

## Universidad Nacional de General San Martín Escuela de Ciencia y Tecnología Doctorado en Ciencias aplicadas y de la Ingeniería



Producción escalable del biopolímero polihidroxibutirato a partir de *Cupriavidus necator* ATCC 17697

Scalable production of polyhydroxybutyrate biopolymer

from Cupriavidus necator ATCC 17697

Tesis presentada para obtener el título de Doctor de la Universidad Nacional de General San Martín en el área de Ciencias Aplicadas y de la Ingeniería

Lic. Daiana Nygaard

Directora: Dra. Elida Hermida Codirectora: Dra. Oxana Yashchuk

**M**arzo 2019

Universidad Nacional de General San Martín

Escuela de Ciencia y Tecnología

Doctorado en Ciencias Aplicadas y de la Ingeniería

Producción escalable de biopolímero polihidroxibutirato a partir de *Cupriavidus necator* ATCC 17697

Scalable production of polyhydroxybutyrate biopolymer from Cupriavidus necator ATCC 17697

Tesis presentada para obtener el título de Doctor de la Universidad Nacional de General San Martín en el área de Ciencias Aplicadas y de la Ingeniería

Lic. Daiana Nygaard

Directora: Dra. Elida Hermida

Codirectora: Dra. Oxana Yashchuk

Marzo 2019

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Biomateriales, Biomecánica y Bioinstrumentación (Lab3Bio)

Labo Cluster

Escuela de Ciencia y Tecnología (ECyT)

Universidad Nacional de General San Martin (UNSAM)

Fuentes de financiamiento:

Empretecno 0037/2012

PIP 083

### Agradecimientos

A la Dra. Élida Hermida por dirigir esta tesis doctoral, y por todo el conocimiento y ayuda que me aportó durante estos años de formación académica. Por todos los buenos momentos y almuerzos que promovió, para unificarnos y fortalecer la unión entre las distintas y variadas disciplinas que conformamos en nuestro grupo y con participantes de otros grupos de investigación. A la Dra. Oxana Yaschuck por haberme dirigido día a día a través de estos cinco años, por acompañarme en cada paso de formación de esta carrera, por haberme transmitido todos los conocimientos científicos que me fueron necesarios, por haberme guiado en un clima agradable y sobre todo por ser una gran compañera y amiga a lo largo de este doctorado. A ambas, por facilitarme las herramientas y enseñarme a ser científica.

A mis compañeros de laboratorio que me ayudaron con ensayos y muchas veces en la comprensión de resultados en sus áreas específicas en química, biología, procesamiento de imágenes, etc.: Nacho, Bea, Mer, Ana, Anita, Mauro, Mauricio y a los estudiantes de Ing. Biomédica: Melina, Tomás y Camila. A todos, por los buenos momentos compartidos y por hacer del laboratorio un ambiente amigable. A Cynthia y Silvina por su presencia en la puerta y en las cosas que necesitábamos.

Al Dr. Jorge Magallanes por todo lo que me enseñó de los diseños de experimentos y a la Dra. Nora Schicci, por toda la ayuda incondicional en el procesamiento de los datos.

A toda la gente del 3IA, especialmente con los grupos de Curutchet y Candal, por el hermoso clima de trabajo que me brindaron en los primeros años del doctorado y por abrirme sus puertas para usar de sus equipos y mesadas aun cuando ya no estaba trabajando allí

A toda la gente del IIB por permitirme usar de su equipamiento, especialmente al Dr. Diego Noseda por toda su colaboración en el trabajo de escalado del PHB en biorreactor y a Sole por seguir siendo una gran compañera. Al Ing. Gustavo Erimbaue del Ingenio Concepción y al Dr. Carlos Gusils del Eeaoc de Tucumán por brindarme desinteresadamente melaza caña de azúcar para mi trabajo de investigación.

A mis amigos por apoyarme en los momentos buenos y también en los difíciles. Especialmente a Gabi, por estar en cada momento de mi vida, y aún en este de tanto sacrificio. Y a Cris, por acompañarme en estos últimos 12 años de amistad.

A Dios, en quién creo firmemente, y me ayuda y acompaña en cada etapa de mi vida.

A mi gran familia: a mis padres, que durante toda mi vida me guiaron, apoyaron y ayudaron; a mis hermanos, porque los quiero mucho y la vida no sería igual sin ustedes; a mis suegros, por su compañía, aliento y ayuda incondicional; a mis sobrinos que me llenan de amor; a mis cuñadas y cuñados, especialmente a David, por estar siempre en todo.

A Andrés, mi esposo, mi amor, gracias por tu compañía, ayuda, aliento y amor que me das cada día, que me impulsa a seguir adelante y a sentirme feliz a tu lado. A mis hijas: Jazmín, por ayudarme en todo, por ser tan responsable, una gran compañera y una hija tan obediente y a Tiara, por tu ternura, por tus conclusiones tan sabias desde pequeñita que me hicieron sentir chiquita y por todo tu cariño. A los tres por ser parte de esta familia tan hermosa que me llena de alegría.

## Índice

1.	. Introducción	
	1.1 Polímeros	2
	1.1.1 Los plásticos y el desafío ambiental	2
	1.1.2 Polímeros biodegradables	4
	1.2 Polihidroxialcanoatos: Polímeros versátiles	7
	1.2.1 Estructura general	7
	1.2.2. Diferentes monómeros constituyentes	
	1.2.3 Clasificaciones de los PHAs	9
	1.3 Propiedades de los PHAs	9
	1.3.1 Propiedades físico-químicas	9
	1.3.2 Biodegradabilidad por microorganismos	
	1.3.3 Biodegradabilidad y biocompatibilidad	
	1.4 Aplicaciones industriales de los PHAs	
	1.4.1 PHAs en envases y embalajes	
	1.4.2 PHAs en las industrias agrícola y textil	15
	1.4.3 Los PHAs como nueva fuente de biocombustibles	15
	1.4.4 PHAs en las industrias biomédica y farmacéutica	15
	1.4.5 Los PHAs como material de impresión tridimensional	
	1.4.6 PHAs como posibles materiales inteligentes	
	1.5 Síntesis y acumulación de PHAs en gránulos intracitoplasmáticos	
	1.5.1 Vías biosintéticas	
	1.5.2 Enzimas involucradas	
	1.5.3 Modelos de formación de gránulos	
	1.6 Producción biotecnológica de PHAs	
	1.6.1 Producción industrial	
	1.6.2 Microorganismos utilizados para la producción de PHAs	
	1.6.3 Estrategias fermentativas	
	1.6.4 Producción sostenible de PHAs	
	1.7 Referencias	
2.	. Antecedentes	
	2.1 Características de Cupriavidus necator	

	2.1.1 Nomenclatura de <i>C. necator</i>	32
	2.1.2 Características morfológicas y fisiológicas del género Cupriavidus	33
	2.1.3 Organismo modelo como productor de PHAs	33
	2.2 Parámetros del crecimiento de <i>C. necator</i>	34
	2.2.1 Estequiometría de producción	34
	2.2.2 Rendimientos de producción de biomasa y PHA	34
	2.2.3 Cinética de crecimiento	36
	2.3 Optimización de la producción de PHAs	37
	2.3.1 Diseño de experimentos	37
	2.3.2 Fermentaciones <i>batch</i>	38
	2.3.3 Fermentaciones <i>fed batch</i>	47
	2.3.4 Fermentaciones continuas	50
	2.4 Objetivos	51
	2.5 Referencias	52
3	. Materiales y Métodos	62
	3.1 Fermentación de <i>C. necator</i>	63
	3.1.1 Mantenimiento de la cepa	63
	3.1.2 Preparación del inóculo	63
	3.1.3 Fermentación en Erlenmeyer	63
	3.1.5 Fermentación en biorreactor	64
	3.2 Determinaciones cuantitativas	65
	3.2.1 De biomasa mediante gravimetría	65
	3.2.2 De biomasa mediante densidad óptica	65
	3.2.3 Cuali-cuantitativa de PHB	66
	3.2.4 Cuantitativa de PHB	68
	3.2.5 Consumo de sustratos	69
	3.3 Diseño experimental estadístico	70
	3.3.1 Diseño Doehlert	70
	3.3.2 Diseño factorial	71
	3.3.3 RSM	73
	3.3.4 Validación	74
	3.3.5 Cálculo de rendimientos y productividades de los puntos experimentales del dise	eño 74
	3.4 Extracción, purificación y caracterización del polímero obtenido	75

	3.4.1 Separación	75
	3.4.2 Extracción	75
	3.4.3 Purificación	75
	3.4.4 Caracterización físico - química	76
	3.5 Membranas de PHB	77
	3.5.1 Elaboración	77
	3.5.2 Respuesta mecánica	77
	3.5.3 Citotoxicidad	77
	3.6 Producción y degradación intracelular de PHB	77
	3.6.1 Estrategias de cultivo	77
	3.6.2 Procesamiento de imágenes MET	78
	3. 7 Referencias	79
4.	. Resultados y Discusión	80
	4.1 Perfil típico del cultivo de <i>C. necator</i> ATCC 17697	
	4.1.1 Referencias	84
	4.2 Producción de PHB en Erlenmeyer	85
	4.2.1 Análisis y optimización del inóculo - diseño Dohelert	85
	4.2.2 Evaluación y optimización del medio del cultivo - FFD y RSM	87
	4.2.3 Validación	90
	4.2.4 Análisis de rendimientos y productividades	91
	4.2.5 Progreso de la producción de PHB	94
	4.2.6 Cinética de la producción de PHB en medio optimizado	95
	4.2.7 Referencias	96
	4.3 Producción de PHB en biorreactor de laboratorio	
	4.3.1 Fermentaciones <i>batch</i>	98
	4.3.2 Fermentaciones <i>fedbatch</i>	113
	4.3.4 Cinética y productividad de fermentaciones batch y fedbatch	120
	4.3.5 Referencias	126
	4.4 Caracterización del biopolímero sintetizado	
	4.4.1 Extracción y purificación del biopolímero	
	4.4.2 Caracterización físico-química del biopolímero	128
	4.4.3 Elaboración y caracterización de membranas de PHB	
	4.4.4 Ensayos de citotoxicidad	134
	4.4.5 Referencias	

4.5 Estudio de la producción y degradación intracelular de PHB137				
4.5.1 Análisis del perfil de producción y degradación137				
4.5.2 Análisis de micrografías MET140				
4.5.3 Referencias150				
4.6 Fuentes de carbono alternativas151				
4.6.1 Glicerol				
4.6.2 Melaza				
4.6.3 Yerba mate				
4.6.4 Melaza y yerba mate				
4.6.5 Otras fuentes de carbono alternativas157				
4.6.6 Caracterización química159				
4.6.7 Referencias160				
5. Conclusiones161				
Anexo				
Presentaciones a Congresos surgidas del trabajo de tesis				
Publicación surgida del trabajo de tesis				
Resumen				

## Abreviaturas

PHA	Polihidroxialcanoato
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
PHA otros	Ver tabla 1.2.1
PHA <sub>SCL</sub>	PHAs de cadena corta, de 3 hasta 5 átomos de carbono
PHA <sub>MCL</sub>	PHAs de cadena media, de 6 hasta 14 átomos de carbono
PHALCL	PHAs de cadena larga, de más de 14 átomos de carbono
PLA	Poliláctico
PGA	Ácido poliglicólico
PCL	Policaprolactona
PEO	Óxido de polietileno
Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
PP	Polipropileno
PhaC	PHA sintasa
PhaA	b-Ketotiolasa
PhaB	acetoacetil-CoA reductasa
PhaJ	(R)-enoyl-CoA hidratasa
PhaG	3-hidroxiacyl-ACP-CoA transferasa
PhaC	PHA sintasa
PhaZ	PHA depolimerasa

PhaP	Proteína de fase
C. necator	Cupriavidus necator
х	Biomasa
Р	Producto = PHB
Ррнв	Productividad volumétrica de PHB
R	Biomasa residual
S	Sustrato
Y <sub>X/S</sub>	Rendimiento de biomasa en función de sustrato
Y <sub>P/S</sub>	Rendimiento de producto en función de sustrato
Y <sub>P/X</sub>	Rendimiento de producto en función de biomasa
μ	Velocidad específica de crecimiento microbiano
t	Tiempo
h	Hora(s)
D	Tasa de dilución
Atm	Atmósferas
AN	Agar nutritivo
TFL	Medio de cultivo Triptona, fructosa y levadura
rpm	Revoluciones por minuto
SYM	Infusion de yerba mate
F	Flujo de alimentación
UV	Ultravioleta
DO	Densidad óptica
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
тос	Carbono orgánico total

FD	Factor de dilución
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
FFD	"Full Factorial Design" Diseño factorial completo
3D	Tres dimensiones
DSC	Differential Scanning Calorimetry= Calorimetría diferencial de barrido
Хс	Cristalinidad
Hm	Entalpía de fusión aparente
H <sup>0</sup> m	Valor teórico de la entalpía de fusión termodinámica
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy = Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
ATR	Attenuated Total Reflectance = Reflectancia total atenuada
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

# 1. Introducción

## 1.1 Polímeros

Los **polímeros** (del griego: πολυς [polys] "mucho" y μερος [meros] "parte" o "segmento") son macromoléculas formadas por la unión mediante enlaces covalentes de una o más unidades simples llamadas monómeros. Se subdividen en biopolímeros y polímeros sintéticos según su origen. Cada una de estas clases de compuestos puede subdividirse a su vez en categorías más específicas en relación a su origen o características físico-químicas. Por ejemplo, los plásticos o polímeros termoplásticos son polímeros que pueden termoformarse mientras que aquellos que no sufren ablandamiento por temperatura son los termoestables o termorrígidos.

A partir de su origen se clasifican en petroquímicos —aquellos sintetizados a partir de derivados del petróleo— y bioplásticos o ecoplásticos —aquellos provenientes de fuentes de carbono renovables (1). Aquellos bioplásticos que pueden ser degradados por microorganismos, convirtiéndolos en pequeñas moléculas que forman parte de los ciclos de la vida (agua, dióxido de carbono, metano) se denominan biodegradables.

#### 1.1.1 Los plásticos y el desafío ambiental

Los productos plásticos tienen cualidades muy versátiles entre las que se destacan su durabilidad y resistencia a la degradación, por lo que tienen un uso extendido en la manufactura de una amplia variedad de productos, los cuales resultan imprescindibles para el estilo de vida actual (2). Estos productos son parte esencial de todas las industrias y en muchos casos han reemplazado el uso de vidrio y papel como materiales de empaque. El consumo anual de polímeros basados en petroquímicos en 1950 fue de 5 millones de toneladas (3), mientras que en 2011, ascendió a 280 millones de toneladas. Para el 2050 se estima que aumente a alrededor de 810 millones de toneladas (4).

El creciente consumo de productos plásticos de origen petroquímico constituye un serio problema para el ambiente por ser no biodegradables y por provenir, en un 99%, de un recurso natural no renovable. Su uso extensivo genera desechos que se acumulan en el ambiente a una tasa de 25 millones de toneladas al año, 40% de las cuales son dispuestas en rellenos sanitarios (Figuras 1.1.1 y 1.1.2), mientras que cientos de miles de toneladas son arrojadas a ambientes marinos

(Figura 1.1.3). Este hecho ocasiona graves problemas, entre los que destacan el requerimiento de grandes espacios para su disposición, contaminación visual (Figura 1.1.3) y muerte de animales que los ingieren accidentalmente, entre otros (3).

Por ejemplo, el espacio disponible para enterrar la basura proveniente de la Ciudad de Buenos Aires y de los 42 municipios del Gran Buenos Aires está cerca de agotarse: ya se empezó a usar el último el relleno sanitario de José León Suárez que la empresa la empresa de la gestión integral de los residuos solido urbanos, CEAMSE, tiene disponible. "El predio de CEAMSE de José León Suárez, que se abrió en 1979, ocupa 500 hectáreas y estiman que su capacidad se agotará en 2023" (5) (Figuras 1.1.1 y 1.1.2).



Figura 1.1.1. CEAMSE: Foto del basural de José León Suárez (5).



Figura 1.1.2: Fotos satelitales que muestran el creciente tamaño del relleno sanitario CEAMSE de José León Suárez (mancha blanca) desde 1984 (a) hasta 2016 (b) (6).



Figura 1.1.3: Basura Marina: (a) Toma de muestra de microplásticos, (b), (c) y (d) plásticos que afectan a la fauna marina (7).

La contaminación por la acumulación de plásticos es un problema ambiental, político y social del que todos somos partícipes. El mayor impacto de la contaminación visual en nuestro país, podemos observarlo en lugares históricamente icónicos del turismo nacional, como por ejemplo en la ciudad de Bariloche, donde podemos observar montañas de bolsas plásticas, que opacan el paisaje de las montañas naturales. (Figura 1.1.4)



Figura 1.1.4: "Desde el cerro no se ve" Fotografía capturada por Tonny Romano en el basural de Bariloche, premiada en Rusia. Reproducción con permiso del autor (8).

Al mismo tiempo que se acumulan en el ambiente los productos plásticos, su materia prima, el petróleo, se encarece y agota rápidamente. Estos desafiantes problemas asociados con los derivados del petróleo son factores motivadores para la investigación de polímeros que puedan obtenerse a partir de fuentes renovables y formar parte de los ciclos de la naturaleza una vez finalizada su vida útil (4).

## 1.1.2 Polímeros biodegradables

Los polímeros biodegradables, son materiales susceptibles de ser atacados y consumidos por microorganismos o enzimas. Durante este proceso, conocido como biodegradación, se modifican sustancialmente las propiedades físicas y la microestructura. Los microorganismos aerobios producen CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O como consecuencia de la respiración celular. La biodegradación de la materia orgánica

del suelo genera residuos de humus, un compuesto relativamente estable de materiales orgánicos coloidales con alto contenido de carbono (1).

Los plásticos biodegradables han visto la luz con el fin de evitar los problemas ambientales generados por el uso desbordado de plásticos de origen petroquímico (9). Solo se puede encontrar un fuerte apoyo político en Italia y Francia para soluciones biodegradables en el sector del embalaje. En este sector, la demanda mundial de envases biodegradables sigue mostrando un crecimiento de dos dígitos. La demanda adicional podría provenir del problema del problema del plástico y microplástico introducidos en el mar, conformando una parte importante de la basura marina (Fig. 1.1.3), pero hasta ahora los plásticos biodegradables no se han beneficiado de este debate (10).

Un ejemplo notorio sobre el reemplazo de plásticos petroquímicos por polímeros biodegradables para la fabricación de productos de uso cotidiano lo ofrece la compañía Novamont (Novara, Italia). Novamont está produciendo actualmente 35.000 toneladas al año (t/a) de un biopolímero denominado Mater-Bi (11), cuyo componente mayoritario es el almidón y contiene, además, una serie de termoplásticos convencionales y termoplásticos biodegradables (Figura 1.1.5). El Mater-Bi ya está siendo utilizado por empresas como Good Year y Johnson & Johnson, para fabricar cubiertas e hisopos de algodón biodegradables. Además, se lo utiliza en la industria de empaque y embalajes (*packaging*) por ejemplo, para elaborar bolsas de supermercado y material de empaque, y para descartables, como para cubertería de comida rápida (*fast food*) (12).



Figura 1.1.5: Material comercial Mater-BI, (a) en gránulos y (b) utilizado en bolsas de supermercado biodegradables (11).

Los polímeros biodegradables son de muchos tipos y pueden clasificarse, según su origen, dentro de tres categorías principales:

- 1. Polímeros naturales: como la celulosa, el almidón y las proteínas.
- Polímeros sintetizados por microorganismos: se sintetizan biotecnológicamente con bacterias, como los polihidroxialcanoatos (PHAs).
- Polímeros sintéticos: los más prometedores son los poliésteres alifáticos como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), la policaprolactona (PCL), o el óxido de polietileno (PEO) entre otros.

Todos estos tipos de polímeros tienen aplicaciones económicas interesantes y se han comercializado por empresas para determinadas aplicaciones industriales, algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.1.6.

	PRODUCTO	COMPAÑIA	CONSTITUYENTES			
1.	Basado en produc	Basado en productos naturales				
	AMIPOL <sup>®</sup>	Japan Cornstarch	Almidón (100%)			
	<b>BIOFIL®</b>	Samyang Genex Co.	Almidón, poliestireno			
	GREENPOL®	Yukong Ltd.	Almidón, policaprolactona			
	MATER-BI®	Novamont	Almidón (60%), alcohol polivinílico			
	NOVON <sup>®</sup>	Chisso Warner Lanbert	Almidón (90-95%), aditivos			
2.	Producido por mic	roorganismos				
	<b>BIOPOL®</b>	Monsanto Co.	Poli(hidroxibutirato), poli(hidroxivalerato)			
3.	De naturaleza sintética					
	BAK1095® BAK2195®	Bayer Bayer	Ácido adípico, ε-caprolactama, butanodiol Ácido adípico, hexametilendiamina, butanodiol, etilenglicol			
	BIONOLLE®	Showa Highpolymer Co.	Ácido adípico, ácido succínico, etilenglicol, butanodiol			
	<b>DEXON®</b>	Davis & Geck, Inc.	Poliglicólico			
	MONOCRYL <sup>®</sup>	Ethicon, Inc.	Policaprolactona/poliglicólico			
	PDS <sup>®</sup>	Ethicon, Inc.	Poli(p-dioxanona)			
	PLA	Cargill Shimadzu	Poliláctico			
	<b>ELVANOL®</b>	DuPont	Alcohol polivinílico			
	<b>VICRYL®</b>	Ethicon, Inc.	Poliláctico/poliglicólico			

Figura 1.1.6: Polímeros	biodegradables comerciales	(13).
-------------------------	----------------------------	-------

Una familia de plásticos biodegradables que ha cobrado importancia económica en los últimos años son los polihidroxialcanoatos (PHAs). En comparación con otros polímeros biodegradables, los PHAs son mucho más versátiles (14,15). La primera comercialización de los PHAs la realizó la empresa ZENECA Bio Product (ICI) como envase, bajo el nombre comercial Biopol® (Figura 1.1.7), en 1985 (16). A pesar que el precio de producción de los PHAs es alto (2 a 5 euros/ kg) comparado con los de los plásticos de origen petroquímico (US \$ 1/kg), la comercialización exitosa de PHA se ha hecho evidente. Este bioplástico se mercantilizó bajo varias marcas comerciales como Biomers, Mirel, Biogreens, Biocycles, Biopor, Tianan y Metabolix (17). Según datos aportados por el último informe publicado por el instituto alemán Nova, sobre las capacidades y tendencias globales de los polímeros en el período 2016-2021, la producción mundial de PHAs en el 2016 se estimó en 65.600 toneladas y se prevé que aumente a más de 300.000 toneladas para el año 2021 (10).



Figura 1.1.7:Envases Biopol de PHBV (a) Distintos tipos de envases y desechables biodegradables elaborados con Biopol® (b) Progreso de la degradación de envases y desechables de Biopol en 45 días (18).

La ascendente comercialización de los PHAs se debe a la excelente combinación de sus atributos, la naturaleza de los PHAs que combina las propiedades de polímeros termomoldeables, biodegradables y biocompatibles permite el diseño de productos para diversas aplicaciones (19–23).

## 1.2 Polihidroxialcanoatos: Polímeros versátiles

### 1.2.1 Estructura general

Los polihidroxialcanoatos (PHAs), como indica su nombre, son polímeros de ácidos hidroxialcanóicos, cuya estructura química general se ilustra en la Figura 1.2.1, sintetizados y degradados por una amplia variedad de microorganismos.



Figura 1.2.1: Estructura general de los PHAs (24).

R es un grupo lateral n-alquilo de longitud de cadena variable, m varía entre 1 y 4. n, que indica la cantidad de monómeros constituyentes, varía entre 600 y 3500. Debido a los diferentes R, n y m, el peso molecular de los PHAs es variable: no suele ser inferior a 2.10<sup>5</sup> Da y puede ascender hasta 3.10<sup>6</sup> Da, dependiendo del tipo del microorganismo y de las condiciones del cultivo (14).

La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster de allí que también se les conozca como biopoliésteres (14).

#### 1.2.2. Diferentes monómeros constituyentes

Hasta el momento se han descubierto más de 150 diferentes unidades monoméricas como constituyentes de los PHA (25–27). En la tabla 1.2.1 se muestran algunos ejemplos de la variedad de monómeros que se pueden presentar en un PHA.

