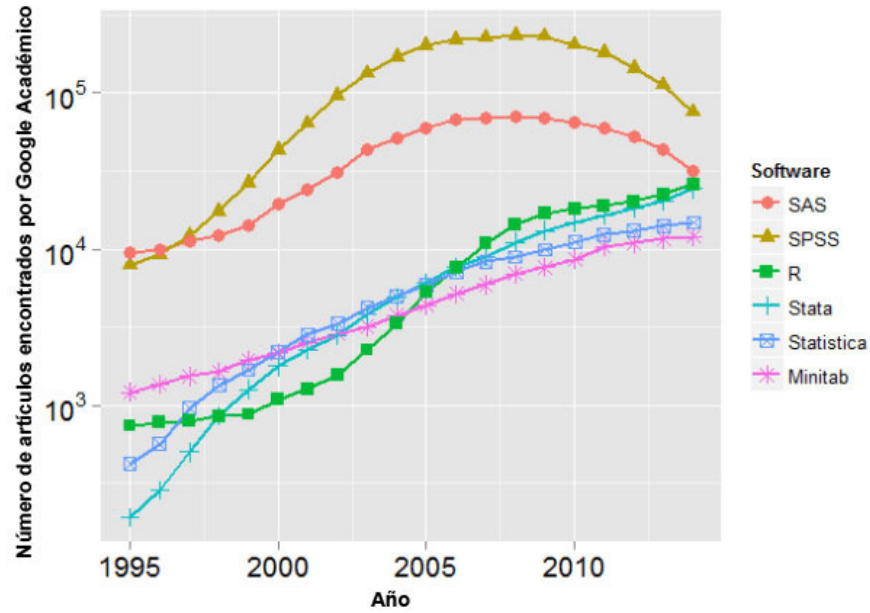


Figura A.4. Visión logarítmica del número de artículos académicos encontrado en cada año por Google Académico. Sólo se muestran los primeros seis paquetes estadísticos "clásicos" (modificado de Muenchen, 2015).

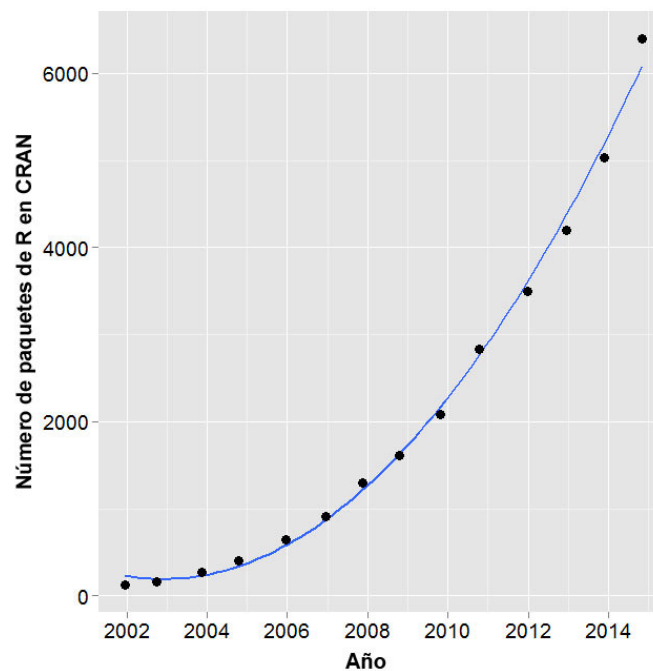


Figura A.5. Número de paquetes para el software R disponibles en su sitio de distribución principal para la última versión liberada en cada año (modificado de Muenchen, 2015).

El uso de un programa estadístico de excelente nivel y gratuito como R ayudaría a la enseñanza en todos los niveles educativos, además de permitir a los estudiantes seguir empleando el mismo programa en cada paso en una carrera profesional, sin necesidad de invertir dinero en programas estadísticos y con la ventaja de aprovechar los conocimientos técnicos adquiridos previamente (Salas, 2008).