Símbolo	Nombre del monómero	Tamaño de la cadena	m
		(# de carbonos)	
3HP	Ácido 3-hidroxi-propiónico	3	1
3HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	4	1
3HV	Ácido 3-hidroxi-valérico	5	1
3HHx	Ácido 3-hidroxi-hexanoico	6	1
3HHp	Ácido 3-hidroxi-heptanoico	7	1
3HO	Ácido 3-hidroxi-octanoico	8	1
3HN	Ácido 3-hidroxi-nonanoico	9	1
3HD	Ácido 3-hidroxi-decanoico	10	1
3HUD	Ácido 3-hidroxi-undecanoico	11	1
3HDD	Ácido 3-hidroxi-dodecanoico	12	1
3HTD	Ácido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	1
3HHxD	Ácido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	1
4HB	Ácido 4-hidroxi-butírico	4	2
4HV	Ácido 4-hidroxi-valérico	5	2
4HHx	Ácido 4-hidroxi-hexanoico	6	2
4HHp	Ácido 4-hidroxi-heptanoico	7	2
4HO	Ácido 4-hidroxi-octanoico	8	2
4HD	Ácido 4-hidroxi-decanoico	10	2
5HV	Ácido 5-hidroxi-valérico	5	3
5HHx	Ácido 5-hidroxi-hexanoico	6	3
6HDD	Ácido 6-hidroxi-dodecanoico	12	4

Tabla 1.2.1 Principales monómeros que conforman los PHAs producidos por microorganismos (27)

#### 1.2.3 Clasificaciones de los PHAs

Dependiendo de la composición monomérica estos polímeros tendrán diferentes nombres y propiedades. Pueden clasificarse en homopolímeros, si están compuestos por un solo tipo de monómero en cuyo caso el nombre estará dado por el prefijo "Poli", y luego entre paréntesis el nombre del monómero constituyente. Por ejemplo, el PHB o P3HB es el poli(3hidroxibutirato), compuesto por monómeros de ácido 3hidroxibutírico. Si están compuestos por más de un monómero son heteropolímeros; para nombrarlos, se notan los nombres de los monómeros entre paréntesis unidos por el prefijo "co". Por ejemplo, el copolímero es Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) se denota P(3HB-co-3HV) o más sintéticamente PHBV.

También se clasifican según el número de átomos de carbono de la cadena monomérica lateral (Fig. 1.2.2), en tres grupos principales: PHA<sub>SCL</sub> (PHAs de cadena corta, de 3 hasta 5 átomos de carbono); PHA<sub>MCL</sub> (PHAs de cadena media, de 6 hasta 14 átomos de carbono); PHA<sub>LCL</sub> (PHAs de cadena larga, de más de 14 átomos de carbono) (28).



Figura 1.2.2: Clasificación de los PHAs según su composición monomérica.

### 1.3 Propiedades de los PHAs

#### 1.3.1 Propiedades físico-químicas

Desde que los PHAs se descubrieron por primera vez por Lemoigne en 1926 (29), los investigadores se han referido a ellos como compuestos de naturaleza lipídica, y han dejado en claro que estos materiales son poliésteres insolubles en

agua. La mayoría de los PHAs son polímeros parcialmente cristalinos y por lo tanto sus propiedades térmicas y mecánicas usualmente se representan en términos de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) o de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) (30). Estos valores se presentan en la Tabla 1.3.1 para diferentes tipos de PHAs.

Polímero	Temperatura de fusión (ºC)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (ºC)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1.5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0.7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1,7	34,5	400	45
Polietileno-teraftalato	226	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	*	21
Nylon- 6,6	265	2,8	83	60	*

Tabla 1.3.1 Propiedades físicas y mecánicas diferentes PHAs, dependiendo de su composición monomérica y su comparación con las de los plásticos petroquímicos (31)

\* información no disponible

El P3HB, comúnmente llamado PHB, es una hélice levógira compacta, ópticamente activa con el centro quiral de la unidad monomérica en la configuración R; esta estructura es muy similar al polipropileno (PP). Las propiedades mecánicas como módulo de Young y la fuerza tensil de estos biopolímeros también están cercanas a las del PP (Anderson y Dawes 1990).

Los PHAs de cadena corta son típicamente polímeros termoplásticos, que pueden ser moldeables arriba de sus puntos de fusión. La temperatura de fusión es relativamente alta (180 °C) y su temperatura de transición vítrea está entre – 5 y 20 °C. Este tipo de PHA comúnmente exhibe un grado de cristalinidad de 60 a 80 %, el cual disminuye a 30 y 40 % a medida que el contenido de 3HV se incrementa (puede llegar a 30 mol %). La incorporación de 3HV en el polímero también provoca que tanto la T<sub>m</sub> como la T<sub>g</sub> disminuyan significativamente, por lo

que los copolímeros de cadena corta son materiales más versátiles que el homopolímero (30).

En cuanto a los PHAs de cadena media, son altamente amorfos con una  $T_g$  de entre –62 y –26 °C y  $T_m$  de 42 a 58 °C, por lo cual se clasifican como elastómeros (con respuesta mecánica elástica similar a la de la goma natural).

En comparación con otros biopolímeros, los PHAs tienen una diversidad mucho mayor de monómeros, con más de 150 variaciones estructurales reportadas (32), con diferentes tipos de combinaciones, dándole a los PHAs propiedades termomecánicas que van desde la rigidez del PP hasta la elasticidad de la goma natural (33). Además, en los PHAs se pueden introducir grupos funcionales (34), que convierten a los PHAs en materiales con propiedades controlables (en la jerga, *tuneables*), a la medida de la aplicación deseada y con un sinfín de alternativas biodegradables para diversos polímeros de origen petroquímico (21).

#### 1.3.2 Biodegradabilidad por microorganismos

La biodegradación se define como la fragmentación o descomposición de materiales por la acción de bacterias, hongos u otros medios biológicos, ya sea aeróbica o anaeróbicamente, hasta convertirse en pequeñas moléculas que formen parte de ciclos de la naturaleza (H<sub>2</sub>O, CO2, CH<sub>4</sub>) y biomasa. En resumen, los polímeros biodegradables son polímeros que se degradan en entornos biológicos mediante hidrólisis enzimática y no enzimática y no mediante oxidación térmica, fotólisis o radiolisis (35,36). La capacidad del PHA de degradarse naturalmente en suelo, compost, agua salada y dulce, lo ha convertido en un material prometedor e interesante para muchas aplicaciones. La degradación de PHA generalmente es llevada a cabo por microorganismos que producen depolimerasas de PHA intracelulares o extracelulares, según su organización molecular y la especificidad del sustrato (37). La PHA-depolimerasa es una enzima compuesta por un dominio catalítico y un dominio de unión al sustrato. Ambos dominios están conectados por un dominio enlazador. El dominio de unión del sustrato de la enzima se une al material cristalino de PHA. Posteriormente, el dominio catalítico comienza a romper la cadena de polímeros

(38) De esta forma microorganismos como hongos o bacterias pueden hidrolizarel PHA sólido transformándolo en oligómeros y monómeros solubles en agua.

Además de la actividad de la depolimerasa, la tasa de biodegradación también está afectada significativamente por varios factores ambientales como la temperatura, la población microbiana, el suministro de nutrientes, el pH, el nivel de humedad, así como las condiciones de los materiales PHA, incluida la superficie de la PHA, su composición y su cristalinidad (36,39).

#### 1.3.3 Biodegradabilidad y biocompatibilidad

La biocompatibilidad es la característica de un material para no ejercer ningún efecto adverso sobre los organismos vivos, ya sea en el lugar de uso, como en ningún otro órgano o función del cuerpo. Es la condición previa para la elegibilidad de un objeto para ser implantado en el organismo de los seres humanos o los animales (40).

En general, los PHA son biocompatibles con el tejido humano y reabsorbidos a una velocidad que depende de su composición química, la porosidad de la superficie, la forma, el tejido en el que se incorpora, entre otros factores (20). Cuando este material se implanta en el cuerpo se hidroliza en metabolitos compatibles, lo que los hace atractivos para diversas aplicaciones médicas. Dependiendo de los requisitos del uso final, los PHAs pueden mezclarse con otros materiales poliméricos, enzimas o materiales inorgánicos para ajustar aún más las propiedades mecánicas, la cinética de degradación y la biocompatibilidad (41).

Varios PHAs, incluyendo el PHB, el PHBV, el P4HB y el copolímero de 3hidroxibutirato, 3-hidroxanoato (PHBHHX), y poli 3-hidroxihexanoato PHO han sido investigados y demostrado que son biodegradables y biocompatibles (41).

Por otro lado, la biocompatibilidad de los materiales incluye no ejercer efectos carcinogénicos. En este sentido, Peng et al., investigaron el impacto del crecimiento y desarrollo rápido de células carcinogénicas en las matrices de PHA. Se encontró que los osteoblastos proliferantes de ratas cultivados en diferentes PHA: PHB, PHBV, P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-3HHx) así como P(3HB-co-3HV-co-3HHx) no causaron inducción de cáncer. Este estudio mostró

que tales PHAs podrían ser explotados para apoyar el crecimiento celular sin signos de vulnerabilidad a la formación de tumores (42).

La sinergia entre la alta biocompatibilidad de estos materiales microbianos, la extraordinaria adaptabilidad de sus propiedades mecánicas, y el conocimiento emergente de nuevas técnicas para procesar el PHA en dispositivos hechos a medida, hace muy probable que estos biopolímeros multifacéticos puedan llegar a ser ampliamente aceptados e implementados para tratar diversas enfermedades y lesiones en un futuro no muy lejano. Sin embargo, aún queda mucho trabajo de I+D por hacer para diseñar y evaluar la formulación óptima basada en PHA para aplicaciones definidas en este campo en constante crecimiento (20). Todo esto impulsa las investigaciones en este tema. En primer lugar, es necesario dedicar esfuerzos adicionales para que la producción de PHA sea económicamente más atractiva; esto incluye la selección de sustratos de fermentación baratos y la optimización de los regímenes de cultivo con el fin de aumentar la productividad.

## 1.4 Aplicaciones industriales de los PHAs

Ciertos tipos de PHAs tienen aplicaciones de "alto volumen, bajo precio" como por ejemplo la producción de envases, embalajes y desechables biodegradables, mientas que otras aplicaciones específicas de "bajo volumen, alto precio" como, por ejemplo, en campos médicos o farmacéuticos (43). Las aplicaciones de los PHAs, ilustradas en la Fig. 1.4.1, incluyen las industrias de envases, embalajes y descartables, medicina, farmacia, agricultura y textil, o como materias primas para la síntesis de nuevos biocombustibles y también se ha abierto la puerta como materiales inteligentes, entre otras (21,31).



Figura 1.4.1: Aplicaciones de los PHAs: en envases, embalajes y descartables, en Industrias textil y agrícola, como nuevos biocombustibles y materiales inteligentes, en biomédica y farmacéutica y en impresión tridimensional.

#### 1.4.1 PHAs en envases y embalajes

Desde su descubrimiento (29), los PHAs se han hecho famosos durante muchos años como bioplásticos amigables con el medio ambiente y su demanda se está expandiendo rápidamente como posible sustituto de los polímeros de origen petroquímico

Las propiedades de los PHAs son a menudo muy similares a las de los plásticos tradicionales a base de petróleo, como ya se ha mencionado, y poseen otras excelentes propiedades como la hidrofobia, las propiedades de barrera al gas y la no toxicidad, lo que los hace más atractivos que los plásticos tradicionales cuando se utilizan para el envasado y los bienes de consumo desechables (21), especialmente para el envasado de alimentos y los consumibles (32). También es posible usarlos en la forma de látex acuoso para cubierta de materiales fibrosos como papel o cartón. Debido a su resistencia al agua, ésta cubierta protege al papel o cartón contra el deterioro causado por la humedad. (31).

En el caso del PHB, que es un termoplástico con propiedades similares al polipropileno, se usa principalmente para técnicas de moldeado. En cambio, el

PHBV tiene aplicaciones como material de empaque. La aplicación más conocida de estos biopolímeros de cadena corta es para la fabricación de botellas desechables para champú, contenedores para productos alimenticios, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos (30).

#### 1.4.2 PHAs en las industrias agrícola y textil

Los PHAs también se desarrollan como películas agrícolas, fibras e incluso textiles de alta calidad, como los que ha fabricado Ningbo Tianan Biologic Material en China (23). En cuanto a las aplicaciones de los PHA en la agricultura, éstas consisten en macetas biodegradables, tubos de irrigación y matrices para la liberación controlada de factores de crecimiento, pesticidas y herbicidas. Una ventaja en este campo de aplicación es que no se requiere un grado de purificación del polímero muy alto, lo cual puede facilitar el proceso de extracción y hacerlo más económico (31).

#### 1.4.3 Los PHAs como nueva fuente de biocombustibles

PHAs como PHB y PHA<sub>MCL</sub> pueden convertirse en 3-hidroxibutirato de metilo (3HBME) y 3-hidroxialcanoato de metilo (3HAME), por la esterificación metílica de sus monómeros. 3HBME y 3HAME tienen una capacidad energética de 20 y 30 kJ/g, respectivamente, valores que resultan comparables con los 27 kJ/g del etanol. Cuando se complementa al etanol con un 10% de 3HBME o 3HAME, el calor de combustión del etanol aumenta a 30 y 35 kJ/g, respectivamente (44). Por lo tanto, se pueden utilizar ésteres metílicos de PHA directamente como biocombustibles o mezclados con otros combustibles (21).

#### 1.4.4 PHAs en las industrias biomédica y farmacéutica

Diversos PHAs han sido empleados para diseñar implantes in vivo como suturas y válvulas para la reparación directa de tejidos, así como en dispositivos de regeneración de nervios, como sustitutos de injertos óseos, así como parches cardiovasculares, etc. Además, han surgido como candidatos atractivos para ser utilizados desarrollar sistemas de administración de fármacos y hormonas. En este sentido, macropartículas y nano partículas de PHAs funcionan como vehículo de otras moléculas para ser administrados en un lugar específico de

forma controlable y, por lo tanto, ampliar la ventana terapéutica con menos efectos secundarios (24).

Los monómeros de PHA y sus ésteres metílicos también prometen ser usados directamente como drogas, ya sea como medicamentos o intermediarios químicos para la enfermedad de Alzheimer, la osteoporosis, la enfermedad de Parkinson e incluso para mejorar la memoria (21).

Sin embargo, aún quedan por resolver cuestiones relacionadas con la pureza, las propiedades mecánicas, la biodegradabilidad, dependiendo de las aplicaciones (19).

#### 1.4.5 Los PHAs como material de impresión tridimensional

La tecnología de impresión tridimensional (3D) ha aumentado rápidamente en las últimas décadas, y muchos productos que van desde consumibles, dispositivos, moldes e ilustraciones han sido impresos mediante técnicas de impresión capa sobre capa. Aplicaciones de la impresión 3D en la ingeniería de tejidos, también llamada bioimpresión, ha generado muchos implantes biomédicos como hueso, tejido, vasos sanguíneos, etc. (45). Los PHAs también tienen potencial para ser utilizados en la impresión 3D, ya que pueden tolerar temperaturas más altas en comparación con el PLA (46), y debido a la no toxicidad y la biocompatibilidad, pueden utilizarse para dispositivos o implantes que tienen contacto cercano con la piel. ColorFabb, una famosa compañía que se centra en el desarrollo de material de impresión tridimensional, ha desarrollado materiales de mezcla de PHA con aditivos, para generar varios filamentos y partículas de impresión tridimensionales (47). Las aplicaciones en la impresión 3D abren un nuevo campo para los PHAs.

#### 1.4.6 PHAs como posibles materiales inteligentes

Los PHAs también tienen un gran potencial para ser desarrolladas como un material inteligente que puede responder a estímulos externos como la temperatura, el pH, la luz, etc., para cambiar sus propiedades estructurales y funcionales (48). Debido a la diversidad de sus estructuras, funcionalizar PHAs con grupos con enlaces dobles o triples, grupos epoxi, carbonilo, ciano, fenilo o halógenos, permite modificaciones químicas tales como injertar en las cadenas laterales moléculas pequeñas o macromoléculas capaces de responder a

estímulos externos (49). El control de la microestructura del polímero conocido como "Smart PHA" o "PHAs inteligentes" se prevé lograr en un futuro cercano (21).

#### acumulación de 1.5 **Síntesis** PHAs gránulos V en intracitoplasmáticos

#### 1.5.1 Vías biosintéticas

Los PHAs son sintetizados por microrganismos en condiciones de exceso de carbono y limitación de algún nutriente (N, S, P, O); actúan como reservas de carbono y energía. En total, se han reportado 14 vías para la biosíntesis de PHA (49) (Fig. 1.5.1).



Current Opinion in Biotechnology

Figura 1.5.1: 14 vías han sido reportadas para la biosíntesis de PHA (21). Las vías I, II y III son vías comunes para la síntesis intracelular de PHA. También existen otras vías poco comunes, así como vías de ingeniería de sustratos relacionados o intermediarios metabólicos (vías V a XIV).

Las vías naturales de síntesis de PHA incluyen las siguientes tres: la vía l, comúnmente encontrada en Ralstonia eutropha, parte del azúcar, que se convierte en acetil-coenzima A (CoA), acetoacetil-CoA, y luego 3-hidroxibutiril-CoA, que entra en el proceso de polimerización para formar polihidroxibutirato (PHB) (50). La vía II se encuentra generalmente en *Pseudomonas putida* y *Aeromonas hydrophila*; comienza con ácidos grasos como sustrato para entrar en el ciclo de b-oxidación, lo que conduce a la formación de monómeros de R-3-hidroxiacyl-CoA, principalmente para la síntesis de PHA<sub>MCL</sub> (51); y la vía III, también presente en *Pseudomonas spp.*, dirige el acetilo-CoA a malonil-CoA, que entra en una nueva vía sintética de ácidos grasos, para formar 3-ketoacil-(proteína portadora de acilo) (3-cetoacil-ACP) para la síntesis de monómeros de R-3-hidroxiacyl-CoA. Mientras tanto, hay otros caminos poco comunes, así como caminos de ingeniería para sustratos o intermediarios metabólicos relacionados que conducen a PHAs (vías V a XIV) (21).

#### 1.5.2 Enzimas involucradas

Muchas enzimas están implicadas en la síntesis y el metabolismo de PHA. Las enzimas b-Ketotiolasa (PhaA), acetoacetil-CoA reductasa (PhaB), (R)-enoyl-CoA hidratasa (PhaJ), y 3-hidroxiacyl-ACP-CoA transferasa (PhaG) están principalmente implicadas en la formación de precursores de síntesis de PHA. Los gránulos de PHA son una mezcla de poliésteres amorfos intracelulares de PHA rodeados de varias proteínas asociadas a PHA, incluyendo la PHA sintasa (PhaC) que cataliza la polimerización de hidroxiacil-CoA a PHA, la PHA depolimerasa (PhaZ) responsable de la degradación y movilización de PHA, la proteína de fase (PhaP) y el represor (PhaR) responsable de la regulación de la biosíntesis de PHA (52,53). Sin embargo, se siguen encontrando más proteínas asociadas a la superficie de los gránulos de PHA para mediar la síntesis y utilización de PHA (21) (Fig. 1.5.2).



Figura 1.5.2: Gránulos de PHA. Se encuentran rodeados de varias proteínas asociadas a la síntesis y utilización de esas macromoléculas (21).

El PhaC es el elemento más importante ya que determina la composición del PHA. En general, los tipos de PHAs que se forman en las bacterias dependen no sólo del suministro de monómeros, sino también de la especificidad de las PHA-sintasas (PhaC); la baja especificidad de las PhaC permite formación de diversas estructuras de PHA (54).

#### 1.5.3 Modelos de formación de gránulos

Existen dos modelos para la formación de gránulos de PHA, ambos aplicables a PHA<sub>SCL</sub> o PHA<sub>MCL</sub> (Fig.1.5.3). El primero es el "modelo en ciernes" (Fig. 1.5.3 (a)). En la actualidad se lo prefiere porque explica mejor la monocapa de fosfolípidos observada está sustentado contundentes У por datos experimentales. En este escenario, los gránulos nacientes se localizan adyacentes o incluso ligados a la cara interna de la membrana citoplasmática. Su crecimiento determina que la membrana se curve a su alrededor, hasta que se vuelven lo suficientemente grandes como para "desprenderse" llevando consigo parte de la membrana. El segundo modelo (Fig. 1.5.3 b) se conoce como el "modelo micelar"; propone que las propiedades naturalmente anfifílicas del complejo de polímero-sintasa causan agregación de cadenas del polímero en crecimiento. Estas agregaciones crecen con la polimerización continua y comienzan a tomar la forma de una micela esférica/nanopartícula.



Figura 1.5.3: Mecanismos propuestos para la producción de gránulos de PHA (55). (a) El modelo en ciernes, en el cual la síntesis temprana de PHA está asociada con el lado citoplasmático de la membrana. (b) El modelo micelar, en el que la PHA sintasa se dispersa inicialmente dentro del citoplasma.

El polímero hidrofóbico está protegido del citoplasma por los dominios externos hidrófilos de las moléculas de sintasa. Los gránulos nacientes se recubren luego con los gránulos adicionales proteínas y fosfolípidos, y asumen su función final. Este modelo no explica cómo los fosfolípidos se adhieren al gránulo, ya que los gránulos no necesariamente se acercan a la membrana (55,56).

## 1.6 Producción biotecnológica de PHAs

#### 1.6.1 Producción industrial

Una nueva ola de desarrollo de las PHAs se ha iniciado desde la década de 1980, y muchas empresas se han abocado a la investigación y el desarrollo de PHA a gran escala. (21). Por otro lado, cada vez más aplicaciones de los PHAs están bajo estudio intensivo, y en todo el mundo se han establecido más de 20 empresas para comercializar esta familia de materiales (57) (Tabla 1.6.1). Sólo el homopolímero PHB y los copolímeros PHBV, P3HB4HB, y PHBHHx se destacan en el mercado mundial.

Compañía	País	Período	Tipo de PHA	Producción (t/a)	Aplicaciones
ICI	Inglaterra	1980s-1990s	PHBV	300	Material de empaque
Chemical Linz	Austria	1980s	PHB	20-100	Material de empaque,
					liberación de fármacos
BTF	Austria	1980s	PHB	20-100	Material de empaque,
					liberación de fármacos
Biomers	Alemania	1990s-hoy	PHB	*	Material de empaque,
					liberación de fármacos
BASF	Alemania	1980s-2005	PHB, PHBV	Piloto	Mezcla con Ecoflex
Bio-on	Italia	2008-hoy	PHA	10 000	Materia prima
Metabolix	EUA	1980s-hoy	Varios	*	Material de empaque
Tepha	EUA	2005-hoy	Varios	*	Implantes biomédicos
ADM	EUA	2005-hoy	Varios	50 000	Materia prima
P&G	EUA	1980s-2005	Varios	Variable	Material de empaque
Monsanto	EUA	1990s	PHB, PHBV	*	Materia prima
MHG	EUA	2007-hoy	Varios	10 000	Materia prima
Biocycles	Brasil	1990s-hoy	PHB	100	Materia prima
Kaneka	Japón	1990s-hoy	Varios	*	Material de empaque
Mitsubishi	Japón	1990s	PHB	10	Material de empaque
Zhejian Tian An	China	1990s-hoy	P3HBV	2 000	Materia prima
Jiangmen Biotech	China	1990s	PHBcoHHx	*	Materia prima
Yikeman	China	2008-hoy	PHA	3 000	Materia prima
Tianjin Northern	China	1990s	PHB	Piloto	Materia prima
Shantou Lianyi	China	1990s-2005	Varios	Piloto	Materia prima, uso
Biotech					biomédico
Jiangsu Nantian	China	1990s-hoy	PHB	Piloto	Materia prima
Shenzeng O'Biomer	China	2004-hoy	Varios	*	*
Tianjing Green	China	2004-hoy	P3HBco4HB	10 000	Materia prima, material de
Bioscience					empaque
Shijiazhuang	China	2005-hoy	Bajo	*	Bajo investigación
Pharmaceutical		-	investigación		
Shangdong Lukang	China	2005-hoy	Varios	Piloto	Materia prima, uso biomédico

Tabla 1.6.1: Principales compañías productoras de PHA a gran escala (21,
--

\*Información no disponible

#### 1.6.2 Microorganismos utilizados para la producción de PHAs

Los PHAs son producidos por más de 300 especies, principalmente de bacterias, incluidas diversas variedades de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Entre las especies bacterianas que se usan para acumular grandes cantidades de PHAs se encuentran cepas silvestres y recombinantes de *Ralstonia eutropha, Azotobacter sp., Bacillus sp., Pseudomonas sp, Burkholderia sp., Halomonas sp., Haloferax sp., Aeromonas sp., Methylobacterium sp., Thermus thermophilus, Hydrogenophaga pseudoflava, Saccharophagus degradans, Comamonas sp., A. latus* también conocido como *Azohydromonas lata, Rhodobacter sphaeroides, Zobellella denitrificans,* Lodo activado, *Cyanobacteria, Chromobacterium, Erwinia sp.,* recombinant *E. coli.* (59).

#### 1.6.3 Estrategias fermentativas

La producción biotecnológica de PHAs consiste en cultivar mediante una fermentación eficiente los microorganismos que sintetizan y almacenan intracelularmente estos polímeros. Una fermentación es la conversión microbiológica de fuentes de carbono para obtener biomasa y productos de interés industrial. La biomasa es la concentración de microorganismos expresada en gramos de células secas por litro de cultivo (g/l). La cantidad de biomasa obtenida, la cantidad de PHA producida —expresada en gramos de coltivo (g/l)—, el porcentaje de polímero acumulado intracelularmente y la productividad, como la concentración de polímero por hora de fermentación, así como, las proporciones de los monómeros constituyentes dependerán del microorganismo utilizado, del tipo de sustratos con que se alimente al cultivo bacteriano, como así también de las estrategias de fermentación que se realicen.