A.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS REALIZADOS EN R (Capítulo 3)

Función de RSM empleada con el paquete *rsm* del software R:

$rsm(Y_i \sim \text{Block} + FO(X_i) + TWI(X_i) + PQ(X_i), \text{data} = \text{Experimental Matrix})$

y simplificada por $rsm(Y_i \sim \text{Block} + SO(X_i), \text{data} = \text{Experimental Matrix})$

Donde Y_i son las variables dependientes y X_i las variables independientes, **Block** representa a los bloques, **FO**, **TWI**, **PQ** y **SO** son las funciones de primer orden, de interacciones entre las variables, cuadrática pura y de segundo orden, respectivamente, **data = Experimental Matrix** es la forma de tomar los datos de la matriz experimental a emplear para la determinación de la superficie de respuesta.

Determinación de la bondad de estimación de los puntos estacionarios óptimos

Los puntos estacionarios obtenidos por medio de 200 re-ajustes del modelo obtenido por RSM fueron graficados junto con el estimado para RSM de la variable PHA (**figura A.6**). Estos gráficos muestran algo parecido a una región de confianza para la mejor combinación de variables (Lenth, 2015).

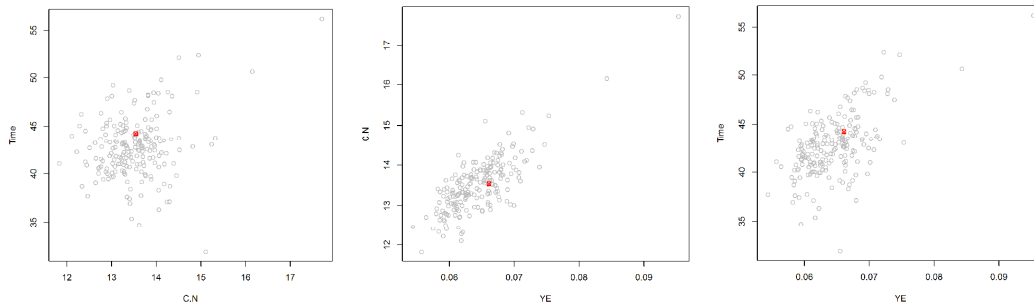


Figura A.6. Determinación de la bondad de estimación de los puntos estacionarios óptimos.

A.3. REFERENCIAS

Fox, J. (2009). Aspects of the social organization and trajectory of the R project. *The R Journal*, 1:5-13. URL: http://journal.r-project.org/archive/2009-2/RJournal_2009-2_Fox.pdf

Ihaka, R., Gentleman, R. (1996) R: A language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.*, 5(3):299-314.

Lenth, R. V. (2015) Response-surface illustration: Vignette for rsm package. R package version 2.7-4. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=rsm>

Mc Cullough, B. D., Wilson, B. (1999) On the accuracy of statistical procedures in Microsoft Excel 97. *Comp. Stat. Data Analys.*, 31(1):27-37.

Mc Cullough, B. D., Wilson, B. (2002) On the accuracy of statistical procedures in Microsoft Excel 2000 and Excel XP. *Comp. Stat. Data Analys.*, 40(4):713-721.

Mc Cullough, B. D., Wilson, B. (2005) On the accuracy of statistical procedures in Microsoft Excel 2003. *Comp. Stat. Data Analys.*, 49(4):1244-1252.

Muenchen, R. A. (2015) *The Popularity of Data Analysis Software*. URL: <http://r4stats.com/articles/popularity/>

Neyman, J. (1955) Statistics - Servant of all sciences. *Science*, 122(3166):401-406.

R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.r-project.org>.

Salas, C. (2008) Por qué comprar un programa estadístico si existe R? *Ecol. Austral*, 18(203):223–231.

Zhu, X, Kuljaca, O. (2002) A short preview of free statistical software packages for teaching statistics to industrial technology majors. *J. Ind. Technol.*, 21(2):1-6.

ANEXO B

B.1. MEDIOS DE CULTIVO

SW: solución de sales de Winogradsky (Pochon y Tardieu, 1962) consiste en: 2,5 g/L K_2HPO_4 , 2,5 g/L KH_2PO_4 , 2,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 2,5 g/L NaCl, 0,05 g/L $MnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,5 g/L $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$. En todos los casos a la SW se le adicionó 0,1 mL de una solución de micronutrientes o elementos traza (0,1 g/L $CaCl_2$, 0,03 g/L Na_2MoP_4 , 0,03 g/L H_3BO_3 , 0,0005 g/L $CoCl_2$). Los sulfatos y la solución de elementos traza se esterilizaron en autoclave por separado antes de la adición al medio para evitar la precipitación.

SWA: SW con el agregado de 1,2 % agar-agar ultra puro (Merck, Alemania), para cultivos en placa. En esta tesis se utilizó la SWA con el agregado de distintas fuentes de carbono y nitrógeno. Los medios de SWA con el agregado de 0,1 % (p/v) de distintas fuentes de nitrógeno se denominaron de la siguiente manera: urea (**SWA_{urea}**), $(NH_4)_2SO_4$ (**SWA_{(NH4)2SO4}**), NH_4Cl (**SWA_{NH4Cl}**), KNO_3 (**SWA_{KNO3}**) y NH_4NO_3 (**SWA_{NH4NO3}** o **SWA_n**) (**Capítulo 2**). En el **capítulo 5** este cultivo es utilizado para monitorear la producción de PHA y por lo tanto es denominado fermentación en estado sólido (FES).

SWG: a la SW se le adicionan glicerol (Anedra, Argentina) y urea (AN00739707, Anedra, Argentina) como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El glicerol es autoclavado junto con la SW y la urea es esterilizada por filtración a través de una membrana con 0,22 micras de poro (Merck-Millipore, Brasil) y añadida asepticamente al medio (**Capítulos 2, 4 y 5**).

SWGA: a la SWG se le adicionan 1,2 % de agar-agar ultra puro (Merck, Alemania), para cultivos en placa (**Capítulos 2, 4 y 5**).

SWS: SW complementada con almidón (Anedra, Argentina) y urea (Anedra, Argentina), como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El almidón y la urea son esterilizados por filtración a través de una membrana con 0,22 micras de poro (Merck-Millipore, Brasil) y añadidos asépticamente al medio (**Capítulos 3 y 4**).

SWSA: a la SWS se le adicionan 1,2 % de agar-agar ultra puro (Merck, Alemania), para cultivos en placa (**Capítulo 3**).

SWM: SW complementada con 20 g/L de melaza de caña de azúcar y 1 g/L de urea (Anedra, Argentina), como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. La melaza de caña de azúcar es autoclavada junto con la SW y la urea es esterilizada por filtración a través de una membrana con 0,22 micras de poro (Merck-Millipore, Brasil) y añadida asépticamente al medio (**Capítulo 4**).

SWA_{Glu}: SWA con el agregado de 2 % (p/v) de glucosa como fuente de carbono (**Capítulo 2**).

PCA: agar para recuento en placa. Medio de cultivo complejo recomendado para el recuento de bacterias aeróbicas en aguas, productos lácteos y otros alimentos. También es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas (**Capítulo 5**).

B.2. MÉTODOS DE TINCIÓN

Shaeffer-Fulton (1933) (Capítulos 2 y 3): Este método es habitualmente empleado para observar la presencia de esporas. Una suspensión del cultivo se extiende en la superficie de un portaobjetos y se deja secar al aire. La muestra es fijada por calor. El portaobjetos se baña con una solución de verde de malaquita y se utiliza una fuente de calor para tratar a las células y esporas con el vapor de la solución de verde de malaquita. Esto requiere de aproximadamente 5 minutos y debe hacerse con cuidado para lograr vaporizar el agua de la muestra sin carbonizar la muestra. Esta etapa de

calentamiento tiñe las células vegetativas y las endosporas. Una vez que el periodo de calentamiento se ha completado, el portaobjetos se lava suavemente con agua. El agua actúa como un decolorante para las células vegetativas, ya que el verde de malaquita es soluble en agua y tiene una baja afinidad por el material celular, pero la coloración no es liberada por las endosporas y esporas libres. Para dar color a las células vegetativas se aplica sobre el portaobjetos una contratinción de safranina (Gerhardt y col., 1981; Leboffe y Pierce, 2002). Las endosporas conservan el verde aportado por el verde de malaquita (a veces un poco azulado) y las células vegetativas se verán de un color marrón-rojo o rosado aportado por la safranina (**figura 1.B**).