De este modo, la optimización del medio de fermentación se incluye en el análisis estratégico de la viabilidad de este proceso biotecnológico. Dicha optimización puede llevarse a cabo ya sea cambiando una variable a la vez o variando varios factores al mismo tiempo y examinando sus efectos e interacciones mediante análisis estadísticos. El *diseño estadístico de experimentos* es un enfoque organizado que proporciona información más fiable que los enfoques "de una variable a la vez" para mejorar procesos fermentativos con mayor eficiencia

(60,61). El análisis estadístico de los datos permite visualizar, mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), las interacciones entre las variables experimentales, lo que conduce a la predicción de datos en áreas que no están directamente cubiertas por la experimentación (62,63). Los diseños de experimentos de optimización de producción de PHAs se realizan generalmente en escala de Erlenmeyer y con muchos experimentos simultáneos (2,64). Luego se pasa a escala de fermentador de laboratorio, en la que se debe tener en cuenta la estrategia fermentativa a usar: el cultivo por lotes o *"batch"* en donde se agregan todos los nutrientes al inicio; el cultivo por lote alimentado o *"fedbatch"*, en el que se agrega nutriente durante la fermentación o el cultivo continuo, en el que se agrega nutriente, y se recoge cultivo a una tasa de dilución fija.

Sea cual fuere el microorganismo o la estrategia fermentativa, la producción de PHAs debe ser sostenible para que resulte de interés productivo.

#### 1.6.4 Producción sostenible de PHAs

La producción sostenible de PHAs a mayor escala debe tener en cuenta los "cuatro aspectos fundamentales": económico, ético, ambiental y de ingeniería. Además, la sostenibilidad de la producción de PHA puede cuantificarse mediante herramientas modernas de evaluación del ciclo de vida. Las cuestiones económicas se ven afectadas en gran medida por el modo de producción aplicado, el procesamiento de aguas residuales y, sobre todo, por la selección de materias primas ricas en carbono para la producción de PHA por microorganismos de tipo silvestre inocuos y naturales. A fin de cumplir con los principios éticos, deben utilizarse materias primas que no interfieran con la nutrición humana ni con las cadenas de suministro de alimentos para animales, y que puedan convertirse en materias primas de carbono accesibles mediante métodos sencillos de elaboración previa (65).

En el capítulo siguiente se justificará la selección de la cepa utilizada en este trabajo de investigación, mediante una amplia revisión bibliográfica, en donde se identificaron diferentes estrategias fermentativas, producción de varios tipos de PHAs a partir de diversas fuentes de carbono, incluidos materiales de desecho ricos en carbono de varias ramas industriales.

## 1.7 Referencias

- Clarinval A-M, Halleux J. Classification of biodegradable polymers. In: Biodegradable Polymers for Industrial Applications. 2011.
- Khanna S, Srivastava AK. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by Ralstonia eutropha. Process Biochem. 2005;40(6):2173–82.
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates: An overview. Vol. 87, Bioresource Technology. 2003. p. 137–46.
- Muhammadi, Shabina, Afzal M, Hameed S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. Green Chem Lett Rev. 2015;8(3–4):56–77.
- 5. https://www.clarin.com/ciudades/alarma-basura-rellenan-ultimo-loteceamse-anos-lugar\_0\_SkyWLwwrM.html. Accedido el 21-02-2019.
- https://earthengine.google.com/timelapse/#v=-34.51336,-58.62358,
  10.812 L 00. Accedido el 9-2-2019.
- https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/702/51/tres-parches-de-basura.
  Accedido el 9-2-2019.
- Romano T. "Desde el cerro no se ve" Imagen capturada en el basural de Bariloche. Premiada en Rusia. Disponible en: https://tonnyromano.com/#!/miradas-indiscretas-2018/. Accedido en 9-2-2019.
- Kolybaba M, Tabil LG, Panigrahi S, Crerar WJ, Powell T, Wang B. Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future Written for presentation at the 2003 CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting Sponsored by the Red River Section of ASAE Quality Inn & amp; Suites 301 3 rd Avenue North. 2003;0300(03):15. Available from: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.462.6604&rep= rep1&type=pdf
- Aeschelmann F, Carus M. Bio-based Building Blocks and Polymers Global Capacities and Trends 2016–2021. 2017;(February 2017):249.

- 11. www.materbi.com. Accedido el 4-1-18.
- Carrasco F. Los polihidroxialcanoatos Plásticos biodegradables. Ing Química - Dpto Ing Química, Agrar y Tecnol Agroaliment - Univ Girona. 2004;Junio:244–51.
- Armelín E. Sintesis y caracterización de nuevas poliesteramidas: estudio de sus propiedades. Tesis Dr Univ Politècnica Catalunya Dep d'Enginyeria Química [Internet]. 2002; Available from: http://www.tesisenred.net/handle/10803/6425
- 14. Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Vol. 40, Process Biochemistry. 2005. p. 607–19.
- Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2010;13(3):321–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006
- Brandl H, Püchner P. Biodegradation of plastic bottles made from "Biopol" in an aquatic ecosystem under in situ conditions. Biodegradation. 1991;2(4):237–43.
- Sudesh K, Iwata T. Sustainability of biobased and biodegradable plastics.
  Clean Soil, Air, Water. 2008;36(5–6):433–42.
- Segura D, Noguez R, Espín G. Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. Biotecnología [Internet].
   2007;14(3):361–72. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Raul\_Noguez2/publication/24214416
   7\_Contaminacion\_ambiental\_y\_bacterias\_productoras\_de\_plasticos\_biod egradables/links/565cc57f08aefe619b253fd3.pdf
- Singh AK, Srivastava JK, Chandel AK, Sharma L. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates : an insight into recent advances , bottlenecks , and solutions. Appl Microbiol Biotechnol. 2019;1– 26.
- 20. Koller M. Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic

applications. Molecules. 2018;23(2):1–20.

- Tan D, Yin J, Chen GQ. Production of Polyhydroxyalkanoates [Internet]. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Elsevier B.V.; 2016. 655-692 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00029-4
- 22. Gao X, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. Current Opinion in Biotechnology. 2011.
- Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. Chemical Society Reviews. 2009.
- Luef KP, Stelzer F, Wiesbrock F. Poly(hydroxy alkanoate)s in Medical Applications. Chem Biochem Eng Q [Internet]. 2015;29(2):287–97. Available from: http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29\_2\_2015/Cabeq 2015-02-web Luef.pdf
- 25. Lee SY. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Vol. 49, Biotechnology and Bioengineering. 1996. p. 1–14.
- Steinbüchel A, Lütke-eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. 2003;16:81–96.
- Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiology Letters. 1995.
- Lee SY. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Vol. 14, Trends in Biotechnology. 1996. p. 431–8.
- Lemoigne M. Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide ßoxobutyrique. Bull Soc Chim Biol (Paris). 1926;8:770–8.
- Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev. 1990;54(4):450–72.
- Babel W, Steinbüchel A. Biopolyesters. Vol. 71, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2001. 345 p.
- Chen GQ, Patel MK. Plastics derived from biological sources: Present and future: A technical and environmental review. Chemical Reviews. 2012. p. 2082–99.
- Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkonates: Biological Polyesters. Prog Polym Sci. 2000;25:1503–1555.
- 34. Park SJ, Kim TW, Kim MK, Lee SY, Lim SC. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. Biotechnology Advances. 2012.
- Ikada Y, Tsuji H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. Macromol Rapid Commun. 2000;
- Ong SY, Chee JY, Sudesh K. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. J Sib Fed Univ Biol [Internet]. 2017;10(2):21–225. Available from: http://elib.sfu-kras.ru/bitstream/handle/2311/33371/07\_Yean Ong.pdf?sequence=1
- Jendrossek D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007.
- Numata K, Abe H, Iwata T. Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials. Materials. 2009.
- 39. Doi Y. Microbial polyesters. Vol. 30. USA: VCH; 1990. 2451 p.
- Domb AJ, Kumar N, Ezra A. Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development. Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development. 2011.
- Sabir MI, Xu X, Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. J Mater Sci. 2009;
- 42. Peng SW, Guo XY, Shang GG, Li J, Xu XY, You ML, et al. An assessment

of the risks of carcinogenicity associated with polyhydroxyalkanoates through an analysis of DNA aneuploid and telomerase activity. Biomaterials. 2011;

- 43. Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2007.
- 44. Zhang X, Luo R, Wang Z, Deng Y, Chen GQ. Application of (R)-3hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. In: Biomacromolecules. 2009.
- 45. Butscher A, Bohner M, Hofmann S, Gauckler L, Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based threedimensional printing. Acta Biomater. 2011;
- Lam K. MO-F-CAMPUS-I-03: CT and MR Characteristics of Some Specialty 3D Printing Filaments. Med Phys. 2015;
- 47. Kim SW, Shin HJ, Kay CS, Son SH. A customized bolus produced using a 3-dimensional printer for radiotherapy. PLoS One. 2014;
- Ma HK, Liu MM, Li SY, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. Application of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis regulatory protein PhaR as a biosurfactant and bactericidal agent. J Biotechnol. 2013;
- 49. Meng DC, Shen R, Yao H, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. Engineering the diversity of polyesters. Current Opinion in Biotechnology. 2014.
- Slater SC, Voige WH, Dennis DE. Cloning and expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J Bacteriol. 1988;
- Klinke S, Ren Q, Witholt B, Kessler B. Production of medium-chain-length poly(3-Hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 1999;
- 52. Jendrossek D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). Journal of Bacteriology. 2009.

- Jendrossek D, Pfeiffer D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). Environmental Microbiology. 2014.
- 54. Chen JY, Song G, Chen GQ. A lower specificity PhaC2 synthase from Pseudomonas stutzeri catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length and medium-chain 3hydroxyalkanoates. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2006;
- Thomson N, Summers D, Sivaniah E. Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles. Vol. 6, Soft Matter. 2010. p. 4045–57.
- Tian J, Sinskey AJ, Stubbe JA. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in Wautersia eutropha H16 by transmission electron microscopy. J Bacteriol. 2005;
- 57. Chen GQ. New challenges and opportunities for industrial biotechnology. Microbial Cell Factories. 2012.
- Chen G-Q. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. Microbiol Monogr. 2010;
- Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016;89:161–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- Strobel R, Sullivan G. Experimental design for improvement of fermentations, p. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology Demain y J Davies (ed),. ASM Press. Washington, D.C.; 1999. p. 80–93.
- 61. Nikel PI. Aspectos fisiológicos y moleculares de la acumulación heteróloga de poli ( 3-hidroxibutirato ) en Escherichia coli : análisis del rol de los sistemas de dos componentes ArcAB sobre la respuesta redox y el catabolismo de carbono. [Buenos Aires, Argentina]: Universidad Nacional de San Martín, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas; 2009.

- Anderson-Cook CM, Borror CM, Montgomery DC. Response surface design evaluation and comparison. J Stat Plan Inference. 2009;139(2):629–41.
- Mu W, Chen C, Li X, Zhang T, Jiang B. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by Lactobacillus sp. SK007. Bioresour Technol. 2009;100(3):1366–70.
- Yolmeh M, Jafari SM. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. Food Bioprocess Technol [Internet]. 2017;10(3):413–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2
- Koller M, Maršálek L, de Sousa Dias MM, Braunegg G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. N Biotechnol. 2017;37:24–38.

## 2. Antecedentes

La producción de los PHAs de origen bacteriano exige una serie de etapas. En primera instancia se necesita un microorganismo productor de estos biopolímeros, aislado del medio ambiente o seleccionado de los bancos internacionales. En segundo lugar, se busca maximizar la producción de polímero mediante la optimización del medio de cultivo y el control de las variables físico-químicas del proceso; esto suele realizarse en pequeños volúmenes — Erlenmeyers de 500 ml—. Posteriormente se realiza un escalado a biorreactor en escala de laboratorio en sistema *batch*, *fedbatch* y/o continuo. Finalmente, si la producción lo amerita, escalado a biorreactor de planta piloto y escala industrial (Figura 2.1).



Figura 2.1: Diagrama de flujo del escalado de la producción de PHA bacteriano

La primera sección de este capítulo presenta los antecedentes de *Cupriavidus necator* como microorganismo modelo en la producción de PHAs, la larga historia de su nombre y sus características morfológicas y fisiológicas. El conocimiento de los parámetros de crecimiento de la bacteria utilizada para la producción de biopolímero ayudará en la optimización y escalado; la sección 2.2 aborda los parámetros de crecimiento de *C. necator*. La sección 2.3 resume los antecedentes de optimización en la producción de PHAs con *C. necator*, primero, mediante diseño de experimentos, luego, se presenta una sección que detalla los principales resultados publicados sobre la producción de PHAs por *C. necator* con diferentes fuentes carbonadas en biorreactor de laboratorio modo *batch, fedbatch* y continuo. Finalmente, en la sección 2.4 se presentan los objetivos de este trabajo de tesis que surgen para investigar en escala de laboratorio.

## 2.1 Características de Cupriavidus necator

La bacteria Cupriavidus necator es un organismo modelo y el más prometedor como productor de PHA: puede sintetizar polímeros de varias estructuras químicas, mayormente PHA de cadena corta, con un alto rendimiento (arriba del 80-90 %) utilizando una amplia gama de sustratos (1,2).

#### 2.1.1 Nomenclatura de C. necator

A mediados del siglo XX, Wittenberger y Repaske, clasificaron taxonómicamente a esta bacteria productora de PHA como *Hydrogenomonas eutropha* por su habilidad de metabolizar hidrógeno para obtener energía y fijar CO<sub>2</sub> (3). Sin embargo, una década más tarde, debido a que el grupo *Hidrogenomonas* era poco consistente, esta bacteria, fue re-nombrada como *Alcaligenes eutrophus* por el tipo de flagelos que poseía (4). A fines del siglo XX, se definió un nuevo género: *Ralstonia*, y *A. eutrophus* fue renombrado como *Ralstonia eutropha* en base a nuevos estudios filogenéticos y bioquímicos (5). A principios del siglo XXI, en base a nuevas evidencias encontraron dos linajes dentro de las especies de *Ralstonia*. El linaje *R. eutropha* dio origen a un nuevo género denominado *Wautersia*, llamándola *Wautersia eutropha* (6).

Por otro lado, Makkar y Casida, en el año 1987, clasificaron una bacteria como *Cupriavidus necator* (7). Vaandamme y sus colaboradores, compararon los genomas de la recién definida *Wautersia eutropha* y *Cupriavidus necator* y encontraron que eran la misma bacteria (8). Dada la problemática de encontrar una bacteria con dos nombres, se recurrió a la regla de prioridad del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias. En conclusión, debido a que *Cupriavidus necator*, había sido descripta en 1987, prevalece sobre *Wautersia eutropha*, nomenclatura dada en 2004, aunque es posible encontrar las diferentes nomenclaturas de esta misma bacteria en trabajos posteriores (9–12).

Para la acumulación de PHAs las cepas de *C. necator* nativas más estudiadas son ATCC 17697 y 17699. Esta sección presenta la revision bibliográfica del proceso productivo con estas cepas.

# 2.1.2 Características morfológicas y fisiológicas del género *Cupriavidus*

El género *Cupriavidus* pertenece al filo de las proteobacterias. Este filo incluye al mayor número de bacterias Gram negativas, y la mayoría son conocidas por su importancia médica, agrícola o industrial (13). Se han encontrado tanto en el suelo como en los aislados clínicos.

Estos organismos se caracterizan por ser varillas cocoides de tamaño 0,7-0,9 x 0,9-1,3  $\mu$ m y por ser móviles debido a que poseen dos a diez flagelos pericíclicos. Su metabolismo es quimio-organotróficos o quimio-litotróficos; no requieren fuente de nitrógeno orgánico ni utilizan glucosa. Tienen metabolismo estrictamente respiratorio con el oxígeno como aceptor terminal de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento es 27 ° C y el pH óptimo es 7,0-8,0; el NaCl al 3% inhibe el crecimiento. Las colonias en agar nutriente después de 2 días a 27 ° C son blancas, brillantes, mucosas, lisas y convexas, con un borde entero; 2 - 4 mm de diámetro (14).

## 2.1.3 Organismo modelo como productor de PHAs

*Cupriavidus necator* es capaz de acumular en su interior entre 8 y 13 gránulos de PHAs, con un diámetro de 0,2 a 0,5  $\mu$ m. Estos gránulos son inclusiones hidrofóbicas en estado amorfo, dentro del citoplasma celular, que contienen entre un 5 -10 % de agua (10).

Este organismo modelo tiene una gran capacidad para acumular PHAs de una manera heterotrófica o autotrófica, es decir, utilizando un sustrato orgánico o CO<sub>2</sub> como fuente de carbono, respectivamente (15). *C. necator* es capaz de producir PHB hasta un 80 % del peso de células secas, de una manera no asociada al crecimiento, cuando utiliza CO<sub>2</sub> como fuente de carbono (16). Es el más estudiado como productor de PHAs a partir de sustratos orgánicos, debido al alto rendimiento de polímero (arriba del 80-90 %), utilizando diferentes tipos de sustratos. Es capaz de acumular grandes cantidades de polímero a partir de un medio de cultivo simple de sales minerales (17) y a partir de residuos industriales y agroindustriales; este proceso de producción posee la doble finalidad de, por un lado, disminuir los residuos a través de tecnologías amigables con el medio ambiente y, por otro, abaratar los costos de producción, como ha sido

demostrado por muchos estudios (18–24). Además, la mayoría de las producciones de PHA bacteriano a escala industrial se realizan usando la cepa *C. necator*, hasta ahora la de mejor costo-efectivo para la producción de PHBV (25).

Dentro de los PHAs sintetizados por *C. necator*, el componente predominante de la cadena polimérica es el HB. Otro monómero, el HV, puede presentarse en diferentes proporciones y superar el 50 % en moles constitutivos del PHA producido, a parir de determinados nutrientes en diferentes concentraciones (10,12,24,26–37). Monómeros con cadena carbonada más larga, tales como HHx, HHp y HO, pueden encontrarse en proporciones que van del 1% y hasta el 13 % (12). Por lo general, los PHA<sub>SML</sub> y PHA<sub>CML</sub> se sintetizan utilizando medios de cultivo complejos que contienen el sustrato principal de carbono y sales de ácidos hidrocarbonados con cadenas de carbono de varias longitudes (6 a 9 átomos y más) como co-sustratos. La síntesis de los PHAs de monómeros específicos, requiere condiciones específicas de nutrición de carbono.

La producción de PHB a partir de *C. necator* alimentada con sustratos orgánicos ha sido estudiada profusamente y en los últimos años se ha incrementado la cantidad de publicaciones sobre la producción de PHBV (20,30,32,34,36,38–48). Dependiendo del precursor que tenga disponible, la bacteria puede añadir diferentes monómeros al PHA que sintetice (2).

### 2.2 Parámetros del crecimiento de C. necator

#### 2.2.1 Estequiometría de producción

La cepa nativa crece en fructosa como fuente de carbono. Barbosa y colaboradores, propusieron la siguiente estequiometría de producción de biomasa a partir de fructosa (49):

$$C_6H_{12}O_6 + 2,814O_2 + 0,75NH_3 \rightarrow 3CH_2O_{0,5}N_{0,25} + 4,14H_2O + 3CO_2(2.2.1)$$

#### 2.2.2 Rendimientos de producción de biomasa y PHA

La biomasa inicial, X<sub>0</sub>, es la cantidad de biomasa agregada en un fermentador. A partir de los nutrientes y bajo condiciones favorables para el microorganismo, la biomasa se reproduce dentro del fermentador y al cabo de un tiempo se genera una cantidad de biomasa  $\Delta X$ , que viene dado por la diferencia de la biomasa en un determinado tiempo X, menos la biomasa inicial.

$$\Delta X = X - X_0 \tag{2.2.2}$$

El PHB o producto (P) sintetizado por C. necator se calcula mediante

$$\Delta P = P - P_0 \tag{2.2.3}$$

donde, P<sub>0</sub> el PBH contenido en la biomasa inoculada en el fermentador y P el PHB almacenado en las células a un determinado tiempo t.

La relación entre el producto almacenado y la biomasa producida es el rendimiento de producto en función de la biomasa:

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \tag{2.2.4}$$

Este parámetro es equivalente a porcentaje de producto almacenado en la biomasa, al multiplicarlo por un factor de 100, y se expresa como % del producto almacenado, por ejemplo: % PHA.

La productividad volumétrica de PHB (PPHB) viene dada por la relación entre la cantidad de PHB (P) producida en g/l y el tiempo de fermentación, esto es,

$$P_{PHB} = \frac{P}{t} \tag{2.2.5}$$

Las unidades de  $P_{PHB}$  son, por tanto, g/(l.h).

Para *C. necator*, al ser un organismo que almacena intracelularmente PHB, la biomasa (X) está compuesta por: i) el componente activo catalíticamente, denominado biomasa residual que consiste en proteínas y ácidos nucleicos, y ii) el producto PHB, que es un componente inerte (50). Por lo tanto, la biomasa residual (R) se define como la diferencia entre la biomasa total (X) y el PHB almacenado intracelularmente como producto (P).

$$R = X - P \tag{2.2.6}$$

Las concentraciones de productos biológicos (X, R y P) y de sustratos (C y N) se miden en gramos por litro de cultivo (g/l).

La capacidad de un microorganismo de aprovechar el sustrato (S) para reproducirse o para almacenar PHB, puede medirse en rendimientos experimentales. Estos rendimientos dan una medida de la eficacia de conversión del sustrato en biomasa y productos. Se calculan a partir de la cantidad de biomasa o PHB producida en función de la concentración de la fuente carbonada total consumida ( $\Delta$ C) según las ecuaciones 6 y 7, respectivamente:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta C}$$
(2.2.7)

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta C}$$
(2.2.8)

#### 2.2.3 Cinética de crecimiento

La velocidad con la que se reproduce un microorganismo viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \tag{2.2.9}$$

siendo  $\mu$ , la velocidad específica de crecimiento medida en h<sup>-1</sup>.  $\mu$  varía durante el cultivo bacteriano que presenta 4 fases bien definidas: una fase Lag o de adaptación al medio de cultivo, una fase de crecimiento exponencial donde  $\mu$  toma un valor constante y máximo ( $\mu$ m), una fase estacionaria con un valor de  $\mu$  nulo y una fase de muerte, donde  $\mu$  decrece.

En la fase exponencial, el crecimiento viene dado por:

$$X = X_0 e^{\mu_m t}$$
(2.2.10)

Por tanto, en esta segunda fase la concentración de biomasa aumenta exponencialmente.

Varios trabajos de investigación sobre la velocidad de crecimiento de *C. necator* demuestran que la velocidad específica máxima depende del tipo y concentración de los sustratos (50–52). Mozumder *y colaboradores* demostraron que la tasa de crecimiento específica de *C. necator* disminuye significativamente para concentraciones de fuentes de carbono superiores a 20 g/l (51). Khanna y Srivastava, midieron diferentes  $\mu_m$  para diferentes sustratos, en diferentes rangos (50). De modo que resulta importante determinarlo para la fuente de carbono y la concentración de la misma.

## 2.3 Optimización de la producción de PHAs

#### 2.3.1 Diseño de experimentos

El método de diseño de experimentos ha sido utilizado exitosamente en la etapa de optimización del medio de cultivo y de las variables físico-químicas del proceso de producción de PHAs por *C. necator* en escala de Erlenmeyer.

Grothe y colaboradores emplearon la metodología de optimización "de una variable a la vez" para estudiar el efecto de distintas soluciones de elementos en traza, relaciones de Carbono/Nitrógeno (C/N), pH y temperatura para la producción de PHB con la cepa *Alcaligenes latus*. Luego mediante un diseño factorial fraccionado de 2 niveles para 5 variables buscaron factores relevantes para optimizar la productividad de PHB. Las 5 variables analizadas fueron: sacarosa, sulfato de amonio, pH, fuerza iónica y elementos en trazas. Según los autores, utilizando una optimización diseñada estadísticamente, el rendimiento de PHB podría aumentarse de un promedio de 1,64 g/l en los primeros experimentos a un promedio de 2,97 g/l en los experimentos de optimización, es decir, un aumento de rendimiento de 1,8 veces (53).

Tripathi y colaboradores utilizaron el diseño rotativo compuesto para optimizar variables físicas del proceso productivo con *Alcaligenes sp.* NCIM 5085. Las condiciones optimizadas permitieron alcanzar un rendimiento de la fracción de PHB/biomasa de 76,8 % empleando sustrato de melaza seca y mostraron un 98 % de similitud con el rendimiento determinado por la metodología de diseño (54).

En un trabajo realizado en la Universidad de San Martín (55), se hizo una optimización estadística de un medio de cultivo para la producción de biomasa y PHB por una cepa *Escherichia coli* recombinante. En efecto, Nikel y colaboradores hallaron 3 variables que resultaron significativas en la producción de PHB a partir de diferentes sustratos: suero de leche, licor de maíz y solución de fosfatos. Posteriormente mediante la metodología de la superficie de respuesta, utilizando un diseño giratorio compacto central, hallaron las concentraciones óptimas de las tres variables. Mediante el diseño experimental estadístico lograron 9,41 g/l de biomasa y 6,12 g/l de PHB, con un 0,984 % de coincidencia con la predicción. Las concentraciones de PHB se triplicaron

respecto a las concentraciones en los experimentos iniciales. Se obtuvieron cantidades similares de PHB tras fermentaciones en un biorreactor (55).

Aramvash y colaboradores , realizaron una optimización estadística para la producción de PHB por *Cupriavidus necator* ATCC 17699. Hallaron que la fructosa, la velocidad de agitación, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y el pH inicial eran los factores más significativos que afectan a la acumulación de PHB. El proceso de optimización les permitió triplicar las concentraciones de PHB iniciales (17). Además, Aramvash *y colaboradores*, mediante experimentos de una variable a la vez, seleccionaron propanol y extracto de carne como buenos precursores para la producción de PHBV. Posteriormente mediante diseño de experimentos llegaron a un 54 % mol de HV, con buenos rendimientos de biomasa y PHBV en Erlenmeyer, de 5,9 y 3,55 g/l, respectivamente (32).