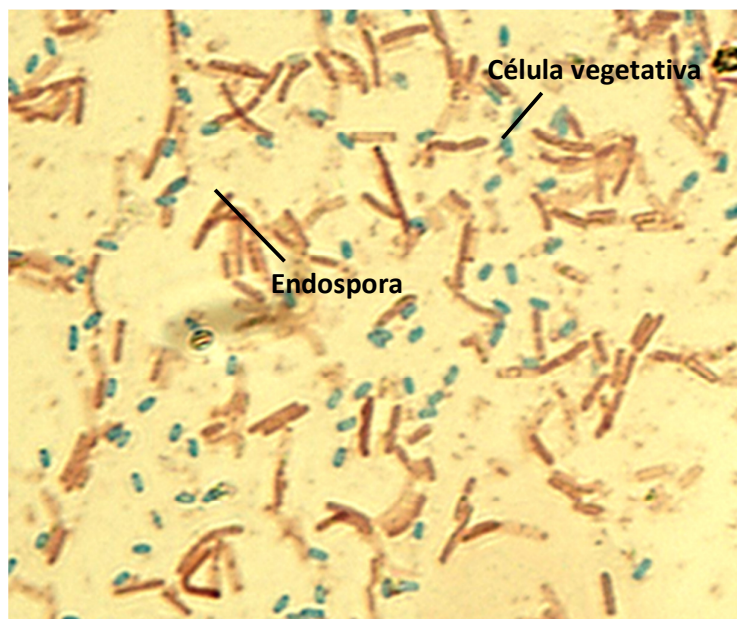


Figura 1.B. Coloración de Shaeffer-Fulton donde pueden observar las distintas coloraciones de las endosporas y de las células vegetativas.

Negro Sudán (Murray y col. 1994): Este método es habitualmente empleado para observar la presencia de gránulos intracelulares de lípidos y PHA. Los extendidos de células depositadas sobre un portaobjetos de vidrio se fijan por medio de calor y se tiñen con una solución de Negro Sudán B (Sigma) al 3 % p/v (en 70 % de etanol) durante 10

min, los cristales de negro Sudán interactúan con los gránulos de PHA generando un complejo PHA-negro Sudán. Seguidamente el portaobjetos se sumerge en xileno hasta que se decolora totalmente, esto elimina el colorante que no entró en contacto con los gránulos de PHA. La muestra se contrañe con safranina (Sigma; 5 % p/v en agua deionizada) durante 10 segundos (Legat y col., 2010), se lava con agua y se seca en estufa, para ser observada en microscopio de campo claro con objetivo de inmersión (**Figura 2.B**).

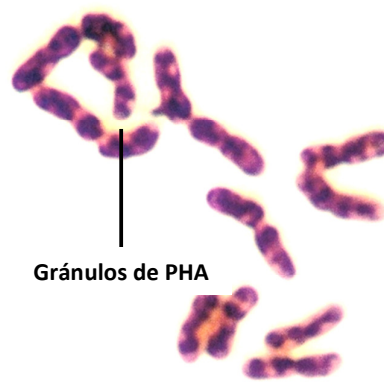


Figura 2.B. Coloración negro Sudán donde se pueden observar coloreadas en tonos rojizos las células de *B. megaterium* BBST4 y en color negro los gránulos de PHA en el interior celular.

Azul Nilo (modificado de Ostle y Holt, 1982 y Kitamura y Doi, 1994) (Capítulo 2):

Este método es habitualmente empleado para observar la presencia de gránulos intracelulares de PHA. Se prepara una solución de azul de Nilo disolviendo 0,05 g de sulfato de azul Nilo (016K0464, SIGMA, Alemania) en 100 mL de etanol. Los extendidos de células depositadas sobre un portaobjetos de vidrio se fijan por medio de calor, se bañan con 5 mL de la solución de azul Nilo y son llevados a estufa a 37 °C. Después de 20 minutos, la solución de colorante es lavada con agua destilada, y una vez secos los extendidos son observados por medio de microscopía de fluorescencia con

filtro de 460 nm y objetivo de inmersión, observándose coloreados de naranja los gránulos de PHA intracelulares (**Figura 3.B**).

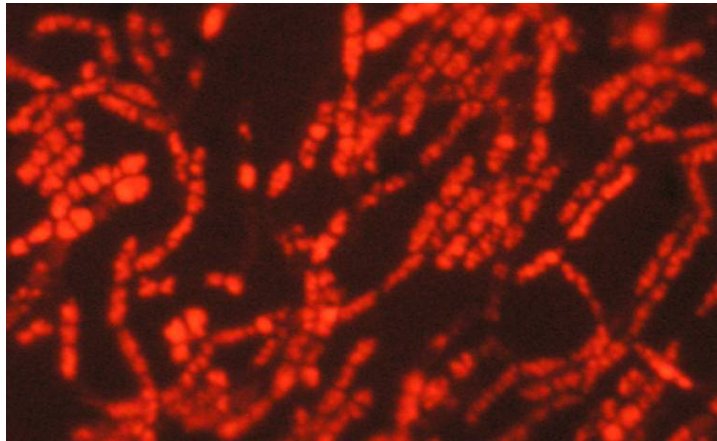


Figura 3.B. Coloración azul Nilo donde se pueden observar coloreadas en tonos anaranjados los gránulos de PHA en el interior de las células de *B. megaterium* BBST4.

Gram (Gram, 1884) (Capítulo 3): La coloración de Gram se puede dividir en 4 pasos: primero los extendidos de células depositadas sobre un portaobjetos de vidrio se fijan por medio de calor y se tiñen con una solución de violeta cristal, en el segundo paso se agrega al extendido con violeta cristal una solución iodada que funcionará como mordiente que se unirá al colorante formando un complejo (CV-I). El tercer paso es el limitante, en este paso se emplea una solución decolorante compuesta de una mezcla etanol-acetona que servirá para lavar el colorante que no queda retenido dentro de las células y definirá si las células dan positiva la prueba reteniendo el colorante (bacterias Gram-positivas) o no (Gram-negativas). En el cuarto y último paso se emplea una solución de safranina o fucsina como colorante de contraste para colorear las células que no retuvieron el colorante violeta cristal (Gram-negativas) (**Figura 4.B**).

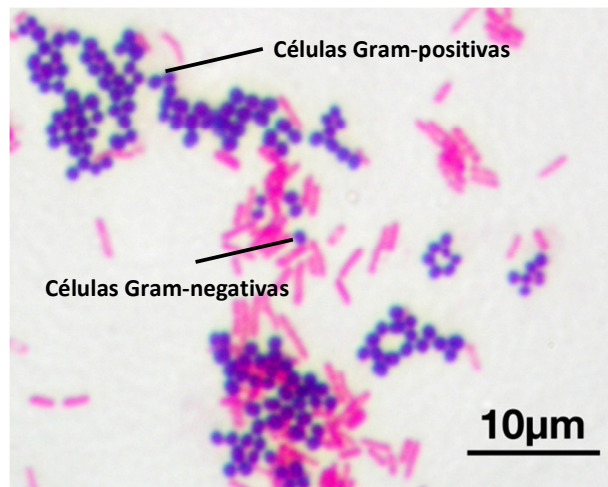


Figura 4.B. Coloración de Gram donde se pueden observar en color fucsia las células Gram-negativas (*Escherichia coli*) y en color violeta oscuro las células Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) (tomado de wikimedia.org).