Con la cepa *Ralstonia eutropha (Cupriavidus necator*) ATCC 17697 Khanna y Srivastava realizaron una selección de una variable a la vez para encontrar fuentes minerales, de carbono y de nitrógeno, efectivas y baratas para la producción de PHB. Luego, mediante el diseño de experimentos de Placket-Burman (56) y la metodología de superficie de respuesta (57) optimizaron la composición del medio de cultivo para maximizar la productividad del PHB con un 94 y 83% de validez de los modelos previstos para la biomasa residual y la producción de PHB, respectivamente. Con el diseño experimental, se aumentó un 100 % la concentración de PHB obtenida en los experimentos de una variable por vez (58).

#### 2.3.2 Fermentaciones *batch*

La cepa *C. necator* nativa ha sido investigada en cultivos en *batch*, en diferentes escalas y tiempos, obteniendo diferentes rendimientos y tipos de PHAs a partir de varios sustratos: fructosa (Tabla 2.3.1), ácidos orgánicos y sus sales (Tabla 2.3.2), aceites vegetales (Tabla 2.3.3), diferentes tipos de residuos (Tabla 2.3.4) y diversos aceites residuales (Tabla 2.3.5).

En general, para la misma fuente de carbono, las producciones de biomasa y PHA son mayores en biorreactor que en Erlenmeyer. Las grandes ventajas de utilizar un biorreactor se deben a la mayor transferencia de oxígeno disuelto, que resulta de la aireación y agitación que posee este tipo de equipo. Además, permite mantener el pH constante por el agregado automático de ácido/base y regular la concentración de oxígeno disuelto en cascada con la agitación y aireación (59).

#### Producción de PHAs a partir de fructosa

*C. necator* produce PHB cuando utiliza fructosa como fuente de carbono. (Tabla 2.3.1). Khanna y Strivastava realizaron una optimización de la producción de PHB a partir de fructosa mediante diseño de experimentos en Erlenmeyer (58). Luego, lograron escalar el proceso a biorreactor de 7 l, aumentando los valores de biomasa total y PHB a 20,73 g/l y 9,35 g/l, respectivamente (58).

Para obtener componentes monoméricos diferentes de 3HB se añaden otras fuentes de carbono. Con fructosa suplementada con butirolactona C. necator sintetiza un 27 % de 4HB en el PHA (60). Con agregado de ácido valérico o propanol la bacteria puede sintetizar entre un 30-50 % de HV en la cadena polimérica de PHA (12,32). Volova y colaboradores han informado que C. necator es capaz de sintetizar PHAs con HHx y HO en muy bajas proporciones, cuando el medio de cultivo, cuya fuente de carbono principal es fructosa, se suplementa con ácido hexanoico u octanoico. Según sus experimentos, cuando se la alimentó sólo con fructosa, se obtuvo PHBV con un rango de 1,57-0,29 mol % de HV, dependiendo del tiempo de fermentación; también contenía una fracción muy pequeña de HHx de 0,19 mol % a las 48 horas de fermentación. En el medio con fructosa suplementado con ácido valérico se logró la máxima fracción de HV a las 36 de fermentación (38 mol %). Las máximas proporciones de HHx y HO se lograron con ácidos orgánicos de cadena par de átomos de carbono (acidos hexanoico y octanoico). A las 48 horas de fermentación con fructosa y ácido octanoico se logró un polímero conteniendo un 96,97 mol % de HB, 1,17 mol % de HV, 1,2 mol% de HHx y 0,66 mol % de HO (12).

#### Producción de PHAs a partir ácidos orgánicos y sus sales

*C. necator* es capaz de sintetizar PHBV, P(HB-co 4HB) y P(3HB-co-3HP-co-5HV) cuando se la cultiva a partir de ácidos orgánicos y/o sus sales (Tabla 2.3.2).

*C. necator* puede añadir monómeros de 3HP, 5HV y 3MB cuando se cultiva con 5-hidroxivalerato  $\omega$ -pentadecalactona y ácido 3-mercaptobutirico, respectivamente (29,61). Se ha logrado sintetizar un terpolímero que además de contener monómeros de HB y HV, contiene monómeros de 5-hidroxivalerato, el P(3HB-co-3HP-co-5HV), a partir de la cepa *C. necator* ATCC 17699. El P(3HB-co-3HP-co-5HV) contenía 5 o 2 mol % de 5HV, dependiendo si se alimentaba la bacteria con 5-hidroxivalerato o  $\omega$ -pentadecalactona, respectivamente (29).

*C. necator* es capaz de sintetizar PHBV a partir de varios sustratos, como ácido valérico, acetico, propionico y butírico, propanol, acetato, propionato y butirato (12,28,32,34,35).

La producción de PHBV por cepas *C. necator* nativas ha sido estudiada profusamente a partir del crecimiento heterotrófico de ácidos orgánicos. La proporción de HV dentro del co-polímero depende del tipo de fuente de carbono y del tiempo de fermentación. Los ácidos orgánicos de número impar de átomos de carbono son los precursores del monómero HV dentro de los PHAs (2). Pueden ser utilizados como fuente de carbono principal o como suplementos de una fuente de carbono principal con la que previamente se hayan logrado altas cantidades de biomasa y PHB.

Los primeros resultados de producción de PHBV a partir de *C. necator* nativa, datan de la década de los 80. Doi y colaboradores lograron obtener co-polímeros con diferentes proporciones de HV, con un máximo de 75 mol % alimentando a *C. necator* ATCC 17699 con ácidos orgánicos de átomos de carbono impares: los ácidos propanoico y valérico. Los autores afirmaron que los ácidos butírico y valérico son incorporados en el copoliéster como 3HB y 3HV sin descomposición del esqueleto de carbono en la célula bacteriana (34).

A partir de una optimización de la producción PHBV mediante diseño de experimentos, Yang *y colaboradores* optimizaron la proporción de HV dentro del PHA de 66,5 a 83,7 mol %, utilizando como sustrato diferentes proporciones de la mezcla de acetato, propionato y butirato. Sin embargo, las concentraciones de biomasa y PHA no superaron los 1,5 y 0,2 g/l, respectivamente. (28).

La producción de P(HB-co 4HB) por *C. necator* también se ha estudiado en profundidad. De manera similar a lo que ocurre en la producción de PHBV, dependiendo del tipo de fuente de carbono y/o del tipo y proporciones de suplementos, se logran copolímeros con diferente fracción de 4HB.

*C. necator* acumuló 3HB (HB) y 4HB cuando se utilizó ácido 4-hidroxibutirato ácido 4-hidroxibutírico, ácido 4-clorobutírico  $\gamma$ -butirolactona, 1,4 butanodiol y hexanodiol como fuente de carbono (2,34,43,60). Para la síntesis de P(HB-co 4HB) por *C. necator* nativa, Saito y colaboradores consideraron ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico,  $\gamma$ -butirolactona y alcanodioles de diferente cantidad de carbono, como diferentes fuentes de carbono libres de nitrógeno. La composición de 4HB varió de 0 a 34 mol % dependiendo de los sustratos utilizados como fuente de carbono. La máxima proporción se logró con ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico como fuente de carbono (43).

#### Producción de PHAs a partir de aceites vegetales

Se ha probado la producción de PHB por *C. necator* a partir de una amplia variedad de aceites vegetales (Tabla 2.3.3). Las máximas cantidades de PHB obtenidas a partir de aceites vegetales, se lograron en fermentaciones con aceite de jatrofa y de haba de soja como fuente de carbono: 11,4 y 12,5 g/l, con rendimientos de Y<sub>PHB/x</sub> mayores al 80 %, a las 48 y 96 horas de fermentación, respectivamente (10, 55)

Aceite de jatrofa empleado como fuente carbonada principal, suplementada con valerato de sodio en sistema batch con cepas nativas, permitió obtener 8,1 g/l de polímero, con un 31 mol % de HV (36).

Aceite de poroto de soja con el agregado de  $\gamma$ -butirolactona como sustrato en sistema batch con *C. necator* nativa luego de 18 horas de cultivo en Erlenmeyers generó una producción de P(HB-co 4HB) de 7,4 g/l con un contenido de 4HB de 1,6 mol % . Ese proceso escalado a biorreactor en sistema batch llevó a obtener 10-12 g/l de biomasa con un contenido de 80-83 % del copolímero y una fracción de 6-10 g/l de 4HB (11).

#### Producción de PHAs a partir de fuentes residuales

Dentro de las fuentes de carbono residuales estudiadas en la producción de biopolímeros mediante *C. necator* nativa, se hallan los residuos de cáscara de piña, de aceite de palma, raíces de achicoria, de comida, de jugo de naranja y gran variedad de aceites vegetales residuales (Tabla 2.3.4).

Residuos de alimentos llevaron a lograr 1 g/l de biomasa con un 25 % de PHB (21). Cuando se utilizaron residuos de cáscara de piña se obtuvo una muy baja 41

concentración de PHA, de 0,09 g/l, pero con muy alta cantidad de HV (60%) (24). Con residuos de naranja, se obtuvieron 7 g/l de PHB, con un rendimiento de 81% de polímero a partir del peso seco (22). Estos resultados son similares a los resultados reportados en el trabajo de Aramvash y colaboradores, donde se obtuvo máxima producción de PHB y biomasa en cultivo batch de Erlenmeyer(17). Cabe destacar que los valores de los rendimientos Y<sub>PHB/x</sub> y Y<sub>PHB/s</sub> son mayores con la fructosa presente en el residuo de jugo de naranja que con la fructosa comercial. Esto puede deberse a otros sustratos presentes en el residuo de jugo de naranja. Por lo tanto, se considera sumamente promisorio el empleo de este tipo de residuo para producir PHB.

*C. necator* sintetiza PHB a partir de gran variedad de aceites vegetales usados, llamados también aceites residuales (26,63–65); sintetiza el copolímero P(HBco 4HB) cuando se la cultiva con aceite de palma usado (47) y sintetiza PHBV con aceite de canola residual y ácidos orgánicos como fuentes de carbono (26). Las concentraciones de PHAs obtenidas con aceites residuales son muy variadas, siendo el máximo con aceite de café molido residual. En efecto, las máximas cantidades de PHB obtenidas a partir de cepas nativas de *C. necator* cultivadas en biorreactor en modo batch, se lograron en fermentaciones con café molido residual como fuente de carbono: 25 y 29 g/l, con rendimientos de  $Y_{P/x}$ mayor al 80 % (65). Por lo tanto, las fuentes residuales son potentes fuentes de carbono para la producción de PHB por *C. necator*.

Cabe señalar que el estudio de utilización de las fuentes de carbono residuales para la producción de PHAs depende en su mayor parte de la región geográfica y el entorno social. De modo que en distintos grupos de investigación y en diferentes partes del mundo se estudian variadas fuentes residuales. La diversidad de fuentes residuales a estudiar como fuentes de carbono para la producción de PHB por cepas nativas de *C. necator*, es hasta ahora inagotable.

Р <sup>рнд</sup> Ref (g/l/h) Ref	0,08* (66)	0,15 (58)	- (30)	- (60)	- (12)	- (12)	0,07* (32)
t (h)	47	60	ı	72	48	48	48
Monómero** (mol %)	HB	HB	HB	4HB 27,4	HV 1 -38	HV 0,5-1,7/HHx 0-1,2/HO 0-0,75	HV 54
РНА (%)	59,1*	45,1*	22-39	11-60	·	·	60,2*
PHA (I/g)	3,8	9,4	1-3		,	,	3,6
Biomasa (g/l)	6,4	20,7	6 - 8				5,9
Fuente de carbono	Fructosa	Fructosa	Fructosa + oxidante	Fructosa+ butirolactona	Fructosa + ác. Valérico	Fructosa + ác. hexanóico u octanóico	Fructosa + propanol
θ	В	ш	ш	ш	ш	ш	ш
C. necator	ATCC 17697	ATCC 17697	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699

ŝa
ğ
n N
fr
qe
E:
ац
<u>م</u>
5
Зţ
ő
Ĕ
Ċ
ŝ
Ś
ati
2
ğ
ğ
с Ф
ð
c <sub>2</sub>
at
а¢
Ĕ
ĩte
Si
Ľ
s
ě
<u>0</u> .
ac
ž
Ĕ
eri
Ц.
-
ŝ
с,
l de
Ĕ

(e) escala, (E) Erlenmeyers, (B) biorreactor, (t) tiempo, (-) no determinado, (\*) valores calculados a partir de otros datos informados en el trabajo citado, (\*\*) cuando se indica la composición molar de monómero, es porque se ha hecho una caracterización del polímero. Caso contrario, se supone que el PHA es PHB. El porcentaje de monómero que no se indica es HB.

BLA DLA	Biomasa DHA DHA		рна	Mcnómoro**		0	
Fuente de carbono gul) (g/l) (g/l) (%)	(g/l) (g/l) (%)	(%) (I/B)	(%)	(mol %)	t (h)	(d/l/b)	Ref.
Ác. acético, propiónico y butírico 4,9 2,5 51*	4,9 2,5 51*	2,5 51*	51*	HV 40	45	0,06*	(33)
Acetato+ propionato+butirato 0,7-1,4* 0,3* 66-83	0,7-1,4* 0,3* 66-83	0,3* 66-83	66-83	HV 4-35	72	,	(28)
5-hidroxivalerato 6,0 2,1 34,0	6,0 2,1 34,0	2,1 34,0	34,0	3HP 5 /5HV 1	48	0,04*	
w-pentadecalactona 5,7 1,0 17,0	5,7 1,0 17,0	1,0 17,0	17,0	3HP 2 /5HV 1	48	0,02*	(67)
Ác. orgánicos 6-8 2-4* 31-51	6-8 2-4* 31-51	2-4* 31-51	31-51	HV 0-31	48		(34)

Tabla 2.3.2: Fermentaciones en sistema batch de cepas nativas C. necator a partir de ácidos orgánicos y sus sales.

(e) escala, (E) Erlenmeyers, (B) biorreactor, (t) tiempo, (-) no determinado, (\*) valores calculados a partir de otros datos informados en el trabajo citado, (\*\*) cuando se indica la composición molar de monómero, es porque se ha hecho una caracterización del polímero. Caso contrario, se supone que el PHA es PHB. El porcentaje de monómero que no se indica es HB.

(35)

0,03\*

(61)

ı

ı

(43)

48 42

4 HB 34-100

1-16

\*6-0 1,5 ı

3-5,8

Ác. 4 butírico

ഥ ш

ATCC 17699 ATCC 17699 ATCC 17699

3,9 1

Gluconato + ác. 3-mercaptobutirico 4 ác. orgánicos

37,3\* ő

HV 16 3MB 72

Ref.	(26)	(26)	(26)	(26)	(26)	(65)	(62)	(11)	(11)	(11)	(36)	(37)
Р <sub>РНА</sub> (g/l/h)	0,05*	0,06*	0,03*	0,06*	0,07*	0,12*	0,24*	0,13*	0,10*		0,17*	0,10*
t (h)	72	72	72	72	72	72	48	96	72		48	72
Monómero** (mol %)	HB	HB	HB	HB	HB	HB	HB	HB	4HB 1,6-2,2	4HB 6,3-10	HV 31	HV 7
РНА (%)	40	40	28	49	50	62	87	83	76-90	80-83	06	06
PHA (g/l)	3	4	2	4,6	4,8	8,3	11,4*	12,5*	3 -7	8-10*	8,1*	7,5
Biomasa (g/l)	8	10	7,5	6	9,5	13	13	15	4 - 8	10-12	6	
Fuente de carbono	Aceite de oliva	Aceite de maíz	Aceite de haba de soja	Aceite de girasol	Aceite de canola	Aceite de canola	Aceite de jatrofa	Aceite de haba de soja	Aceite de haba de soja+ butirolactona	Aceite de haba de soja+ butirolactona	Aceite de jatrofa + valerato de sodio	Aceite de palma + propionato de sodio
θ	ш	ш	ш	ш	ш	ш	ш	Ю	ш	Ю	ш	ш
C. necator	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17699	ATCC 17700	ATCC 17700	ATCC 17700	ATCC 17699	ATCC 17699

Tabla 2.3.3: Fermentaciones en sistema batch de cepas nativas C. necator a partir de aceites vegetales

(e) escala, (E) Erlenmeyers, (B) biorreactor, (t) tiempo, (-) no determinado, (\*) valores calculados a partir de otros datos informados en el trabajo citado, (\*\*) cuando se indica la composición molar de monómero, es porque se ha hecho una caracterización del polímero. Caso contrario, se supone que el PHA es PHB. El porcentaje de monómero que no se indica es HB.

ATCC 17699EResiduos de jugo de naranja9781ATCC 17697EResiduos de cacara de piña- $0.9$ -ATCC 17699BResiduos de comida1 $0.3$ 25ATCC 17699BCebo animal residual20 $14$ 70ATCC 17699BCebo animal residual6 $4.6$ 73ATCC 17699ESemila de datil6 $4.6$ 73ATCC 17699EAceite de freir residual25 $1.8$ 71ATCC 17699EAceite de palma residual $1.5$ $0.7$ 50ATCC 17699EAceite de canola residual $1.5$ $0.7$ 50ATCC 17699EAceite de girasol residual $1.5$ $0.7$ 50ATCC 17699EAceite de canola residual $1.5$ $0.7$ 50ATCC 17699EAceite de carlé molido residual $1.4$ , 2 $7$ 59ATCC 17699EAceite de carlé molido residual $1.4$ , 2 $7$ 56ATCC 17699EAceite de carlé molido residual $1.4$ , 2 $7$ 56ATCC 17699EAceite de carlé molido residual $10.14$ $7$ 56ATCC 17699EAceite de carl	C. necator	θ	Fuente de carbono	Biomasa (g/l)	РНА (I/g)	РН <b>А</b> (%)	Monómero** (mol %)	t (h)	Р <sub>РНА</sub> (g/l/h)	Ref.
ATCC 17697EResiduos de cascara de piña- $0.9$ -ATCC 17699BResiduos de comida1 $0.3$ $25$ ATCC 17699ECebo animal residual $20$ $14$ $70$ ATCC 17699ECebo animal residual $25$ $4,6$ $73$ ATCC 17699EAcceite de freir residual $25$ $4,5$ $81$ ATCC 17699EAcceite de palma residual $13$ $8$ $60$ ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,5$ $4,5$ $81$ ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,4$ $7$ $59$ ATCC 17699EAcceite de girasol residual $11,4$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de girasol residual $11,4$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de anola residual $11,4$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual $11,4$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual $11,4$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual $10,14$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual $10,14$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual $10,14$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual $10,14$ $7$ $56$ ATCC 17699EAcceite de caré molido residual + metanol $10,3$ $6,7$ <t< td=""><td>ATCC 17699</td><td>ш</td><td>Residuos de jugo de naranja</td><td>6</td><td>7</td><td>81</td><td>Ŧ</td><td>72</td><td>0,10*</td><td>(22)</td></t<>	ATCC 17699	ш	Residuos de jugo de naranja	6	7	81	Ŧ	72	0,10*	(22)
ATCC 17699BResiduos de comida1 $0.3$ $25$ ATCC 17699BCebo animal residual $20$ $14$ $70$ ATCC 17699ECebo animal residual $25$ $18$ $71$ ATCC 17699EAceite de freir residual $5,5$ $4,5$ $81$ ATCC 17699EAceite de palma residual $5,5$ $4,5$ $81$ ATCC 17699EAceite de canola residual $1,5$ $0,7$ $50$ ATCC 17699EAceite de canola residual $1,5$ $0,7$ $50$ ATCC 17699EAceite de canola residual $1,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAceite de girasol residual $1,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAceite de canola residual $1,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAceite de café molido residual $1,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAceite de café molido residual $14,2$ $10$ $7$ $56$ ATCC 17699EAceite de café molido residual $14,2$ $7$ $56$ $90$ ATCC 17699EAceite de café molido residual $10,14$ $7$ $56$ $90$ ATCC 17699EAceite de café molido residual $10,14$ $7$ $56$ $90$ ATCC 17699EAceite de cafe molido residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol $10,3$ $7$ $7$ $56$ ATCC 17699EAc	ATCC 17697	ш	Residuos de cascara de piña		0,9		HV 60	60	0,02*	(24)
ATCC 17699BCebo animal residual201470ATCC 17699ESemilla de datil64,673ATCC 17699EAcceite de freir residual5,54,581ATCC 17699EAcceite de palma residual1,54,581ATCC 17699EAcceite de canola residual1,50,750ATCC 17699EAcceite de canola residual1,50,750ATCC 17699EAcceite de canola residual1,4750ATCC 17699EAcceite de canola residual1,4750ATCC 17699EAcceite de canola residual1,4750ATCC 17699EAcceite de canola residual1,4,2107ATCC 17699EAcceite de canola residual14,2107ATCC 17699EAcceite de carfe molido residual29,426,590ATCC 17699EAcceite de canola residual + metanol10,36,765ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol14,711,780ATCC 17699EAcceite d	ATCC 17699	ш	Residuos de comida	-	0,3	25	HВ	44	0,01*	(21)
ATCC 17699ESemilla de datil $6$ $4,6$ $73$ ATCC 17699BAcceite de freir residual $25$ $18$ $71$ ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,5$ $4,5$ $81$ ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,5$ $0,7$ $50$ ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAcceite de girasol residual $11,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAcceite de carola residual $11,4$ $7$ $50$ ATCC 17699EAcceite de carét molido residual $14,2$ $10$ $70$ ATCC 17699EAcceite de carét molido residual $14,2$ $10$ $70$ ATCC 17699EAcceite de carét molido residual $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAcceite de carola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de carola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de carola residual + propanol $13$ $10,3$ $87$ $67$ ATCC 17699EAcceite de carola residual + propanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de carola residual + propanol $13$ $10,3$ $80$ ATCC 17699EAcceite de carola residual + propanol $14,7$ $11,7$ $80$ ATCC	ATCC 17699	ш	Cebo animal residual	20	14	70	ΗB	47	0,30*	(63)
ATCC 17699BAceite de freir residual $25$ 1871ATCC 17699EAceite de palma residual5,54,581ATCC 17699EAceite de canola residual1,50,750ATCC 17699EAceite de canola residual1,50,750ATCC 17699EAceite de girasol residual1,4759ATCC 17699EAceite de girasol residual11,4759ATCC 17699EAceite de afé molido residual11,9758ATCC 17699BAceite de café molido residual14,21070ATCC 17699BAceite de café molido residual10-147-1067-76ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol10,147-1067-76ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol10,36,765ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol10,36,765ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol131080 <tr< td=""><td>ATCC 17699</td><td>ш</td><td>Semilla de datil</td><td>9</td><td>4,6</td><td>73</td><td>ΗB</td><td>84</td><td>0,05*</td><td>(67)</td></tr<>	ATCC 17699	ш	Semilla de datil	9	4,6	73	ΗB	84	0,05*	(67)
ATCC 17699EAceite de palma residual5,54,581ATCC 17699EAceite de canola residual13860ATCC 17699EAceite de canola residual1,50,750ATCC 17699EAceite de girasol residual11,4759ATCC 17699EAceite de girasol residual11,9759ATCC 17699EAceite de caré molido residual11,9758ATCC 17699BAceite de caré molido residual14,21070ATCC 17699BAceite de caré molido residual29,426,590ATCC 17699EAceite de caré molido y canola residuales10-147-1067-76ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol10,36,765ATCC 17699EAceite de canola residual + tetanol10,36,765ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol13,711,780ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol1310,36,7ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol1310,380ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol14,711,7	ATCC 17699	Ю	Aceite de freir residual	25	18	71	HВ	71	0,25*	(63)
ATCC 17699EAcceite de canola residual13860ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,5$ $0,7$ 50ATCC 17699EAcceite de girasol residual $11,4$ $7$ 59ATCC 17699EAcceite de girasol residual $11,9$ $7$ 59ATCC 17699EAcceite de café molido residual $11,9$ $7$ 59ATCC 17699EAcceite de café molido residual $14,2$ $10$ $7$ 58ATCC 17699EAcceite de café molido residual $29,4$ $26,5$ 90ATCC 17699EAcceite de canola residuales $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $13,17$ $11,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $14,1$ $7-10$ $87$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $13,7$ $10,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $13,7$ $7,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $13,7$ $7,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $13,7$ $7,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $7,7$ $7,7$ <	ATCC 17699	ш	Aceite de palma residual	5,5	4,5	81	4 HB 15	144	0,03*	(47)
ATCC 17699EAcceite de canola residual $1,5$ $0,7$ $50$ ATCC 17699EAcceite de girasol residual $11,4$ $7$ $59$ ATCC 17699EAcceite de palma residual $11,9$ $7$ $58$ ATCC 17699BAcceite de café molido residual $14,2$ $10$ $70$ ATCC 17699BAcceite de café molido residual $14,2$ $10$ $70$ ATCC 17699EAcceite de café molido residual $29,4$ $26,5$ $90$ ATCC 17699EAcceite de café molido y canola residuales $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $13,7$ $10,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $13,7$ $7,7$ $52$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $14,7$ $7,7$ $7,7$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $12,7$ $7,7$ $80$	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual	13	8	60	HВ	72	0,11*	(26)
ATCC 17699EAceite de girasol residual $11,4$ $7$ $59$ ATCC 17699EAceite de palma residual $11,9$ $7$ $58$ ATCC 17699BAceite de café molido residual $14,2$ $10$ $70$ ATCC 17699BAceite de café molido residual $29,4$ $26,5$ $90$ ATCC 17699EAceite de café molido y canola residuales $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + tanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $13,7$ $10$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,7$ $11,7$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,1$ $7$ $52$	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual	1,5	0,7	50	HВ	72	0,01*	(64)
ATCC 17699EAcceite de palma residual11,9758ATCC 17699EAcceite de café molido residual $14,2$ $10$ 7070ATCC 17699BAcceite de café molido residual $29,4$ $26,5$ 90ATCC 17699EAcceite de café molido y canola residuales $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + etanol $13,1$ $10,3$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $14,7$ $11,7$ $80$ ATCC 17699EAcceite de canola residual + propanol $14,1$ $7$ $52$	ATCC 17699	ш	Aceite de girasol residual	11,4	7	59	HВ	72	0,09*	(26)
ATCC 17699EAceite de café molido residual14,21070ATCC 17699BAceite de café molido residual $29,4$ $26,5$ 90ATCC 17699EAceite de café molido y canola residuales $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol $13,3$ $10$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol $13,7$ $10$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,7$ $11,7$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,1$ $7$ $52$	ATCC 17699	ш	Aceite de palma residual	11,9	7	58	HВ	72	0,10*	(65)
ATCC 17699BAceite de café molido residual $29,4$ $26,5$ $90$ ATCC 17699EAceite de cardé molido y canola residuales $10-14$ $7-10$ $67-76$ ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol $10,3$ $6,7$ $65$ ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol $13,3$ $10$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,7$ $11,7$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,7$ $11,7$ $80$ ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol $14,1$ $7$ $52$	ATCC 17699	ш	Aceite de café molido residual	14,2	10	70	HВ	72	0,14*	(65)
ATCC 17699EAceite de café molido y canola residuales10-147-1067-76ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol10,36,765ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol14,711,780ATCC 17699EAceite de canola residual + propionato14,1752	ATCC 17699	Ю	Aceite de café molido residual	29,4	26,5	06	HВ	40	0,66	(65)
ATCC 17699EAceite de canola residual + metanol10,36,765ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propanol14,711,780ATCC 17699EAceite de canola residual + propionato14,1752	ATCC 17699	ш	Aceite de café molido y canola residuales	10-14	7-10	67-76	ΗB	20	0,15*	(65)
ATCC 17699EAceite de canola residual + etanol131080ATCC 17699EAceite de canola residual + propionato14,711,780ATCC 17699EAceite de canola residual + propionato14,1752	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual + metanol	10,3	6,7	65	ΗB	84	0,08*	(26)
ATCC 17699    E    Aceite de canola residual + propanol    14,7    11,7    80      ATCC 17699    E    Aceite de canola residual + propionato    14,1    7    52	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual + etanol	13	10	80	ΗB	84	0,12*	(26)
ATCC 17699 E Aceite de canola residual + propionato 14,1 7 52	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual + propanol	14,7	11,7	80	HV 9	84	0,14*	(26)
	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual + propionato	14,1	7	52	HV 13	84	0,09*	(26)
ATCC 17699 E Aceite de canola residual + valerato 12,1 6,5 53	ATCC 17699	ш	Aceite de canola residual + valerato	12,1	6,5	53	HV 18	84	0,08*	(26)

Tabla 2.3.4: Fermentaciones en sistema batch de cepas nativas C. necator a partir de residuos

(e) escala, (E) Erlenmeyers, (B) biorreactor, (t) tiempo, (-) no determinado, (\*) valores calculados a partir de otros datos informados en el trabajo citado, (\*\*) cuando se indica la composición molar de monómero, es porque se ha hecho una caracterización del polímero. Caso contrario, se supone que el PHA es PHB. El porcentaje de monómero que no se indica es HB.

46

#### 2.3.3 Fermentaciones fed batch

En esta Sección se muestran los resultados al pasar de sistema *batch* a *fed batch* con las cepas nativas de *C. necator.* Para no hacer una extensa comparación de todas las fuentes de carbono, se presenta el sistema fedbatch, con fructosa como fuente de carbono heterótrofa.

La cantidad de PHA calculada por litro de cultivo en este sistema, tiene un rango más amplio que en batch (Tabla 2.3.5). Por lo general, aumenta de 2 a 10 veces respecto del sistema batch, utilizando la escala de biorreactor de laboratorio. Esto se debe al agregado de sustrato durante el proceso, lo que permite aumentar su consumo por la bacteria y como consecuencia aumentar la producción de biomasa y PHA.

El control de la fuente de carbono en su óptimo nivel es esencial para alcanzar la máxima concentración celular y alta productividad. Se ha demostrado experimentalmente que la fuente de carbono afecta significativamente a la velocidad específica de crecimiento de *C. necator*, como se ha mencionado en la sección 2.2.3. La concentración de fuente de carbono óptima está entre 10 y 20 g/l. Para controlar la fuente de carbono dentro de ese nivel se pueden utilizar diferentes estrategias: determinación de la salida de gases por espectroscopía de masa; medición de consumo de glucosa con un analizador *on-line* (51,68).

La estrategia de mantener la concentración de la fuente de carbono alrededor de los 20 g/l en sistemas *fed batch* es utilizada ampliamente, con diferentes cepas de *C. necator* y con diferentes fuentes de carbono (19,20,40,51,52,68,69).

Se ha cultivado las cepas de *C. necator* nativas en sistema *fed batch* mediante alimentación autótrofa, heterótrofa y mixta (16,70,71). Este hecho afirma que esta bacteria es un organismo modelo para la producción de PHAs.

Khanna y Srivastava, han estudiado la producción de PHB por *C. necator* a partir de fructosa en sistema batch y fed batch (58,72,73). En sistema batch lograron 9,35 g/l de PHB y en sistema fed batch 16,8 g/l de PHB. De esta manera han logrado aumentar la concentración PHB más de un 90 %. Esta es la concentración máxima de PHB encontrada, cuando se utilizó exclusivamente fructosa como fuente de carbono por *C. necator* nativas.

Jung y colaboradores, realizaron la producción de PHAs en sistema *batch* y *fed batch* a partir de fructosa con suplemento de un oxidante. En *batch* obtuvieron 1,3 g/l de PHB, mientras que en *fed batch* lleharon a 4,3 g/l, aumentando 4 veces la producción.

Song *y colaboradores.,* trabajaron en ambos sistemas, para sintetizar el copolímero P(HB-co 4HB) a partir de fructosa y butirolactona. Primeramente, lograron un porcentaje de 27,5 del monómero 4HB, y luego en sistema *fed batch* lo aumentaron a 35 %.

Hasta aquí se ha demostrado que en el sistema *fed batch* se mejora la producción, productividad y también el porcentaje de monómeros de interés, de modo que es imprescindible su utilización para mejorar la producción y productividad de PHB.

σ
so
Ū
<u>5</u>
ž
2
õ
0
ę
<u>د</u> .
Ц
ä
σ
5
at
မီ
č
Ö
с С
<u>ja</u>
Ē
Ца
S
Зa
ğ
0
Å
0
<u> </u>
atc
Ö
ã
<u></u>
ъ С
ື
<u>a</u>
SC
Ð
g
5
at
9
eo
ي ج
Ĕ
ē
ist
S
ЭD
ĩ
К
ă
<u>Te</u>
ē
ā
L U
ŝ
ĕ
Ъ
<u>.</u>
Ita
ē
E
ē
Щ
Ċ.
e.
2
<u>la</u>
at
$\vdash$

C. necator	Fuente de carbono	Biomasa (g/l)	РНА (I/6)	РНА (%)	Monómero** (mol %)	t (h)	P (g/l/h)	Ref
ATCC 17697	C02	~30	0	0	HB	~42		(11)
ATCC 17697	CO2	60	36	·	HB, 100	>60	·	(20)
ATCC 17697	Fructosa, 10/CO2	26,3	21,6	82	HB	~70	0,55	(16)
ATCC 17697	Fructosa, 20/CO2	27,3	15,2	56	HB	~70	0,68	(16)
ATCC 17697	Fructosa, 30/CO2	42,5	23,9	56	HB	~70	0,9	(16)
ATCC 17697	Fructosa, 15	7*	4	57	HB, 100	80	0,05	(49)
ATCC 17697	Fructosa	32	14	43	HB	50	0,28	(72)
ATCC 17697	Fructosa	36	16,8	46	HB	35	0,48	(23)
ATCC 17699	Fructosa, butirolactona	33,6-49,1	13,8- 24,4	39-50	4HB, 1,64-25,2	40-45	0,32-0,55	(6)
ATCC 17699	Fructosa, butirolactona	51	17,9*	35	4HB 35	74	·	(09)
ATCC 17699	Fructosa + aceites vegetales	23,5*	21,6*	92	НВ, НV, НО, НDD	36	0,6	(10)
ATCC 17699	Fructosa + oxidante	•	3,7-4,3	ı	HB		0,13-0,28	1007
ATCC 17699	Fructosa + oxidante + valerato	ı	2,6-3,1	ı	PHBV (%ND)	I	0,07-0,12	(ne)
ATCC 17699	Fructosa + ac propionico	2,7-3	1,5-2*	55-73	HV 50-65	ı		(31)

(e) escala, (E) Erlenmeyers, (B) biorreactor, (t) tiempo, (-) no determinado, (\*) valores calculados a partir de otros datos informados en el trabajo citado, (\*\*) cuando se indica la composición molar de monómero, es porque se ha hecho una caracterización del polímero. Caso contrario, se supone que el PHA es PHB. El porcentaje de monómero que no se indica es HB.

#### 2.3.4 Fermentaciones continuas

Hasta la fecha, todos los procesos comerciales para la producción de PHA emplean fermentaciones microbianas discontinuas. Estos procesos presentan inconvenientes tales como la calidad variable del producto y los inevitables periodos de inactividad para la preparación y post-tratamiento de los biorreactores (74).

Con la cepa ATCC 17699 se ha estudiado la producción de PHAs a partir de glucosa en sistema continuo (Tabla 2.3.6), donde la tasa de dilución, es la relación entre el flujo de entrada de nutrientes y el volumen al que se mantiene constante el biorreactor (27).

*Ralstonia eutropha* (*C. necator*) ATCC 17697 se cultivó en un reactor de tanque de agitación continua de 3 I para estudiar las respuestas dinámicas de la producción de PHBV. Se estudiaron los efectos de las fuentes de carbono (glucosa y propionato de sodio) y la tasa de dilución sobre el crecimiento microbiano y la acumulación de PHBV. Se destacó el aumento de la fracción molar de HV en el producto con el aumento de la concentración de propionato de sodio. En este estudio, el PHBV que contenía 40-60% en moles de HV se sintetizó con una alimentación mixta de glucosa (10 g/L) y propionato de sodio (7 ó 15 g/L) ajustando la velocidad de dilución. Cuando la tasa de dilución fue cercana a 0,10 1/h, la bacteria produjo la máxima cantidad de PHBV (27). Sin embargo, las concentraciones de PHB en sistema continuo son inferiores a las concentraciones en *fed batch*, de modo que este sistema no resulta atractivo para la producción biotecnológica.

Tabla 2.3.6: Fermentación en sistema continuo de C. necator ATCC 1769	99
---	----

C. necator	D (1/h)	Fuente de carbono	Biomasa (g/l)	PHA (g/l)	Monómero (mol %)	t (h)	Referencia
ATCC 17699	0,016- 0,136	Glucosa, Propionato de sodio	6,68-9,75	2,67- 5,34	HV 30-60	24- 35	(27)

(D) tasa de dilución, (t) tiempo, (P) productividad del PHA, (-) no determinado.

## 2.4 Objetivos

*C. necator* nativa resulta una herramienta útil y poderosa para la producción de PHB y varios tipos de copolímeros, a partir de diversas fuentes de carbono, incluyendo fuentes de carbono residuales. El uso de técnicas de biología molecular y ADN recombinante incrementan el precio de la producción de PHA (10). Por lo tanto, el estudio de las estrategias de alimentación y fermentación en la producción de PHAs mediante *C. necator* nativa es no sólo de interés para incrementar el conocimiento científico sino también relevante para la producción escalable de polímeros biodegradables.

Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis es generar PHAs a partir de la cepa nativa *C. necator* ATCC 17697 a escala de laboratorio y establecer los parámetros del proceso que permitan el escalado productivo. Se buscará profundizar el conocimiento de los tamaños y morfologías celulares de *C. necator* ATCC 17697 en las distintas etapas productivas, con la consecuente variación en la cantidad y el tamaño de los gránulos de PHA acumulados. Finalmente, evaluar fuentes de carbono alternativas para la producción de PHAs por la bacteria.

Los objetivos específicos se enumeran a continuación:

- Determinar el tiempo de fermentación óptimo de la bacteria *C. necator* ATCC 17697 en Erlenmeyer para una óptima productividad volumétrica de gránulos intra-citoplasmáticos de PHB y rendimientos experimentales.
- Establecer, mediante la metodología de diseño de experimentos, el medio de cultivo que optimice la producción de PHB *por C. necator* ATCC 17697 en Erlenmeyer. Analizar cómo las variables del medio de cultivo afectan a los rendimientos y productividades, para finalmente estudiar la cinética de crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 en el medio optimizado.
- 3. Escalar el proceso de producción de PHB en un biorreactor de laboratorio y optimizar la producción y productividad en esta escala. Estudiar diferentes estrategias de fermentación y medios de cultivo en modo *batch* y diferentes estrategias de alimentación en modo *fedbatch*. Comparar las distintas productividades en los diferentes sistemas y estudiar la cinética de crecimiento de *C. necator* en todos los sistemas utilizados.

- Caracterizar físico-químicamente el polímero producido en el medio optimizado. Elaborar membranas con el polímero caracterizado y analizar sus propiedades mecánicas y de citotoxicidad para evaluar su posible uso como material biomédico.
- 5. Estudiar la producción y degradación de gránulos intra-citoplásmáticos de PHB en diferentes medios de cultivo y a distintos tiempos de fermentación. Determinar, mediante procesamiento de imágenes de microscopía electrónica de transmisión, los cambios en la morfología de las células de *C. necator* ATCC 17697 en las distintas etapas productivas, así como la variación en la cantidad y el tamaño de los gránulos de PHA acumulados.
- Evaluar fuentes de carbono provenientes de residuos agroindustriales y otras fuentes alternativas como posibles fuentes de carbono alternativas para la producción de PHAs por *C. necator* ATCC 17697.

## 2.5 Referencias

1. Reinecke F, Steinbüchel A. Ralstonia eutropha strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. J Mol Microbiol Biotechnol. 2008;16(1–2):91–108.

- 2. Doi Y. Microbial polyesters. Vol. 30. USA: VCH; 1990. 2451 p.
- Méndez BS, Pettinari MJ. Cuando los nombres ocultan a los nombrados. 2010;59–64.
- Davis DH, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M. Proposal to reject the genus Hydrogenomonas: taxonomic implications. Int J Syst Bacteriol. 1969;19(4):375–90.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov. Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) Comb. Nov. Microbiol Immunol. 1995;39(11):897–904.
- Vaneechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G.
  Wautersia gen. nov., a novel genus accomodating the phylogenetic lineage

including Ralstonia eutropha and related species, and proposal of Ralstonia [Pseudomonas] syzygii (Roberts et al. 1990) comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54(2):317–27.

- Makkar NS, Casida LE. Cupriavidus necator gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. Int J Syst Bacteriol. 1987;37(4):323–6.
- Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. 2004;2285–9.
- Kim JS, Lee BH, Kim BS. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate) by Ralstonia eutropha. Biochem Eng J. 2005;23(2):169– 74.
- López-Cuellar MR, Alba-Flores J, Rodríguez JNG, Pérez-Guevara F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. Int J Biol Macromol. 2011;48(1):74–80.
- Park DH, Kim BS. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Ralstonia eutropha from soybean oil. N Biotechnol [Internet]. 2011;28(6):719–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2011.01.007
- Volova TG, Kalacheva GS, Steinbu A. Biosynthesis of Multi-Component Polyhydroxyalkanoates by the Bacterium Wautersia eutropha. Macromol Symp. 2008;269:1–7.
- 13. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Martinko JM., Stahl DA. Brock Biology of Microorganisms. Brock Biology of Microorganisms. 2014.
- Gerhardth P, Murray R, Willis A, Krieg N. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, USA; 1994.
- Mozumder SI, Garcia-Gonzalez L, Wever H De, Volcke EIP. Poly(3hydroxybutyrate) (PHB) production from CO2: Model development and process optimization. Biochem Eng J [Internet]. 2015;98:107–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.031

- Tanaka K, Ishizaki A. Production of poly-D-3-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by a two- stage culture method employing Alcaligenes eutrophus ATCC 17697(T). J Ferment Bioeng. 1994;77(4):425–7.
- Aramvash A, Shahabi ZA, Aghjeh SD, Ghafari MD. Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by Cupriavidus necator. Int J Environ Sci Technol. 2015;12(7):2307–16.
- Kumar BS, Prabakaran G. Production of PHB (bioplastics) using bioeffluent as substrate by Alcaligens eutrophus. Indian J Biotechnol. 2006;5(1):76–9.
- Cavalheiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, da Fonseca MMR. Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol. Process Biochem. 2009;44(5):509–15.
- Cavalheiro JMBT, Raposo RS, de Almeida MCMD, Teresa Cesário M, Sevrin C, Grandfils C, et al. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by Cupriavidus necator using waste glycerol. Bioresour Technol. 2012;111:391–7.
- Hafuka A, Sakaida K, Satoh H, Takahashi M, Watanabe Y, Okabe S. Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by Cupriavidus necator. Bioresour Technol [Internet]. 2011;102(3):3551–3. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.018
- Lagunes FG, Winterburn JB. Bioresource Technology Effect of limonene on the heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate production by Cupriavidus necator H16. Bioresour Technol [Internet]. 2016;221:336–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.045
- Murugan P, Chhajer P, Kosugi A, Arai T, Brigham CJ, Sudesh K. Production of P(3HB- *co* -3HHx) with Controlled Compositions by Recombinant *Cupriavidus Necator* Re2058/pCB113 from Renewable Resources. CLEAN - Soil, Air, Water [Internet]. 2016;44(9999):1–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/clen.201500714

- Vega-Castro O, Contreras-Calderon J, León E, Segura A, Arias M, Pérez L, et al. Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using Ralsthonia eutropha. J Biotechnol. 2016;231:232–8.
- 25. Peña C, Castillo T, Núñez C, Segura D. Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate and Poly-β-Hydroxyalkanoates (PHAs) by Azotobacter vinelandii. In: World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher [Internet]. México: INTECH; 2011. Available from: http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-andenvironmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technologyapplications
- Obruca S, Marova I, Snajdar O, Mravcova L, Svoboda Z. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Cupriavidus necator from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. Biotechnol Lett. 2010;32(12):1925–32.
- 27. Yu ST, Lin CC, Too JR. PHBV production by Ralstonia eutropha in a continuous stirred tank reactor. Process Biochem. 2005;40(8):2729–34.
- Yang YH, Brigham CJ, Budde CF, Boccazzi P, Willis LB, Hassan MA, et al. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by Ralstonia eutropha. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87(6):2037–45.
- Chuah JA, Yamada M, Taguchi S, Sudesh K, Doi Y, Numata K. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. Polym Degrad Stab [Internet].
   2013;98(1):331–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.09.008
- Jung Y, Lee Y. Utilization of Oxidative Pressure for Enhanced Production of Poly-P-Hydroxybutyrate and Poly ( 3-Hydroxybutyrate- 3-Hydroxyvalerate) in Ralstonia eutropha. 2000;90(3):266–70.

- Kim JH, Kim BG, Choi CY. Effect of propionic acid on poly (betahydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acid production by Alcaligenes eutrophus. Biotechnol Lett [Internet]. 1992;14(10):903–6. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF01020626
- Aramvash A, Hajizadeh-Turchi S, Moazzeni-zavareh F, Gholami-Banadkuki N, Malek-sabet N, Akbari-Shahabi Z. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in Cupriavidus necator and its characterization. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016;87:397–404. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002
- Yu J, Si Y, Keung W, Wong WKR. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by Ralstonia eutropha. Process Biochem. 2002;37(7):731–8.
- Doi Y, Tamaki A, Kunioka M, Soga K. Production of copolyesters of 3hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 1988;28(4–5):330– 4.
- 35. Yan Q, Du G, Chen J. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by Ralstonia eutropha. Process Biochem. 2003;39(3):387–91.
- 36. Ng KS, Wong YM, Tsuge T, Sudesh K. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) and poly(3hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymers using jatropha oil as the main carbon source. Process Biochem [Internet]. 2011;46(8):1572–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.04.012
- Lee WH, Loo CY, Nomura CT, Sudesh K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3hydroxyvalerate precursors. Bioresour Technol. 2008;
- Aziz NA, Sipaut CS, Abdullah AAA. Improvement of the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolyester by manipulating the culture condition. J Chem Technol

Biotechnol. 2012;87(11):1607-14.

- 39. Berezina N. Enhancing the 3-hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by Cupriavidus necator. Biotechnol J. 2012;7(2):304–9.
- García IL, López JA, Dorado MP, Kopsahelis N, Alexandri M, Papanikolaou S, et al. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Cupriavidus necator. Bioresour Technol. 2013;130:16–22.
- 41. Berezina N, Yada B. Improvement of the poly (3-hydroxybutyrate- co -3hydroxyvalerate) (PHBV) production by dual feeding with levulinic acid and sodium propionate in Cupriavidus necator. N Biotechnol. 2015;1–6.
- Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Bataille P, Ramsay JA. Production of Poly-(Hydroxybutyric-Co-Hydroxyvaleric) Acids. Appl enviromental micribiology. 1990;(July):2093–8.
- Saito Y, Nakamura S, Hiramitsu M, Doi Y. Microbial Synthesis and Properties of Poly(3-ydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Polym Int. 1996;39:169–74.
- 44. Madden LA, Anderson AJ, Asrar J. Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate- co -3hydroxyvalerate) Polymer Mixtures Produced in High-Density Fed-Batch Cultures of Ralstonia eutropha (Alcaligenes eutrophus). Macromolecules [Internet]. 1998;31(17):5660–7. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma980606w
- Du GC, Chen J, Yu J, Lun S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with Ralstonia eutropha. Biochem Eng J. 2001;8(2):103–10.
- 46. Shang L, Yim SC, Park HG, Chang HN. Sequential Feeding of Glucose and Valerate in a Fed-Batch Culture of Ralstonia eutropha for Production of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with High 3-Hydroxyvalerate Fraction. Biotechnol Prog. 2004;20(1):140–4.
- 47. Rao U, Sridhar R, Sehgal PK. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-

hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by Cupriavidus necator from spent palm oil. Biochem Eng J [Internet]. 2010;49(1):13–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.005

- Vigneswari S, Nik LA, Majid MIA, Amirul AA. Improved production of poly(3hydroxybutyrate-co-4-hydroxbutyrate) copolymer using a combination of 1,4-butanediol and butyrolactone. World J Microbiol Biotechnol. 2010;26(4):743–6.
- Barbosa M, Espinosa Hernández A, Malagón Romero D, Moreno Sarmiento N. Producción De Poli- β -Hidrobutirato (PHB) Por Ralstonia eutropha ATCC 17697. Univ Sci Rev la Fac Ciencias Pontif Univ Javeriana. 2005;10(1):45–54.
- 50. Khanna S, Srivastava AK. A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production. Biotechnol Prog. 2005;21(3):830–8.
- Mozumder SI, Wever H De, Volcke EIP. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. Process Biochem [Internet]. 2014;49(3):365–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004
- 52. Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI. Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with substrate control using on-line glucose analyzer. Enzyme Microb Technol. 1994;16(7):556–61.
- Grothe E, Moo-young M, Chisti Y. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyrate) microbial thermoplastic. Enzym Microb Technol. 1999;25:132–41.
- Tripathi AD, Srivastava SK, Singh RP. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by Alcaligenes sp. Biomass and Bioenergy [Internet]. 2013;55:243–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.017
- 55. Nikel PI, Pettinari MJ, Méndez BS, Galvagno MA. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly (3-hydroxybutyrate) production

by a recombinant Escherichia coli strain using agroindustrial byproducts. Int Microbiol. 2005;8(4):243–50.