Las diferencias básicas en las estructuras superficiales de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas explican los resultados de la tinción de Gram. Tanto las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas ocupan las mismas cantidades de cristal violeta (CV) y yodo (I). El complejo CV-I, sin embargo, está atrapado dentro de la célula Gram-positiva por la deshidratación y la reducción de la porosidad de la pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano como resultado de la etapa de lavado diferencial (decoloración) con etanol al 95 %. En contraste, la capa delgada de peptidoglicano y las probables discontinuidades en los sitios de adhesión de membrana de las células Gram-negativas no impiden la extracción del complejo CV-I con el solvente (decolorante) (Baron, 1996). La capa de peptidoglicano está encajonada entre una membrana celular interna y una membrana externa, que propician la retención del colorante de contraste (safranina o fucsina), por lo que aparecen de color rojo o rosa. La secuencia de pasos en la tinción de Gram que esquematizan la diferenciación entre grupos se ilustra en la **Figura 5.B.**

Paso	Organismos Gram-positivos	Organismos Gram-negativos
1. Sin teñir	Claro	Claro
2. Cristal violeta	Violeta	Violeta
3. Solución iodada	Violeta	Violeta
4. Decoloración (Alcohol-acetona)	Violeta	Claro
5. Safranina	Púrpura	Rojo

Figura 5.B. Secuencia general de pasos en el procedimiento de la tinción de Gram y las coloraciones resultantes para las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (tomado de Baron, 1996).

B.3. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN DISUELTO

En la **Figura 6.B** se presenta la curva de calibración empleada para la determinación de la concentración de almidón disuelto (**Capítulo 3**).

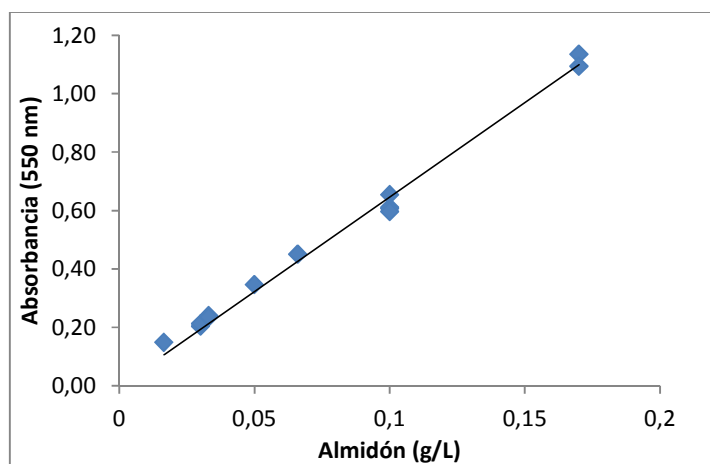


Figura 6.B. Curva de calibrado para la determinación de almidón disuelto ($y = 6,4639x$, $R^2 = 0,991$).

La misma fue obtenida empleando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, EE.UU.) con cubetas de cuarzo en base a la absorbancia del complejo iodo-almidón a 550 nm.

B.4. REFERENCIAS

- Baron, S. (Ed.) (1996) Medical Microbiology. 4th Ed. University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA, 187-197. URL:
<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch012.htm>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/>
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B. (1981) Manual of methods for general microbiology. ASM Press, Washington, DC, USA.
- Gram, H. C. (1884) Über die isolierte färbung der schizomyceten in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2:185-189.
- Kitamura, S., Doi, Y. (1994) Staining method of poly(3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnol. Techn.*, 8(5):345-350.
- Leboffe, M. J., Pierce, B. E. (2002) Microbiology: laboratory theory and applications. Morton Publishing Company, Englewood, CO.
- Murray, R. G. E., Doetsch, R. N., Robinow, C. F. (1994) Determinative and cytological light microscopy. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. Eds., Manual of methods for general microbiology. American Society for Microbiology, Washington, 21- 41.
- Ostle, A. G., Holt, J. G. (1982) Fluorescent stain for poly-3- hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(1), 238-241.

Pochon, J., Tardieu, L. (1962) Techniques d'analyse en microbiologie du sol. De la Tourelle, Paris.

Schaeffer, A. B., Fulton, M. D. (1933) A simplified method of staining endospores.

Science 77:194.

PUBLICACIONES PRESENTADAS CON LA TESIS

Trabajos publicados en revistas internacionales

“A new way of quantifying the production of poly(hydroxyalkanoate)s using FTIR”.
Porras, M. A., Cubitto, M. A., Villar, M. A. (2015). Journal of Chemical Technology & Biotechnology. <http://doi.org/10.1002/jctb.4713>

Presentaciones en eventos científicos

“Producción de poli(β -hidroxibutirato) utilizando almidón como sustrato”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. XII Simposio Latinoamericano de Polímeros. X Congreso Iberoamericano de Polímeros. I Congreso Nacional de Polímeros. I Congreso Centroamericano de Nanotecnociencia. I Congreso Nacional de Nanotecnociencia. 13 al 16 de julio de 2010, Costa Rica. Trabajo aceptado para modalidad de presentación oral.

“Biosíntesis de poli(β -hidroxialcanoato)s por la cepa *Bacillus megaterium* BBST4 empleando glicerol como fuente de carbono”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. IX Simposio Argentino de Polímeros (SAP). 15 al 18 de noviembre de 2011, Bahía Blanca Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación poster.

“Biosíntesis de poli(β -hidroxialcanoato)s por *Bacillus megaterium* BBST4 empleando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono”. Mauricio A. Porras, Agustin E. Prieto, Marie Lair, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. Congreso Latinoamericano Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP). 28, 29 y 30 de marzo de 2012, San Rafael, Mendoza, Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“*Producción de Poli(β -hidroxibutirato) utilizando Glicerol y Melaza de Caña de Azúcar como Sustrato*”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. XIII Simposio Latinoamericano de Polímeros y XI Congreso Iberoamericano de Polímeros (SLAP 2012). 23-26 de septiembre de 2012, Bogotá D.C., Colombia. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“*Production of poly(beta-hydroxybutyrate) by Bacillus megaterium BBST4 using different substrates as carbon sources*”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA). 22 y 23 de noviembre de 2012, Rosario, Santa Fe, Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“*Producción de poli(β -hidroxialcanoato)s por Bacillus megaterium BBST4 empleando glicerol como fuente de carbono*”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. X Simposio Argentino de Polímeros (SAP). 28, 29 y 30 de agosto de 2013, Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“*Co-producción de PHA y EPS por la cepa Bacillus megaterium BBST4 en un medio mínimo con Glicerol como única fuente de carbono*”. Mauricio A. Porras, Marcelo A. Villar, María Amelia Cubitto. XIII Congreso Argentino de Microbiología - II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental. 23, 24, 25 y 26 de septiembre de 2013, Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“*Bacillus megaterium BBST4 como alternativa biotecnológica para la industria farmacéutica*”. Mauricio A. Porras, Cristian Vitale, Loreana C. Gallo, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. XXI Federación Panamericana de Farmacia, XVI Federación Farmacéutica Sudamericana y XXI Congreso Farmacéutico Argentino

(FEFAS). 3 al 5 de octubre de 2013, Salta Capital, Salta, Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“Glycerol and starch as substrate in the production of poly(β -hydroxyalkanoate)s by Bacillus megaterium BBST4 strain”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. 2nd International Conference on Bio-based Polymers and Composites (BiPoCo). 24-28 de agosto de 2014, Visegrád, Hungría. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“Quantitative Determination of intracellular PHA in Bacillus megaterium BBST4 strain Using Mid FTIR Spectroscopy”. Mauricio A. Porras, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. XIV Simpósio Latino Americano de Polímeros (SLAP) y XII Congresso Ibero Americano de Polímeros (CIP). 12-16 de octubre de 2014, Porto de Galinhas, Brazil. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.

“Modelado de la Producción de Poli(hidroxiálcanoato)s a partir de Almidón como Fuente de Carbono”. Mauricio A. Porras, Fernando D. Ramos, M. S. Díaz, María Amelia Cubitto, Marcelo A. Villar. X Simposio Argentino de Polímeros (SAP). 20-23 de octubre de 2015, Ciudad de Santa Fe, Argentina. Trabajo aceptado para modalidad de presentación póster.