- 56. Magallanes JF, Olivieri AC. The effect of factor interactions in Plackett-Burman experimental designs. Comparison of Bayesian-Gibbs analysis and genetic algorithms. Chemom Intell Lab Syst. 2010;102(1):8–14.
- Yolmeh M, Jafari SM. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. Food Bioprocess Technol [Internet]. 2017;10(3):413–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2
- Khanna S, Srivastava AK. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by Ralstonia eutropha. Process Biochem. 2005;40(6):2173–82.
- 59. Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. J Ind Microbiol Biotechnol. 1999;23(6):456–75.
- Song JY, Kim BS. Characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate) production by Ralstonia eutropha NCIMB 11599 and ATCC 17699. Biotechnol Bioprocess Eng. 2005;10(6):603–6.
- 61. Lütke-Eversloh T, Bergander K, Luftmann H, Steinbüchel A. Identification of a new class of biopolymer: Bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages. Microbiology. 2001;
- Ng K, Ooi W, Goh L, Shenbagarathai R, Sudesh K. Evaluation of jatropha oil to produce poly ( 3-hydroxybutyrate ) by Cupriavidus necator H16. Polym Degrad Stab [Internet]. 2010;95(8):1365–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.021
- Riedel SL, Jahns S, Koenig S, Bock MCE, Brigham CJ, Bader J, et al. Polyhydroxyalkanoates production with Ralstonia eutropha from low quality waste animal fats. J Biotechnol [Internet]. 2015;214(October):119–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.002
- 64. Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Piotrowska-Seget Z, Radecka IK. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by

cupriavidus necator. AMB Express. 2011;

- Obruca S, Petrik S, Benesova P, Svoboda Z, Eremka L, Marova I. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(13):5883–90.
- Mulchandani A, Luong JHT, Groom C. Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid by Alcaligenes eutrophus ATCC 17697. Appl Microbiol Biotechnol. 1989;30(1):11–7.
- Yousuf RG, Winterburn JB. Date seed characterisation, substrate extraction and process modelling for the production of polyhydroxybutyrate by Cupriavidus necator. Bioresour Technol [Internet]. 2016;222:242–51. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.107
- Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI. Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture of Alcaligenes eutrophus with Glucose Concentration Control. Biotechnol Bioeng. 1994;43:892–8.
- 69. Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by Ralstonia eutropha and its recombinant strain. 2004;83:79–86.
- Ishizaki A, Tanaka K. Production of poly-B-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by Alcaligenes eutrophus ATCC 17697(T). J Ferment Bioeng. 1991;71(4):254–7.
- Ishizaki A, Tanaka K. Batch culture of Alcaligenes eutrophus ATCC 17697T using recycled gas closed circuit culture system. J Ferment Bioeng. 1990;69(3):170–4.
- Khanna S, Srivastava AK. Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly(β-hydroxybutyrate). Enzyme Microb Technol. 2006;39(5):1145–51.
- 73. Khanna S, Srivastava AK. Productivity enhancement of poly-(β-

hydroxybutyrate) by fed-batch cultivation of nutrients using variable (decreasing) nutrient rate by Wautersia eutropha. Chem Eng Commun. 2008;195(11):1424–36.

 Atlic A, Koller M, Scherzer D, Kutschera C, Grillo-Fernandes E, Horvat P, et al. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by Cupriavidus necator in a multistage bioreactor cascade. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;91(2):295–304.
# 3. Materiales y Métodos

# 3.1 Fermentación de C. necator

El material microbiológico y los medios de cultivos se esterilizaron previamente en autoclave eléctrico Dolphinn 18 a 1,5 Atm y 121 °C durante 20 minutos. Todas las manipulaciones se realizaron bajo flujo laminar Casiba en condiciones de esterilidad.

#### 3.1.1 Mantenimiento de la cepa

Para la producción de biopolímeros de interés biomédico se utilizó la cepa nativa comercial *Cupriavidus necator* ATTC 17697 (American Type Collections, USA). La bacteria se mantuvo en crioviales Viabank<sup>™</sup> a -80 °C. Para preparar el inóculo se tomó una alícuota con ansa y se sembró en placa de Petri conteniendo agar nutritivo (AN) o Agar Triptona, fructosa y levadura (TFL) (1), (Tabla 3.1.1) con el agregado de agar 15 g/l. Se incubó a 30 °C durante 48 horas.

Componente	Concentración
	g/l
Triptona	5
Extracto de levadura	5
Fructosa	1
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
pH 7	

	Tabla	3.1.	1:	Medio	TFL
--	-------	------	----	-------	-----

#### 3.1.2 Preparación del inóculo

Se tomó cultivo celular de la placa de Petri con ansa y se inoculó en Erlenmeyer de 250 o 500 ml conteniendo un 20 % de medio de cultivo TFL líquido. Se incubó durante 24 horas a 30 °C y 150 rpm. El cultivo crecido de esta manera sirvió de inóculo para experimentos en escala de Erlenmeyer o biorreactor.

#### 3.1.3 Fermentación en Erlenmeyer

El inóculo se sembró del 1 al 10 % (V/V) en Erlenmeyer de 250 ml con 60 ml de medio de cultivo de sales minerales con fructosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (1,2) (Tabla 3.1.2). Se incubó a 150 rpm y 30 °C, durante 72 h.

Componente	Concentración
Componente	g/l
Fructosa	15
(NH4)2SO4	1,5
Mg(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	0,5
Sc. de microelementos	2 ml
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6
рН 7	

Tabla 3.1.2: Medio de cultivo de sales minerales con fructosa.

La solución de microelementos contiene  $FeSO_4 2 g/l$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O 0,03 g/l$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H2O 2 g/l$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O 0,01 g/l$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H2O 0,1 g/l$ ,  $H_3BO_3 0,3 g/l$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H2O 0,2 g/l$ ,  $NiCl_2 \cdot 6H2O 0,02 g/l y Na_2Mo \cdot O_4 2H2O 0.03 g /l en solución 0,1 N de HCl (1).$ 

Las concentraciones de todos los componentes del medio de cultivo inicial se optimizaron mediante la metodología de diseño de experimentos (Sección 3.3) en este trabajo de tesis.

Con el medio de cultivo optimizado se realizó el escalado del proceso de producción de biopolímero PHB a biorreactor en los modos *batch* y *fedbatch*. También, a partir de este medio optimizado, se formularon medios de cultivo con otras fuentes de carbono residuales y alternativas para la producción de PHAs por *C. necator* ATCC 17697.

#### 3.1.5 Fermentación en biorreactor

Con el fin de escalar el proceso productivo y lograr la máxima productividad del polímero se evaluaron dos tipos de estrategias fermentativas: cultivo en lote (*batch*) y cultivo alimentado (*fedbatch*). Las fermentaciones se realizaron en un biorreactor BioFlo 110 de New Brunswick Scientific (Anexo 1) con capacidad útil máxima de 6 litros. El biorreactor opera en interfaz con el software Biocommand Bioprocessing para la adquisición de datos y control de parámetros y permite el control automático de la temperatura, pH y aireación del cultivo. El medio de cultivo se preparó de la misma manera que para Erlenmeyers. Se inoculó con 5

a 10 % de la suspensión homogénea y fresca de inóculo y se incubó a 30 °C. El pH se mantuvo constante en un valor de 7 mediante la adición de solución estéril de NaOH 3 N y HCl 1 N. En ciertas ocasiones la concentración de oxígeno disuelto ( $O_2d$ ) se conservó en 20 % de saturación mediante cascada de agitación de 200 a 1000 rpm y suministro de aire estéril entre 1 y 3 LPM. El pH se determinó on-line con un electrodo de pH (Mettler-Toledo GmbH) y la concentración de  $O_2d$  por medio de una sonda polarográfica (Mettler-Toledo). La formación de espuma se evitó a través del agregado de 0,3 % (v/v) de antiespumante 289 (Sigma). La alimentación de sustrato se realizó mediante la bomba C, regulada por  $O_2d$  o por un flujo de alimentación exponencial. En este último caso el fujo viene dado por

$$\frac{\Delta F}{\Delta t} = \frac{\mu X_0 V_0}{\frac{Y_X S}{S}} e^{\mu t}$$
(3.1.1)

donde  $\Delta F$  es el volumen (I) ingresado en un período ( $\Delta t$ ), t denota el tiempo (h),

 $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa (1/h), V<sub>0</sub> y X<sub>0</sub> son el volumen útil del fermentador (I) y la biomasa (g biomasa/I), respectivamente, al momento de comenzar la alimentación exponencial, Y<sub>x/s</sub> es el rendimiento de biomasa (g biomasa/g sustrato) y S es la concentración de fructosa de la solución de alimentación (g sustrato/I).

## 3.2 Determinaciones cuantitativas

#### 3.2.1 De biomasa mediante gravimetría

El crecimiento del cultivo se determinó midiendo el peso seco celular. Se pesó la biomasa liofilizada o secada en estufa a 80 °C hasta peso constante, proveniente del medio de cultivo centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos y lavado 2 veces con agua destilada.

#### 3.2.2 De biomasa mediante densidad óptica

El crecimiento celular se estimó indirectamente por turbidimetría, registrando la DO<sub>600</sub> del cultivo en un espectrofotómetro PG- Instruments T60 UV-visible.

Este método puede aplicarse en paralelo con el método gravimétrico, con el fin de obtener la correlación entre DOfinal y concentración de biomasa por peso seco. Para esto se construyó una curva patrón para distintas concentraciones de *C. necator* ATCC 17697, donde se graficó el valor de la biomasa seca en función del valor de DOfinal. Este valor es la DO medida a 600 nm multiplicado por el factor de dilución utilizado para que la medición esté entre 0 y 1 de absorbancia. Como blanco se utilizó agua destilada (Fig. 3.2.1).



Figura 3.2.1: Curva de calibración de biomasa en función de la densidad óptica final medida a 600 nm.

Se halló una relación lineal entre la concentración de biomasa en g/l (X) con la DO final a 600 g/l, dada por la ecuación:

$$X = 0,29.$$
 DOfinal (3.2.1)

con una regresión de R<sup>2</sup>= 0,9959. De modo que, durante las fermentaciones se utilizó este método a fin de tener una medida rápida del crecimiento de la bacteria.

#### 3.2.3 Cuali-cuantitativa de PHB

#### Por microscopía óptica

Los PHAs se detectaron en las bacterias por tinción específica empleando Sudan Black como colorante de naturaleza lipofílica (3):

1. Se preparó un extendido en un portaobjeto.

2. Se sumergió en solución lipofílica de Sudan Black 0,3 % durante 10 minutos.

- 3. Se lavó con agua desionizada y se dejó secar.
- 4. Se lavó con xilol y dejó secar bajo campana de extracción.
- 5. Se tiñó con el colorante de contraste fucsina durante 10 segundos.
- 6. Se lavó con agua desionizada y se secó bajo corriente de aire.
- 7. Se realizó la observación en el microscopio óptico Mikoba equipado con cámara digital DCM 900 9M pixeles, CMOS chip. Se utilizó un aumento total de 1000X con aceite de inmersión, observándose en caso de acumulación gránulos intra-citoplasmáticos de polímero teñidos de color azul intenso y el resto del citoplasma rosado.

#### Por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para observar las células bacterianas en microscopía electrónica de transmisión (MET) se centrifugaron 4 ml de cultivo celular a 3500 rpm, la muestra se lavó con agua desionizada y luego con buffer fosfato o PBS, 0,1M, pH 7,4.

Los siguientes pasos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica (LANAIS\_MIE) del Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E De Robertis"

Para realizar la primera fijación se retiró el buffer e incubó con una solución de Glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato durante 4 horas a 4°C. Luego, se realizaron dos lavados con buffer fosfato de 15 minutos cada uno.

La segunda fijación se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 60 minutos a 4ºC. Luego se realizaron dos lavados de 15 minutos con agua bidestilada.

La deshidratación del material se procedió en alcoholes ascendentes (50°, 70°, 96°, 100°) con dos cambios de cada uno durante 15 minutos. Finalizando el proceso de deshidratación con dos cambios de acetona durante 10 minutos.

Finalmente, se realizó la inclusión en resina epoxy "Durcupan" la cual se polimeriza a 60° C durante 72 horas.

Una vez polimerizada la resina se realizaron cortes ultrafinos de 70-90 nm de espesor, por medio de un Ultramicrótomo Reichert Jung Ultracut E con navaja de vidrio. Los cortes se montaron en grillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las muestras se observaron con soporte del personal de apoyo del LANAIS MIE al MET Zeiss 109, y se tomaron fotografías digitales con cámara Gatan W10000.

### 3.2.4 Cuantitativa de PHB

Se realizó la cuantificación de ácido crotónico formado por la deshidratación del PHB con ácido sulfúrico concentrado mediante espectrofotometría en el rango de luz ultravioleta. Se realizó según el método modificado de Law y Slepecky (4). Como el máximo del barrido espectral entre 200 y 300 nm realizado para varias muestras, se obtuvo a 234 nm para las determinaciones cuantitativas de PHB se midió la absorbancia a 234 nm.

#### Digestión celular

- 1. Se colocó 1 ml del cultivo celular en tubos de vidrio y 5 ml de agua desionizada.
- 2. Se centrifugó a 3500 g durante 15 minutos a 5 °C. Se descartó el sobrenadante.
- 3. La masa bacteriana lavada se lisó con 1 ml de hipoclorito de sodio 10 % (lavandina comercial, 60 g/l de Cl) durante 45 minutos a 37 °C.
- 4. Se lavó dos veces con agua desionizada.
- 5. Se secó en estufa durante 24 horas a 80 °C.

#### Formación y cuantificación de ácido crotónico

- 1. Al polímero proveniente del tratamiento anterior, se agregaron 5 ml de solución de ácido sulfúrico 80 %.
- La solución se incubó durante 30 min en el baño seco con temperatura 100 °C.
- 3. Los tubos se enfriaron en agua a temperatura ambiente.
- Se realizaron las diluciones para que entren en el rango de absorbancia 0 – 3200 (A).
- Se leyó la absorbancia a 234 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer UV/Vis Spectrometer Lambda 35 que opera en interfaz con el software PerkinElmer UV WinLab.
- Se calculó la concentración de PHB g/l a partir de la regresión lineal dada por la curva patrón, preparada en paralelo con cada medición.

#### Curva Patrón

Se preparó una solución madre con una concentración de 0,2 mg PHB/ml de  $H_2SO_4 80\%$ . Los patrones se prepararon con diluciones de la solución madre con concentraciones de 5.10<sup>-3</sup> a 2.10<sup>-2</sup> mg PHB/ml de  $H_2SO_4 80\%$ . Se utilizó como blanco  $H_2SO_4 80\%$ . Se efectuó un barrido espectral de 200 a 300 nm para observar el máximo de absorbancia del ácido crotónico formado (Fig. 3.2.2).



Figura 3.2.2: Barrido espectral de 200 a 300 nm del ácido crotónico.

#### 3.2.5 Consumo de sustratos

Se tomaron muestras a diferentes tiempos de las fermentaciones y se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se utilizó para determinar concentraciones de sulfato de amonio y fructosa.

#### Amonio (NH<sup>+</sup>) en solución

El método utilizado se llama "el método de azul de indofenol" o "método de fenato". Se basa en la reacción de NH<sub>3</sub> en solución alcalina con fenato para producir un color azul (azul de indofenol) en presencia de un agente oxidante fuerte, tal como hipoclorito (5). Se ha considerado un volumen de muestra de 2,5 ml; las soluciones reactiva y oxidante se prepararon en el momento que se realizaban las reacciones.

Solución reactiva:

50 % de solución de nitroprusiato 5 g/l.

50 % de solución fenol 11,1 % en etanol 95 %.

Solución oxidante:

80% de solución de citrato alcalino (200 g/l de citrato trisódico y 10 g/l de NaOH).

20% de solución de hipoclorito de sodio (solución comercial, 60 g/l de Cl). Procedimiento:

1. Se prepararon diluciones de las muestras para incluirlas dentro del rango

de medición (10 - 500 µg N-NH4/I).

- 2. Se colocaron 2,5 ml de diluciones de las muestras en tubos de ensayo de vidrio libres de amonio.
- 3. Se agregaron:
  - a. 250 µl de solución oxidante.
  - b. 200 µl de solución reactiva.
- 4. Se agitaron los tubos e incubaron 20 minutos a 37 °C.
- 5. Se leyó la absorbancia a 640 nm.
- Se calculó la concentración de sulfato de amonio g/l en la muestra a partir de la regresión lineal dada por la curva patrón, preparada en paralelo con cada medición.

Curva patrón:

Para la curva de calibración se preparó una solución de NH<sub>4</sub> 100 ppm, equivalente a 0,47168 g/l de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>. Los patrones se prepararon en matraces aforados con concentraciones de 0 a 4,717 mg/l de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>. Se utilizó el mismo procedimiento que para las muestras y se empleó como blanco la reacción en agua desionizada.

#### Carbono orgánico total (TOC)

Se determinó la concentración de carbono orgánico total, C, en mg/l contenido en muestras de diferentes tiempos de una fermentación mediante el equipo TOC-L Shimadzu que opera interfaz con el software TOC-Control L/V. Se prepararon diluciones de las muestras de modo tal que entren en el rango de medición del equipo. Se construyó la curva de calibración en el rango de medición de 0 a 125 mg de carbono/l.

Para calcular la concentración de fructosa en g/l de cada muestra, se utilizó el factor de dilución (FD) aplicado y la Ecuación 3.3.1:

Fructosa (g/l) = 
$$\frac{C.1000.180}{72.FD}$$
 (3.2.2)

# 3.3 Diseño experimental estadístico

#### 3.3.1 Diseño Doehlert

Se aplicó un diseño de experimentos de Doehlert para dos factores: edad y concentración de inóculo (17-24 h y 1 – 5 %, respectivamente), en 3 y 5 niveles, 70

obteniendo un total de 7 experimentos, tal como muestra la Figura 3.3.1, a fin de encontrar el porcentaje óptimo de inóculo. Se utilizó medio TFL para sembrar el pre-inóculo y los 7 inóculos distintos, y medio mineral de sales minerales con fructosa 15 g/l como medio de cultivo donde sembrar los 7 inóculos distintos, por duplicado. De estos últimos se evaluaron las concentraciones de PHB a distintos tiempos.



Figura 3.3.1: Diseño Doehlert para edad y porcentaje de inóculo en 3 y 5 niveles, respectivamente. Cada coordenada es un punto experimental diferente.

El cálculo de la superficie de respuesta fue basado en el modelo estadístico:

$$\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2$$
(3.3.1)

Donde, X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son la edad y concentración de inóculo, respectivamente y los  $\beta$  son los coeficientes Para cada uno de los experimentos del diseño Doehlert se determinó el contenido de PHB a: 0, 24, 48 y 72 h mediante espectrofotometría. Para cada tiempo se realizó una regresión polinómica acorde al modelo estadístico planteado, obteniéndose cuatro ecuaciones y sus respectivas superficies de respuesta.

#### 3.3.2 Diseño factorial

Para analizar la influencia de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de PHB se utilizó un Diseño Factorial Completo (*Full Factorial Design* -FFD) de cinco variables en dos niveles (+ y -) con punto central (Tabla 3.4.1). Se adicionaron dos puntos con C en su nivel más bajo y más alto y los demás factores en el nivel central. Los componentes del medio de cultivo analizados eran: la concentración de fructosa, como única fuente de carbono (C); la concentración de sulfato de amonio, como única fuente de nitrógeno (N); el pH inicial del medio de cultivo; la concentración de la solución fosfatos (P); como la suma de iguales concentraciones de fosfato diácido de potasio y fosfato

monobásico de sodio y la concentración de solución micro-elementos (M). Excepto la concentración de sulfato de magnesio, que se utiliza en muy bajas cantidades, se analizaron todas las variables del medio de cultivo.

Tabla 3.3.1: Niveles codificados de las variables del FFD: concentración de fructosa (C); concentración de sulfato de amonio (N); pH inicial del medio; concentración de la solución de fosfatos (P); concentración de la solución de micro-elementos (m).

		Niveles				
Variable	Unidades	-	0	+		
С	g/l	15	20	25		
Ν	g/l	1.5	2.25	3		
pН	-	6.5	7	7.5		
Р	g/l	4	8	12		
Μ	ml/l	1	2	3		

La cantidad de combinaciones está dada por 2<sup>k</sup>, donde k es la cantidad de factores, por lo tanto: 2<sup>5</sup>=32 combinaciones. El punto central se realizó por triplicado. Debido a la imposibilidad de realizar todas las combinaciones al mismo tiempo, se fraccionó el trabajo en dos bloques. El diseño fraccionario elegido fue de resolución V (RV), (Tabla 3.4.2). Cada condición se replicó realizando ensayos por duplicado para cada caso, salvo el punto central para el cual se consideraron 6 réplicas para evaluar adecuadamente la variabilidad de los resultados.

Exp	С	Ν	рН	Р	М	Ex	p C	Ν	рН	Р	М
n°	g/l	g/l	-	g/l	ml/l	nʻ	° g/l	g/l	-	g/l	ml/l
1a	15	1.5	6.5	4	3	11	o 15	1.5	6.5	4	1
2a	15	1.5	6.5	12	1	21	o 15	1.5	6.5	12	3
3a	15	1.5	7.5	4	1	31	o 15	1.5	7.5	4	3
4a	15	1.5	7.5	12	3	41	o 15	1.5	7.5	12	1
5a	15	3.0	6.5	4	1	5t	o 15	3.0	6.5	4	3
6a	15	3.0	6.5	12	3	61	o 15	3.0	6.5	12	1
7a	15	3.0	7.5	4	3	71	o 15	3.0	7.5	4	1
8a	15	3.0	7.5	12	1	81	o 15	3.0	7.5	12	3
9a	25	1.5	6.5	4	1	9k	o 25	1.5	6.5	4	3
10a	25	1.5	6.5	12	3	10	b 25	1.5	6.5	12	1
11a	25	1.5	7.5	4	3	11	b 25	1.5	7.5	4	1
12a	25	1.5	7.5	12	1	12	b 25	1.5	7.5	12	3
13a	25	3.0	6.5	4	3	13	b 25	3.0	6.5	4	1
14a	25	3.0	6.5	12	1	14	b 25	3.0	6.5	12	3
15a	25	3.0	7.5	4	1	15	b 25	3.0	7.5	4	3
16a	25	3.0	7.5	12	3	16	b 25	3.0	7.5	12	1
17a	20	2.3	7.0	8	2	17	b 20	2.3	7.0	8	2
18a	20	2.3	7.0	8	2	18	b 20	2.3	7.0	8	2
19a	20	2.3	7.0	8	2	19	b 20	2.3	7.0	8	2

Tabla 3.3.2: Matriz de diseño FFD, izquierda: bloque a y derecha: bloque b

Se midieron las concentraciones de PHB, biomasa, pH y fructosa a las 72 horas de fermentación. La producción de PHB en g/l a las 72 h se consideró la respuesta del diseño.

#### 3.3.3 RSM

Los datos experimentales obtenidos del diseño se analizaron mediante el procedimiento de regresión de la superficie de respuesta utilizando la siguiente ecuación polinómica de segundo orden:

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$
(3.3.2)

donde Yi es la respuesta prevista por el modelo, xi las variables independientes analizadas,  $\beta$ s los coeficientes estimados:  $\beta_0$ , el término de compensación,  $\beta$ i, los coeficientes lineales,  $\beta_{ii}$ , los coeficientes cuadráticos y  $\beta_{ij}$ , los coeficientes de interacción. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para estimar estos parámetros estadísticos. La importancia de la Ecuacion 3.3.2 y sus términos se evaluaron mediante la prueba F y la calidad del ajuste mediante el coeficiente de correlación, R<sup>2</sup>. Se utilizó el software Minitab 14 para los cálculos y gráficos de las gráficas de superficie.

#### 3.3.4 Validación

Se utilizaron gráficos 3D para analizar los componentes optimizados del medio que influyen en la respuesta del diseño. Se consideró el máximo y dos puntos en su entorno para validar adecuadamente el modelo. Cada condición se realizó por duplicado.

Se utilizaron gráficos 3D para analizar los componentes optimizados del medio que influyen en la respuesta del diseño. La validación de las condiciones óptimas previstas a través de RSM es crucial (6). Para la validación se analizaron 6 fermentaciones en Erlenmeyer: una con el medio de cultivo de la máxima producción de PHB y dos con la producción de PHB alrededor del máximo -cada condición se realizó por duplicado

# 3.3.5 Cálculo de rendimientos y productividades de los puntos experimentales del diseño

Se calcularon los rendimientos de  $Y_{P/X} Y_{P/S} Y_{X/S} y$  la productividad volumétrica de PHB para los puntos experimentales del diseño, a fin de analizar la influencia de los componentes del medio de cultivo, el consumo de la fuente de carbono y el pH final alcanzado sobre la producción de PHB por *C. necator* ATCC 17697 a las 72 horas de fermentación.

# 3.4 Extracción, purificación y caracterización del polímero obtenido

#### 3.4.1 Separación

Al finalizar la fermentación, los microorganismos se cosecharon por centrifugación en una centrífuga refrigerada Presvac INS-DCA-300RTV a 3500 rpm durante 15 minutos a una temperatura entre 5 y 15 °C. La biomasa centrifugada se lavó con agua desionizada y se congeló a -20 °C. Luego se liofilizó durante 24 horas a (-83) °C y 3x10 <sup>-3</sup> mbar (Labconco Corp., USA).

#### 3.4.2 Extracción

#### Extracción mediante solventes orgánicos

La biomasa liofilizada se pesó y se colocó en cartuchos de celulosa AquaLab<sup>®</sup> dentro de un aparato de extracción continua de Soxhlet y se extrajo el biopolímero durante 24 horas a 70°C utilizando cloroformo (Merck) como solvente de extracción, en una relación de biomasa y solvente de 1:10.

#### Extracción mediante hipoclorito de sodio

El polímero bacteriano también se extrajo mediante un oxidante fuerte. La biomasa liofilizada se incubó en una solución al 10 % de hipoclorito de sodio durante 40 minutos, luego se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos. El sebrenadante se lavó dos veces, para ello se agregó agua desionizada y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones.

#### 3.4.3 Purificación

El extracto clorofórmico se concentró en evaporador rotatorio Senco R206B. Se concentró el volumen de 250 ml a 50 ml.

Para la caracterización físico-química del biopolímero, se realizaron dos etapas de purificación. En la primera etapa, el extracto clorofórmico concentrado se precipitó con metanol frio a 4 °C, posteriormente se filtró con un filtro de cerámica sinterizado o de papel Watman N°1. La segunda etapa de purificación se realizó con hexano repitiendo el procedimiento descripto anteriormente. El polímero obtenido se secó en estufa a 60 °C hasta llegar al peso constante.

#### 3.4.4 Caracterización físico - química

#### DSC

Las propiedades térmicas del polímero fueron evaluadas por el método de calorimetría diferencial de barrido (en inglés, *Differential Scanning Calorimetry* o DSC) utilizando un calorímetro DSC-Q 2000 (Thermo Analytics). Para cada análisis térmico se utilizaron muestras de 10 mg. Las muestras acondicionadas se sellaron en bandejas de aluminio, se equilibraron a -90 °C, se mantuvieron isotérmicas durante 5 minutos, se calentaron de -90 °C a 200 °C y se mantuvieron a 200 °C durante 5 minutos antes de enfriarse a -90 °C. Las muestras se mantuvieron a -90 °C durante 5 minutos y se recalentaron a 200 °C. Las tasas de calentamiento y enfriamiento fueron de 10°C min-1 y este análisis térmico se realizó bajo flujo de N<sub>2</sub> a 80 ml min-1. El primer ciclo de calentamiento se realizó para borrar el historial térmico del polímero.

La cristalinidad del componente PHB (Xc) se calculó mediante la Ecuación siguiente (3.5.1):

$$Xc = \left(\frac{\Delta H_{m}}{\Delta H_{m}^{0}}\right) \times 100\%$$
(3.4.1)

donde  $H_m$  es la entalpía de fusión aparente y  $H^{0_m}$  es el valor teórico de la entalpía de fusión termodinámica obtenida a partir de un polímero 100% cristalino (146,6 J/g) (7).

#### ATR-FTIR

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (en inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* o FTIR) se utilizó para el análisis cualitativo del PHA bacteriano. Los análisis se realizaron en el modo de reflectancia total atenuada (en inglés, *Attenuated Total Reflectance* ATR) mediante el análisis directo de polvo PHB en cristal ZnSe. El barrido espectral se llevó a cabo entre los 4000 y 400 cm<sup>-1</sup> en un espectrofotómetro FTIR-ATR NICOLET 8700 20 SXC. Se promediaron 32 scans con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

#### $RMN \, de^{\,{}^{}}H \, y^{\,{}^{_{I3}}}C$

La estructura molecular de los PHAs producidos se determinó mediante el análisis de espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en un espectrómetro Bruker BioSpin

GmbH a 500 MHz (<sup>1</sup>H) y 126 MHz (<sup>13</sup>C). Las muestras se prepararon disolviendo 15 a 20 mg de muestra en 1 a 1,5 ml de cloroformo deuterado (Sigma-Aldrich).

# 3.5 Membranas de PHB

#### 3.5.1 Elaboración

Se fabricaron membranas por disolución y evaporación de solvente. El polímero se diluyó en cloroformo al 4 % con agitación continua a 70 °C. Se colocó la solución de PHA en una caja de Petri y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente durante 24 horas bajo campana.

#### 3.5.2 Respuesta mecánica

Para estudiar el comportamiento mecánico de las membranas elaboradas se realizaron ensayos de tracción según la norma ASTM D 1708 (8), con el equipo DMA Q800 de TA Instruments. Para realizar los ensayos se cortaron muestras rectangulares de 6 mm x 18 mm y se sometieron a una rampa de estiramiento de 0,5 %/minuto a 25 °C. Se estudiaron los siguientes parámetros característicos de comportamiento mecánico: módulo tensil, tensión máxima y deformación máxima.

#### 3.5.3 Citotoxicidad

Para determinar el efecto citotóxico del polímero PHB y de las membranas elaboradas se realizaron los ensayos en forma indirecta y directa, respectivamente, según norma ISO 10993-5 (9).

La evaluación cualitativa se realizó a través de un microscopio de óptica invertida NIKON TE2000-U, equipado con cámara CCD (Orca-AG, Hamamatsu) acoplada al microscopio y controlada por el programa Metamorph (Molecular Devices), utilizando un objetivo 10X.

# 3.6 Producción y degradación intracelular de PHB

#### 3.6.1 Estrategias de cultivo

Para estudiar el proceso de formación y degradación de gránulos de PHB en el citoplasma celular, el cultivo de *C. necator* ATCC 17697 se incubó en diferentes

medios de cultivo durante 170 h a 30 °C y 150 rpm. Las primeras 72 h en medio optimizado para la evaluar la cinética de producción de PHB y luego 98 h en medio optimizado sin fructosa y exceso de N (2,25 g/l) para evaluar la degradación intracelular.

Se preparó el inóculo del cultivo con la bacteria crecida en medio TFL durante 24 h. Las células del inóculo se recolectaron por centrifugación, se lavaron con agua destilada y transfirieron al medio de cultivo optimizado para la producción de PHB. Para la utilización del PHB, se cosecharon y lavaron las células de 72 h. El sobrenadante obtenido después de centrifugar las células lavadas se transfirió al medio fresco de utilización de PHB y se incubó durante 98 h. Se midieron las concentraciones de fructosa, sulfato de amonio, biomasa y PHB, y se prepararon muestras para observar en microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

#### 3.6.2 Procesamiento de imágenes MET

Las imágenes tomadas por MET se sometieron a una serie de pasos a fin de determinar áreas celulares y de los gránulos. El tamaño de las células por la medición del área que ocupa cada una en el corte de la muestra se procesó de la siguiente manera:

1. Filtrado y aumento del contraste de la imagen con Matlab.

2. Binarización con método de Otsu con Matlab.

3. Rellenado y limpieza mediante elementos estructurales con Matlab.

4. Partículas obtenidas con comando "analiza particles" Image-J.

Las imágenes se sometieron a pasos similares para determinar el tamaño de los gránulos de PHB:

1. Binarización de la imagen sin rellenado de agujeros mediante el software Matlab.

2. Superposición de imagen TEM original y la imagen binarizada mediante software Matlab.

3. Acondicionamiento imagen Image-J.

4. Partículas obtenidas con comando "analize particles" Image-J.

Esta tarea se realizó en colaboración con la Ing. Biomédica Ana Heidenreich.

# 3.7 Referencias

- Barbosa M, Espinosa Hernández A, Malagón Romero D, Moreno Sarmiento N. Producción De Poli- β -Hidrobutirato (PHB) Por Ralstonia eutropha ATCC 17697. Univ Sci Rev la Fac Ciencias Pontif Univ Javeriana. 2005;10(1):45–54.
- Wu W, Lai SY, Jang MF, Chou YS. Optimal adaptive control schemes for PHB production in fed-batch fermentation of Ralstonia eutropha. J Process Control [Internet]. 2013;23(8):1159–68. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprocont.2013.07.006
- Gerhardth P, Murray R, Willis A, Krieg N. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, USA; 1994.
- Law JH, Slepecky RA. A Rapid Spectrophotometric Assay of Alpha, Beta-Unsaturated Acids and Beta-Hydroxy Acids. Anal Chem. 1960;32(12):1697–9.
- Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M. Methods of Seawater Analysis: Third, Completely Revised and Extended Edition. Methods of Seawater Analysis: Third, Completely Revised and Extended Edition. 2007. 1-600 p.
- Yolmeh M, Jafari SM. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. Food Bioprocess Technol [Internet]. 2017;10(3):413–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2
- Lüpke T, Radusch HJ, Metzner K. Solid-state processing of PHB-powders. Macromol Symp. 1998;127:227–40.
- ASTM D1708-13. Standard test method for tensile properties of plastics by use of microtensile specimens. Am Soc Test Mater. 2014;
- ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices part 5 Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Iso 10993-5:1992 2009 p. 34.

# 4. Resultados y Discusión

# 4.1 Perfil típico del cultivo de C. necator ATCC 17697

Las pruebas preliminares para estudiar el crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 en medio mineral con fructosa o glucosa (15 g/l) determinaron la evolución de biomasa y fuente de carbono que se ilustra en la Fig. 4.1.1.



Figura 4.1.1: a) Producción de biomasa de *C. necator* ATCC 17697 en medio mineral con fructosa ( $\blacklozenge$ ) y glucosa ( $\Diamond$ ); b) Consumos de fructosa ( $\blacktriangle$ ) y glucosa (△).

*C. necator* ATCC 17697 no mostró consumo de glucosa y crecimiento hasta las 28 h. A las 52 h el cultivo comenzó consumir la fuente de carbono y crecer lentamente. A las 72 h logró consumir 5 g/l de glucosa con poca producción de biomasa de 0,64  $\pm$  0,18 g/l y un rendimiento de biomasa en función de glucosa (Y <sub>x/S2</sub>) de 0,11 g/g.

Un perfil diferente se obtuvo para el crecimiento de cultivo en el medio mineral con fructosa, donde se produjo  $5,35 \pm 0,10$  g/l de biomasa con un consumo total de substrato durante las 72 h. El rendimiento de biomasa en función de fructosa (Y<sub>X/S1</sub>) alcanzó el máximo de 0,39 g/g a las 52 h. El crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 y su rendimiento en función del sustrato es muy superior en el medio con fructosa que con glucosa. Por lo tanto, se seleccionó fructosa como fuente de carbono de grado analítico para el crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 y producción de PHB.

Para obtener el perfil típico de crecimiento y acumulación de PHB, se realizó la fermentación de *C. necator* ATCC 17697 en medio mineral con fructosa 15 (g/l) como fuente de carbono y sulfato de amonio 1,5 (g/l) como fuente de nitrógeno (Fig. 4.1.2). Se monitoreó el consumo de fructosa, sulfato de amonio, descenso de pH, producción de biomasa y acumulación de PHB a intervalos de tiempos regulares.



Figura 4.1.2: Perfil de crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 en medio de cultivo con fructosa 15 g/l, incubada a 30 °C, 150 rpm, durante 72 horas, donde ( $\blacklozenge$ ) biomasa total, ( $\circ$ ) biomasa residual y ( $\bullet$ ) PHB, ( $\blacksquare$ ) sulfato de amonio, ( $\blacktriangle$ ) fructosa y ( $\Box$ ) pH.

Según la curva de biomasa residual, se observó una fase lag de 6 horas, luego comenzó la fase exponencial, hasta que finalmente, entre las 50 y 72 horas el cultivo entró en fase estacionaria. El consumo de fructosa y de sulfato de amonio correlacionaban con el crecimiento bacteriano y la consecuente acumulación de polímero. El pH disminuyó a lo largo de todo el proceso fermentativo. La acumulación de PHB comenzó con la fase exponencial y sigue aumentando en la fase estacionaria. En esta etapa el sulfato de amonio ya está agotado y se observó un notable consumo de fructosa. La biomasa total aumentó, desde las 53 hasta las 72 horas, debido a la acumulación de PHB dentro de las células,

cuando la biomasa residual se mantiene constante. Por lo tanto, el crecimiento de *C. necator* ATCC 17697, puede dividirse en tres etapas, una primera fase lag, una segunda fase de crecimiento bacteriano con acumulación de PHB y una tercera fase de acumulación de PHB. En esta etapa, la división celular ya finalizó y las células están en un metabolismo de acumulación de polímero intracelular, inducido por el estrés de limitación de N y el exceso de la fuente de carbono (1).

Las micrografías TEM de *C. necator* cultivado durante 72 h revelaron la formación de 2 a 4 gránulos de PHAs de forma esférica con diámetro máximo de 0,3 µm. Se observó la coalescencia de gránulos, que podían dar lugar a un granulo único de 0,51 µm de diámetro (Fig. 4.1.3).



Figura 4.1.3: Micrografía TEM de los gránulos intracelulares de PHAs acumulados en las células de *C. necator* ATCC 17697 durante 72 h (20000X).

La productividad ( $P_{PHB}$ ), el rendimiento de producto en función de biomasa ( $Y_{P/X}$ ) y el rendimiento de producto en función de fructosa ( $Y_{P/S}$ ) son máximos a las 72 h en el final de la fase de acumulación del polímero, con valores de 0,34 g/g y 0,14 g/g y 0,03 g/(I.h), respectivamente. En cambio, el rendimiento  $Y_{X/S}$  es máximo a las 48 h, con un valor de 0,47 g/g, en la fase de crecimiento bacteriano (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1: Rendimientos y productividades a distintos tiempos de cultivo *C. necator* ATCC 17697 (escala de Erlenmeyer).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	$Y_{\text{P/S}}$	Y <sub>X/S</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
24	0,27	0,11	0,39	0,03
48	0,23	0,11	0,47	0,02
72	0,34	0,14	0,42	0,03

Por lo tanto, se seleccionó el tiempo de incubación de 72 horas para el estudio de optimización de los componentes del medio de cultivo.

#### 4.1.1 Referencias

1. López-Cuellar MR, Alba-Flores J, Rodríguez JNG, Pérez-Guevara F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. Int J Biol Macromol. 2011;48(1):74–80.

# 4.2 Producción de PHB en Erlenmeyer

El inóculo y las variables del medio de cultivo con fructosa se optimizaron mediante diseño de experimentos. Una de las opciones más populares es el diseño Plackett-Burman, como método de selección de las variables principales, seguido de un método de optimización de los factores principales. Sin embargo, este diseño de selección solo puede estimar los factores principales, y los términos que toman en cuenta las asociaciones entre ellos se confunden con los efectos principales u otras asociaciones, pero no se determinan individualmente (2). La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un tipo de técnica estadística para diseñar experimentos, evaluar la importancia relativa de varias variables independientes y determinar las condiciones óptimas para las respuestas deseables (3). En este trabajo se optimizó inicialmente el inóculo mediante el diseño Doehlert acoplado a RSM y luego se buscaron las variables significativas de los componentes del medio de cultivo y se optimizaron las mismas mediante un diseño factorial completo (*"Full Factorial Design"* o FFD), acoplado a la metodología RSM.

#### 4.2.1 Análisis y optimización del inóculo - diseño Dohelert

Se aplicó un diseño de experimentos de Doehlert para optimizar dos variables del inóculo, su edad (E) y porcentaje (P), al momento de ser inoculados en el medio de cultivo (Ver sección 3.3.1). Para cada tiempo (0, 24, 48 y 72 h) se realizó una regresión polinómica acorde al modelo estadístico planteado, obteniéndose cuatro ecuaciones y sus respectivas superficies de respuesta (Figuras 4.2.1 y 4.2.2).

Las ecuaciones polinómicas obtenidas son las siguientes:

PHB<sub>0</sub> = 0,037+ 0,009.E + 0,026.P + 0,006.E.P - 0,013.E<sup>2</sup> + 0,003.P<sup>2</sup>

La superficie a tiempo 0 refleja la cantidad de PHB acumulado en las células sembradas en el inóculo. (Fig. 4.2.1 a)

PHB<sub>24</sub> = 0,710 - 0,043.E + 0,068.P + 0,166.E.P - 0,064.E<sup>2</sup> - 0,384.P<sup>2</sup>

A las 24 horas la producción de PHB se vio influenciada principalmente por el valor cuadrático del porcentaje de inóculo, como se observa claramente en la fig. 4.2.1 b.

 $PHB_{48} = 2,225 + 0,063.E - 0,126.P + 0,337.E.P - 0,074.E^2 - 0,147.P^2$ 

Luego, a las 48 horas, la asociación de ambos factores influyó en la producción. (Fig. 4.2.1 c)



PHB<sub>72</sub> = 2,133 - 0,003.E + 0,031.P + 0,189.E.P + 0,58.E<sup>2</sup> + 0,364.P<sup>2</sup>

Figura 4.2.1: Superficies de respuesta de diseño Doehlert: a) acumulación de PHB a las 0 horas, b) a las 24 horas, c) a las 48 horas y d) a las 72 horas. Cada uno de los puntos experimentales se visualizan en cada una de las superficies de respuesta.

A las 72 horas de cultivo, en el punto central del diseño, la acumulación de PHB comenzó a disminuir debido a la degradación intracelular de PHB producida en la fase estacionaria (Fig. 4.2.1 d).

La acumulación de PHB aumenta a medida que progresa la fermentación, puede observarse en la relación entre las superficies de respuesta que se muestra en la Figura 4.2.2. Dado que el máximo se halla en el borde del diseño, se estudió si el crecimiento y producción de PHB eran mayores con mayores concentraciones de inóculo (7 % y 10 %); no se observaron mayores

concentraciones de biomasa ni de PHB. Por lo tanto, para los siguientes experimentos se utilizó el inóculo de 24 h al 5 %.



Figura 4.2.2: Superficies de acumulación de PHB a las 0, 24, 48 y 72 h.

#### 4.2.2 Evaluación y optimización del medio del cultivo - FFD y RSM

Se realizó la evaluación y optimización los componentes del medio de cultivo para la producción de PHB por *C. necator* mediante el diseño de experimentos FFD (Ver sección 3.3.2). De los componentes del medio de cultivo utilizado para la bacteria *C. necator* ATCC 17697 se seleccionaron la concentración de fructosa, como única fuente de carbono (C), la concentración de sulfato de amonio, como única fuente de nitrógeno (N), el pH inicial del medio de cultivo, la concentración de la solución fosfatos (P) (como la suma de iguales concentración de solución micro-elementos (M). Excepto la concentración de sulfato de sulfato de magnesio, que se utiliza en muy bajas cantidades, se analizaron todas las variables del medio de cultivo.

La Tabla 4.2.1 muestra los valores de los coeficientes en unidades codificadas y no codificadas de la ecuación polinómica de segundo orden. Se utilizó el análisis ANOVA para estimar los parámetros estadísticos, con un valor de significación p<0,05.

La bondad de ajuste del modelo se puede comprobar por la variabilidad porcentual en los valores y que se explica por el modelo ( $R^2$ ) y por  $R^2$  ajustado ( $R^2$  Aj.).  $R^2$  cae entre 0 y 1.  $R^2$  Aj. es el valor de  $R^2$ , ajustado hacia abajo para un mayor número de variables en el modelo, lo cual es útil que  $R^2$  para evaluar el

ajuste de un modelo de regresión múltiple. Normalmente,  $R^2 > 0.9$  se considera un modelo de correlación muy alta, y si  $0.7 < R^2 < 0.9$  se considera un modelo de correlación alta (4.5). El ajuste  $R^2$  de 80.6 significa que el modelo encajaba muy bien y puede predecir satisfactoriamente la respuesta experimental.

Tabla 4.2.1 Análisis estadístico de las variables analizadas en el diseño experimental FFD. La superficie de respuesta se obtiene con los coeficientes de las variables en las unidades codificadas. Concentración de fructosa (C); concentración de sulfato de amonio (N); pH inicial del medio; concent ración de la solución de fosfatos (P); concentración de la solución de microelementos (M).

Variable	Coeficientes en unidades cod.	peficientes en nidades cod. Error estándar		Coeficientes en unidades no cod.
Constante	4.1493	0.19137	<0.001	-39.3042
С	0.0726	0.05652	0.204	2.5411
Ν	-0.5674	0.0586	<0.001	-2.8322
рН	0.5052	0.0586	<0.0001	2.0879
Р	0.0898	0.0586	0.131	1.4618
М	0.0905	0.0586	0.128	-1.3090
C*C	-1.7424	0.28408	<0.001	-0.0697
N*N	-0.1797	0.21797	0.413	-0.3195
C*N	0.0027	0.0586	0.963	0.0007
C*pH	0.1007	0.0586	0.091	0.0403
C*P	-0.0490	0.0586	0.407	-0.0025
C*M	-0.0064	0.0586	0.913	-0.0013
N*pH	-0.1090	0.0586	0.068	-0.2907
N*P	-0.1143	0.0586	0.056	-0.0380
N*m	0.0651	0.0586	0.271	0.0868
pH*P	-0.3839	0.0586	<0.001	-0.1920
pH*M	0.0767	0.0586	0.196	0.1534
P*M	0.0780	0.0586	0.188	0.0195
R <sup>2</sup> =85.10%	R <sup>2</sup> Aj.=80.60%	SD=0.4688		

Es importante señalar que no todas las variables afectan el desempeño de la misma manera. Algunos pueden tener una influencia fuerte, media o nula en el rendimiento de la producción (6).

El modelo de mejor ajuste resultó cuadrático en C, lineal en N y pH y con interacción en pH y P, siendo el pH el más significativo (p<0.0001). La interacción entre N y P se encuentra en una situación límite (p=0.056). La variable M resultó no significativa, junto con todas sus interacciones. Por lo tanto, una concentración mínima y necesaria de solución de microelementos en el medio de cultivo de *C. necator* ATCC 17697, es suficiente para obtener una óptima concentración de biomasa y PHB. Este resultado difiere de lo obtenido por Grothe y colaboradores con un diseño similar pero con otra especie, *Alcalígenes latus*, donde a partir de las mismas variables, la solución de microelementos resultó una de las variables significativas (7).

La estandarización de los coeficientes a través de la expresión de las variables codificadas permite comparar las magnitudes de los coeficientes y establecer cuánto influyen en la respuesta. El término constante indica la producción de PHB en el centro del diseño. La variable con el coeficiente estandarizado de mayor magnitud, resultó el carbono en su término cuadrático (-1.7424). N y pH tienen coeficientes estandarizados de valores similares, aunque de signos contrarios (-0.5674 y 0.5052 respectivamente). Alto pH y baja concentración de N tienen la misma influencia en la producción de polímero dentro de los límites utilizados en el diseño. La ecuación polinómica ajustada se representa mediante gráficos de superficie tridimensional para visualizar la relación entre la respuesta y los niveles experimentales de cada factor utilizado en el diseño. Cada superficie se construyó utilizando dos variables significativas, con valores fijos para las demás. Los resultados resumidos en la Tabla 4.2.1 se ilustran en la Figura 4.2.3.

La producción de PHB se incrementa a valores altos de pH (Fig. 4.2.3 a) y valores bajos de N (Fig. 4.2.3 b). La única interacción significativa es entre P y pH. De hecho, cuando el valor del pH es mínimo y la concentración de P aumenta, la producción de PHB también aumenta. Esta pendiente positiva disminuye a medida que aumenta el pH. Cuando el pH alcanza su valor más alto, la pendiente de producción de PHB en función de P se vuelve negativa (Fig. 4.2.3 c). El factor asociado a la contribución cuadrática de la fuente de carbono tiene su máximo en las proximidades del punto central. Así, la producción máxima de PHB se produce cuando la variable fructosa tiene un valor de 20 g/l (Fig. 4.2.3 a, b).



Figura 4.2.3: Superficies de respuesta del diseño FFD. Producción de PHB en función de C y pH (a) en función de C y N (b) y en función de P y pH (c). Coordenadas para la zona de máxima producción de PHB (d).

El modelo ajustado presenta un máximo en C=20,4, N=1,50, pH=7,5, P=8,74, M=2,45 con un valor máximo previsto de PHB =  $5,17 \pm 0,62$ . Se observa que el punto de producción óptima de PHB se encuentra dentro de la región experimental (Fig. 4.2.3 d).

#### 4.2.3 Validación

La validación de las condiciones óptimas previstas a través de RSM es crucial (8). Para ello, es importante que la evaluación del medio de cultivo optimizado se realice en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para obtener los datos experimentales del RSM. Vale la pena notar que las

fermentaciones en biorreactores no pueden ser consideradas para la validación ya que conducen a producciones de PHB diferentes a nuestros datos experimentales porque las estrategias de control son modificadas, por ejemplo, regulación del pH, agitación, aireación, etc. (5).

Para validar el modelo se consideraron tres puntos: el máximo y dos puntos en su entorno, cada condición se realizó por duplicado en Erlenmeyer, bajo las mismas condiciones de cultivo que en el diseño experimental. Los resultados experimentales se encuentran dentro de los límites del intervalo de confianza para el valor predicho (Tabla 4.2.2).

Tabla 4.2.2: Validación del modelo de superficie de respuesta, junto a los valores experimentales, para dichos puntos.

С	Ν	pН	Р	Μ	Valor predicho	Valor experimental
g/l	g/l	-	g/l	g/l	g/l	g/l
20	1.5	7	8	2	4.35 ± 0.59	4.39 ± 0.07
20	3	7	8	2	$3.40 \pm 0.59$	3.50 ± 0.29
20	1.5	7.5	8.75	2	5.17 ± 0.62	4.59 ± 0.04

El valor experimental del punto optimizado de 4,6 g/l de PHB, correspondiente a un contenido de PHB del 70 %, es el máximo valor obtenido experimentalmente en todo el diseño (Tabla 4.2.3).

#### 4.2.4 Análisis de rendimientos y productividades

En la Tabla 4.2.3.a se presenta la matriz del diseño factorial completo y el punto optimizado y validado. Se eliminó de la matriz la variable M, por ser no significativa, según los resultados del parágrafo anterior. La Tabla 4.2.3.b muestra los valores de las mediciones del cambio de pH y fructosa, y de la producción de biomasa y PHB a las 72 horas de fermentación de los puntos experimentales. En la Tabla 4.2.3.c se presentan los rendimientos y la productividad calculados de cada uno de los procesos.

a)					b)					c)			
Exp	С	Ν	pН	Р	∆pH	$\Delta C$	Х	PHB	-	Y <sub>P/X</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>	$\mathbf{P}_{PHB}$
-	g/l	g/l	-	g/l	-	g/l	g/l	g/l	-	g/g	g/g	g/g	g/l/h
С	20	2.25	7	8	0.9	18.7	6.8	4.0		0.59	0.21	0.36	0.06
1	15	1.5	6.5	4	2.3	8.5	2.4	1.3		0.55	0.16	0.28	0.02
2	15	1.5	6.5	12	0.4	14.7	4.2	3.1		0.73	0.21	0.29	0.04
3	15	1.5	7.5	4	1.2	14.3	5.2	3.1		0.60	0.22	0.36	0.04
4	15	1.5	7.5	12	0.5	13.3	5.1	2.8		0.54	0.21	0.38	0.04
5	15	3	6.5	4	2.2	7.8	2.3	1.3		0.58	0.17	0.29	0.02
6	15	3	6.5	12	1.3	13.8	4.7	1.4		0.30	0.10	0.34	0.02
7	15	3	7.5	4	2.9	14.5	5.2	2.4		0.46	0.17	0.36	0.03
8	15	3	7.5	12	1.2	13.8	4.7	1.0		0.21	0.07	0.34	0.01
9	25	1.5	6.5	4	2.2	8.9	2.5	1.4		0.57	0.16	0.28	0.02
10	25	1.5	6.5	12	0.4	10.6	4.8	2.8		0.58	0.27	0.46	0.04
11	25	1.5	7.5	4	1.3	18.1	6.6	4.5		0.68	0.25	0.36	0.06
12	25	1.5	7.5	12	0.5	15.5	5.4	2.8		0.51	0.18	0.35	0.04
13	25	3	6.5	4	2.2	10.0	2.2	1.1		0.51	0.11	0.22	0.02
14	25	3	6.5	12	0.6	11.7	4.0	1.1		0.27	0.09	0.34	0.01
15	25	3	7.5	4	3.3	15.2	4.8	2.1		0.44	0.14	0.31	0.03
16	25	3	7.5	12	0.9	18.5	8.0	2.4		0.30	0.13	0.43	0.03
Ор	20	1.5	7.5	8.75	0.9	14.7	6.5	4.6		0.70	0.31	0.44	0.06

Tabla 4.2.3: a) Matriz de diseño: Exp, número de experimento (c, punto central, Op; punto optimizado. b) Mediciones analíticas de las fermentaciones a las 72hs: cambio de pH del medio ( $\Delta$  pH), fructosa consumida ( $\Delta$ C), biomasa total (X), producción de PHB. c) Rendimientos y productividades de los procesos fermentativos.

Los protones (H+) se producen durante el crecimiento de la biomasa, disminuyendo el pH de la solución del medio mineral; por lo tanto, el medio necesita ser neutralizado usando tampones alcalinos o de fosfato para mantener el pH en el nivel óptimo para el crecimiento de *C. necator* (9). Mediante el análisis RSM, la interacción entre el pH inicial y los amortiguadores de fosfato resultó significativa. A continuación, se analiza la influencia de estas variables en el pH final, el consumo de fructosa, la biomasa y la producción de PHB, así como el rendimiento y la productividad de los valores experimentales.

En todos los experimentos impares la concentración de P está en su nivel menor. Los experimentos 1, 5, 9 y 13 donde el pH inicial es 6,5, el pH final llega a valores muy bajos, cercanos a 4, con la mínima producción de biomasa y como consecuencia una baja producción de PHB, 2,2-2,5 g/l y 1,1-1,5 g/l, respectivamente. Esto también coincide con el poco consumo de fructosa en los mismos, entre 7,8 y 10 g/l. En los experimentos 3,7, 11 y 15 el pH inicial es de 7,5, lo que permite una buena producción de biomasa y PHB, 4,8-6,6 y 2,1-4,5 g/l, respectivamente, consecuente con un alto consumo de fructosa 14,3-18,1 g/l. Al comenzar a pH más alto, permite que el pH permanezca prácticamente constante durante más tiempo, por lo que se supone que la caída repentina del pH se produce hacia el final de la fermentación, sin afectar a la producción de biomasa. Por lo tanto, un pH inicial de 6,5 y el rápido descenso a un pH cercano a 4, limita el crecimiento bacteriano y producción de PHB. Esto coincide con un estudio de Beaulieu y colaboradores, quienes reportaron que el crecimiento de C. *necator* era inhibido cuando el pH descendía a menos de 5.4 (10).

En los experimentos pares, donde el nivel de P es alto, no se produce un gran descenso del pH independientemente del pH inicial. Por lo tanto, la solución de fosfato actúa como regulador de pH. En todos estos experimentos se observa una buena producción de biomasa, entre 4,5 y 8 g/l, pero con distintos rendimientos  $Y_{P/X}$ . En los experimentos 6, 8, 14 y 16, cuando N y P se combinan en el nivel más alto, el rendimiento  $Y_{P/X}$  es mínimo de 0,21 a 0,30 g/g. Esto se debe a que no hay un nutriente limitante en el medio de cultivo que induzca la producción de PHB.

En este trabajo el pH inicial óptimo resultó 7,5. Combinado con la solución de P en una concentración de 8 a 12 g/l permite tener un pH cercano a 7 durante toda la fermentación. Además, la interacción P-pH fue significativa. Sin embargo, la concentración de P en niveles altos (12 g/l) reduce la producción de PHB. Por lo tanto, es importante que la concentración de P esté a un nivel adecuado, de modo que regule el pH y al mismo tiempo no sea demasiado alta para inhibir la producción del biopolímero. Esto asegura tanto el crecimiento microbiano como la acumulación de PHB. La limitación de nitrógeno promueve la producción de PHB en *C. necator*, sin embargo, debería ser suficiente para permitir un buen crecimiento microbiano adecuado (1). En este trabajo se determinó que el nivel menor de N, correspondiente a 1,5 g/l de sulfato de amonio, permite una buena producción de biomasa con la máxima producción de PHB. El término cuadrático de C resultó ser la variable con el mayor coeficiente. La concentración carbono óptima para la producción de PHB en sistema *batch* en Erlenmeyer por *C. necator* resultó 20 g/l de fructosa. Esto es coherente con el consumo máximo de fructosa medido (18,7 g/l), incluso para los experimentos con la mayor concentración inicial de fructosa (25 g/l). Estos resultados se corresponden con valores publicados previamente (9,11). Mozumder y colaboradores demostraron que la tasa de crecimiento específica de *C. necator* disminuye significativamente para concentraciones de fuentes de carbono superiores a 20 g/l.

El contenido de PHB está entre 1 y 3 g/l en la mayoría del diseño, excepto, en los puntos central, 11 y optimizado, que es igual o superior a 4 g/l. Los máximos valores están en los experimentos 11 y el optimizado, de 4,5 y 4,6 g/l, respectivamente. En estos experimentos, también se obtuvieron los máximos rendimientos  $Y_{P/x}$  de 0,68 y 0,70 g/l, equivalentes a un 68 y 70 % de acumulación de PHB, debido a las concentraciones óptimas de fructosa y sulfato de amonio.

La relación de carbono y nitrógeno (C/N) es una variable muy importante a considerar durante la producción de PHA (12). Por lo tanto, en el punto optimizado se calculó el valor de la relación (C/N) de 25. Por otro lado, en el punto óptimo, con esta relación de C/N, todos los rendimientos y productividad calculados para el proceso fermentativo eran máximos, con la mayor diferencia respecto a los otros valores experimentales, el rendimiento Y<sub>P/S</sub>. Este hecho indicó mejor aprovechamiento de la fuente de carbono en la producción de biopolímero con menor gasto del substrato. Por lo tanto, la relación C/N 25:1 se mantendrá en mayores escalas de producción de polímero.

#### 4.2.5 Progreso de la producción de PHB

En los experimentos iniciales la producción de PHB fue de 1,9 g/l. En la optimización del inóculo la concentración de PHB máxima predicha por el modelo fue de 3,7 g/l para un inóculo de 24 h al 5 %. Finalmente, el valor experimental del punto optimizado de 4,6 g/l de PHB, correspondiente a un contenido de PHB del 70 %, es el máximo valor obtenido experimentalmente en todo el diseño FFD para las concentraciones: C=20,4, N=1,50, pH=7,5, P=8,74, M=2,45 (Tabla 4.2.4)

Experimento	PHB (g/l)
Inicial	1,9
Doehlert - RSM	3,7
FFD - RSM	4,6

Tabla 4.2.4: Progreso de la producción de PHB a través de los diseños de experimentos.

La síntesis de PHB por C. necator ATCC 17697 a partir de fructosa aumentó casi en 2,5 veces hasta 4,6 g/l, mediante la metodología de diseño de experimentos.

#### 4.2.6 Cinética de la producción de PHB en medio optimizado

Para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *C. necator* en medio optimizado en Erlenmeyer se tomaron muestras de biomasa cada hora y media o dos horas, entre las 14 y 24h para la fase exponencial y entre las 36 y 69 h para la fase estacionaria. Se graficó el logaritmo natural (ln) de la biomasa en función del tiempo de fermentación y se seleccionaron los puntos que pertenecen a la fase exponencial y la fase estacionaria para calcular la velocidad específica correspondiente (Fig. 4.2.4).



Figura 4.2.4: Biomasa y Ln de biomasa en función del tiempo.

La velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial ( $\mu_1$ ) resultó 0,115  $\pm$  0,05 h<sup>-1</sup>, calculado a partir de 5 puntos experimentales, con 3 grados de libertad y un R<sup>2</sup> ajustado de 0,993. La velocidad específica en la fase estacionaria, a la que llamaremos velocidad de producción de PHB ( $\mu_2$ ) resultó 0,006  $\pm$  0,0005 h<sup>-1</sup> calculado a partir de 10 puntos experimentales, con 8 grados de libertad y un R<sup>2</sup> ajustado de 0,943 (Tabla 4.2.5). Esto es diferente a lo que ocurre en un microorganismo típico donde en la fase estacionaria la velocidad específica de crecimiento es cero. Esto se debe a que es un organismo acumulador de biopolímero. En efecto, la biomasa residual permanece constante, sin embargo, la biomasa total aumenta, por la acumulación de polímero, haciendo que la velocidad específica sea diferente de cero. Además, se estima que este valor podría aumentar si las condiciones de la fermentación son favorables.

]	Fase expone	encial	Fase estacionaria			
Ecuación 1	y <sub>1</sub> =	= a <sub>1</sub> + b <sub>1</sub> . x	Ecuación 2	y <sub>2</sub> = a <sub>2</sub> + b <sub>2</sub> . x		
	Valor Error estándar			Valor	Error estándar	
a₁	-1,5561 0,09779		a <sub>2</sub>	1,71594	0,02674	
$b_1 = \mu_1$	0,11552 0,00472		$b_2 = \mu_2$	0,00627	0,00051	
Estadística	Ln	(biomasa)	Estadística	Ln (biomasa)		
5	Núme	ero de puntos	10	Número de puntos		
3	Grado	os de libertad	8	Grade	os de libertad	
0,00172	Suma cı	a residual de Jadrados	0,00288	Suma residual de cuadrados		
0,99336	R	² ajustado	0,94267	R <sup>2</sup> ajustado		

Tabla 4.2.5: Cálculo de  $\mu$  mediante regresión lineal de las fases exponencial y estacionaria.

#### 4.2.7 Referencias

- López-Cuellar MR, Alba-Flores J, Rodríguez JNG, Pérez-Guevara F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. Int J Biol Macromol. 2011;48(1):74–80.
- Magallanes JF, Olivieri AC. The effect of factor interactions in Plackett-Burman experimental designs. Comparison of Bayesian-Gibbs analysis and genetic algorithms. Chemom Intell Lab Syst. 2010;102(1):8–14.
- 3. Anderson-Cook CM, Borror CM, Montgomery DC. Response surface design evaluation and comparison. J Stat Plan Inference.

2009;139(2):629-41.

- 4. Haaland PD. Experimental design in biotechnology. Dry Technol. 1991;
- 5. Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. J Ind Microbiol Biotechnol. 1999;23(6):456–75.
- Daneshi A, Younesi H, Ghasempouri SM, Sharifzadeh M. Production of poly-3-hydroxybutyrate by Cupriavidus necator from corn syrup: Statistical modeling and optimization of biomass yield and volumetric productivity. J Chem Technol Biotechnol. 2010;85(11):1528–39.
- Grothe E, Moo-young M, Chisti Y. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyrate) microbial thermoplastic. Enzym Microb Technol. 1999;25:132–41.
- Yolmeh M, Jafari SM. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. Food Bioprocess Technol [Internet]. 2017;10(3):413–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2
- Mozumder SI, Wever H De, Volcke EIP. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. Process Biochem [Internet]. 2014;49(3):365–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004
- Beaulieu M, Beaulieu Y, Melinard J, Pandian S, Goulet J. Influence of Ammonium-Salts and Cane Molasses on Growth of Alcaligenes-Eutrophus and Production of Polyhydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol. 1995;61(1):165–9.
- Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang HN, Chang YK, Woo SI. Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with substrate control using on-line glucose analyzer. Enzyme Microb Technol. 1994;16(7):556–61.
- Singh Saharan B, Grewal A, Kumar P. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. Chinese J Biol. 2014;2014:1–18.
# 4.3 Producción de PHB en biorreactor de laboratorio

### 4.3.1 Fermentaciones batch

#### Efecto de la aireación

Se cultivó la bacteria *C. necator* ATCC 17697 en un biorreactor con 4 l de medio optimizado en escala de Erlenmeyer, a una agitación constante de 500 rpm, a 30 °C durante 72 h, sin regulación de pH. Para analizar si la limitación de oxígeno beneficia la producción de biopolímero, se realizó una fermentación sin suministro de aire. En efecto, la fermentación comenzó con el aire contenido en el biorreactor, pero no se aireó externamente, de modo que una vez que los microorganismos lo consumieron, la fermentación se encontró limitada en O<sub>2</sub>. El O<sub>2</sub> disuelto se consumió totalmente a las 24 h.



Fig. 4.3.1: Fermentación *batch* 1 en biorreactor. *C. necator* ATCC 17697 cultivado en medio optimizado sin aireación. Medición de las concentraciones de sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ) y de oxígeno disuelto (-) y pH ( $\Box$ ).

El cultivo consumió 15 g/l de fructosa durante toda la fermentación. Se produjeron 2,3 g/l de biomasa, con un contenido de PHB muy bajo, de 0,4 g/l.

Los rendimientos Y<sub>P/S</sub> y Y<sub>X/S</sub> alcanzaron a las 48 h sus valores máximos: 0,39 g/g y 0,10 g/g, respectivamente. La producción de PHB resultó escasa durante toda la fermentación, la productividad volumétrica fue de 0,01 hasta las 72 h y tendió a 0 a las 76 h (Tabla 4.3.1).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>	Ррнв
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,29	-	-	-
24	0,30	0,03	0,12	0,01
48	0,25	0,10	0,39	0,01
56	0,20	0,06	0,28	0,01
72	0,20	0,03	0,16	0,01
76	0,15	0,02	0,15	0,00

Tabla 4.3.1: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 1.

El rendimiento de  $Y_{P/X}$  fue de 0,29 g/g el inicio de la fermentación. Este valor resultó similar al calculado Erlenmeyer de 0,20 g/g. A partir de las 48 h  $Y_{P/X}$  disminuyó, hasta llegar a 0,15 g/l a las 76 h de fermentación. Este hecho indica que el agotamiento del oxígeno en el biorreactor no solo no induce el almacenamiento de PHB, sino que disminuye el rendimiento de producto en función de la biomasa.

A modo comparativo, se realizó una segunda fermentación con el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones: agitación constante de 500 rpm, a 30 °C durante 72 h y sin regulación de pH, pero con aireación de 1,5 lpm (Fig. 4.3.2). Los rendimientos y productividades se muestran en la Tabla 4.3.2.



Fig. 4.3.2: Fermentación *batch* 2 en biorreactor. *C. necator* ATCC 17697cultivado en medio optimizado con aireación. Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ) y de Oxígeno disuelto (-) y pH ( $\Box$ ).

Tiempo	$Y_{\text{P/X}}$	$Y_{\text{P/S}}$	Y <sub>X/S</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,25	-	-	-
4	0,25	0,01	0,05	0,00
22	0,26	0,07	0,27	0,01
30	0,61	0,19	0,32	0,04
46	0,67	0,23	0,34	0,05
52	0,65	0,21	0,32	0,05
58	0,67	0,18	0,27	0,04
72	0,74	0,24	0,32	0,05

Tabla 4.3.2: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 2.

La aireación constante permitió que el valor de O<sub>2</sub> disuelto se mantuviera arriba del 45 % de saturación durante toda la fermentación. Con un consumo de fructosa similar al determinado durante la fermentación *batch* 1, se produjo el doble de biomasa y aumentó significativamente la concentración de PHB. Se 100

produjeron 4,6 g/l de biomasa y 3,4 g/l de PHB. Por lo tanto, el agotamiento de oxígeno en la fermentación, limita el crecimiento bacteriano y la acumulación de PHB. Los rendimientos Y<sub>P/S</sub> e Y<sub>X/S</sub> resultaron máximos a las 46 h, con valores de 0,23 g/g y 0,34 g/g, respectivamente (Tabla 4.3.2). La productividad volumétrica osciló entre 0,04 y 0,05 g/l entre las 30 y 72 h. El rendimiento Y<sub>P/x</sub> comenzó a aumentar a las 30 h, y alcanzó su máximo al final de la fermentación. A las 72 h el Y<sub>P/x</sub> fue de 0,74 g/g

#### Agitación regulada por oxígeno disuelto

Con el estudio anterior se confirmó que para el crecimiento bacteriano y la consecuente producción de PHB es esencial que el cultivo se realice en presencia de oxígeno. A continuación, se describe una estrategia de fermentación basada en una cascada de agitación, que permite regular la concentración de oxígeno para una buena producción de PHB.

Para optimizar la producción de biomasa y acumulación de biopolímero en función de la aireación, se realizó una fermentación en la que se comenzó con aireación de 1 lpm y agitación a 350 rpm. De esta manera, al inicio de la fermentación, el oxígeno disuelto está en 100 % de saturación. Durante el proceso productivo este valor empieza disminuir debido al rápido crecimiento del cultivo. A las 13 h llega a 0 % de saturación, es decir, la cantidad oxígeno disuelto que ingresa al biorreactor es igual a la que consume el cultivo bacteriano. A partir de las 22 h de fermentación se aplicó una cascada de agitación entre 300 y 400 rpm, programada para aumentar las revoluciones mientras que el  $O_2$  disuelto sea menor a 25% y sostenerse en 400 rpm para concentraciones de  $O_2$  mayores (Fig. 4.3.3 a).



Fig. 4.3.3: Fermentación *batch* 3 en biorreactor. *C. necator* ATCC 17697 cultivado en medio optimizado con aireación regulada por el O<sub>2</sub> disuelto. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo. La flecha indica el inicio de la cascada de agitación en función del oxígeno disuelto; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa ( $\blacktriangle$ ), biomasa total ( $\diamond$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ).

El crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 durante fermentación *batch* 3 en biorreactor, puede dividirse en tres etapas (Fig. 4.3.3 (b)). Una fase lag, o de adaptación del cultivo bacteriano al medio de cultivo (duración 5 h), una fase de crecimiento bacteriano y acumulación de PHB (duración 24 h) y una fase estacionaria donde ya no hay división celular, pero sí acumulación de PHB (duración 2 h). El consumo de fructosa y sulfato de amonio se correlaciona con

el crecimiento bacteriano y la consiguiente acumulación del polímero. La acumulación de PHB comienza en la fase exponencial inicial y continúa aumentando hasta que el organismo alcanza la fase estacionaria a las 31 h, donde el crecimiento y la acumulación de PHB alcanzan su máximo de 7,9 ± 0,05 g/l y 3,4 ± 0,1 g/l, respectivamente. La productividad volumétrica fue de 0,11 g/(l.h). En esa instancia, ya se había consumido totalmente el sulfato de amonio y se observa un consumo significativo de fructosa. La concentración de biomasa y la productividad del polímero aumentaron significativamente, en comparación con los valores obtenidos en Erlenmeyer durante 72 h, 6,5 g/l y 0,06 g/(l.h), respectivamente (Tabla 4.2.4). Los máximos rendimientos de Y<sub>P/S</sub> y Y<sub>P/X</sub>, así como la productividad volumétrica de PHB, fueron entre las 29 y 31 h, en la fase de acumulación de polímero, mientras que el máximo rendimiento de Y<sub>X/S</sub> se observó entre las 22 y 29 h, en la fase de mayor producción de biomasa (Tabla 4.3.3).

Tabla 4.3.3: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 3.

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	$Y_{P/S}$	Y <sub>X/S</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,20	-	-	-
5	0,21	0,01	0,05	0,01
22	0,35	0,15	0,41	0,08
29	0,41	0,17	0,43	0,11
31	0,42	0,16	0,39	0,11

Desde las 5 h hasta las 22 h la concentración del sulfato de amonio disminuyó de 1,3 a 0,18 g/l y el Y<sub>P/X</sub> ascendió de 0,21 a 0,35. Puede observarse en la Tabla 4.3.3 que el rendimiento Y<sub>P/X</sub> comienza a aumentar cuando la concentración del sulfato de amonio en el medio de cultivo llega a cero. Por lo tanto, mediante el control de la oxigenación se logró aumentar la cantidad de biomasa en menos de la mitad de tiempo y se mantuvo la concentración de PHB, en comparación con la fermentación en escala de Erlenmeyer agitados. Sin embargo, la acumulación de PHB se detuvo sin llegar a su valor máximo por no haber más fuente de carbono disponible en el medio de cultivo. Es decir que el medio

optimizado para la fermentación en Erlenmeyer no resultó el mejor medio en el biorreactor.

Los resultados de las estrategias, concentraciones de biomasa y PHB, rendimientos y productividades, alcanzadas en cada una de las fermentaciones realizadas hasta este punto se resumen en la Tabla 4.3.4.

	Ma dia da		PHB	х	PPHB	tfinal	Pphb	t (Р <sub>РНВ</sub>
Fermentación	Medio de	Estrategia		~	final	una	máx	máx)
Cultivo		C C	g/l	g/l	g/(l.h)	h	g/(l.h)	h
Erlenmeyer		150 rpm	4,6	6,5	0,06	72	0,06	72
Batch 1		Sin aireación	0,4	2	0,01	72	0,01	72
Batch 2	Optimizado	Con aireación	3,4	4,6	0,05	72	0,05	72
Batch 3		Agitación reg. por O₂ disuelto	3,4	7,9	0,11	31	0,11	72

Tabla 4.3.4: Estrategias, rendimientos y productividades de las distintas fermentaciones

Los sistemas de Erlenmeyer presentan al menos cuatro puntos débiles: i) el pH no se controla durante la fermentación, ii) la capacidad de transferencia de oxígeno es deficiente, iii) puede producirse una evaporación considerable durante el cultivo y iv) el proceso de mezclado por agitación puede no ser uniforme. La realidad es que se han publicado pocas comparaciones rigurosas del desempeño del medio de cultivo a diferentes escalas, y a menudo, en el escalado, se debe cambiar la composición del medio para aprovechar las estrategias de control del proceso (1).

#### Efecto de las fuentes de C y N

Manteniendo la relación C/N = 25, obtenida durante el proceso de optimización en Erlenmeyer, se aumentaron un 50 % las concentraciones de fructosa y sulfato de amonio. Por lo tanto, se comenzó con 30 g/l de fructosa y 2,25 g/l de sulfato de amonio, las demás concentraciones de componentes del medio de cultivo se mantuvieron iguales a los de *batch* 3.

La fermentación comenzó con una agitación inicial de 350 rpm y aireación de 1 lpm. A las 17 h se inició la regulación de la agitación en cascada con el O<sub>2</sub> disuelto. Inicialmente se reguló entre entre 300 y 400 rpm, y luego entre 200 y 350 para mantener el O<sub>2</sub> disuelto cerca de 20% de saturación (Fig. 4.3.4). 104



Fig. 4.3.4: Fermentación *batch* 4 en biorreactor. *C. necator* ATCC 17697 cultivado en medio de cultivo de sales minerales con fructosa 30 g/l y sulfato de amonio 2,25 g/l. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo, la flecha gruesa indica el inicio de la cascada de agitación en función del O<sub>2</sub> disuelto; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\blacklozenge$ ).

En el perfil de la fermentación *batch* 4 se visualizan las 3 etapas de crecimiento de *C. necator* ATCC 17697. Primero la fase lag, en donde el O<sub>2</sub> disuelto cambia de 100 % a 0 % de saturación en 16 horas. En ese lapso se consumen 4 g/l de fructosa y 0,1 g/l de sulfato de amonio y se producen 1,2 g/l de biomasa y 0,49 g/l de PHB. Luego comienza el crecimiento exponencial con acumulación de

polímero. Al inicio de esta etapa se enciende la cascada de agitación que permite aumentar la velocidad de consumo de sustratos. Durante las 6 horas siguientes se consumieron totalmente el sulfato de amonio restante y 5 g/l de fructosa, la biomasa y el PHB aumentan a 4,3 g/l y 1,4 g/l, respectivamente. La tercera etapa comienza a las 22 h, con la limitación de nitrógeno, que induce la acumulación de PHB; el rendimiento Y<sub>P/X</sub> comienza a aumentar. El Y<sub>P/X</sub> inicial es 0,20 g/g, manteniendo su valor hasta las 19 h, con el agotamiento total de nitrógeno y el aumento de Y<sub>P/X</sub> hasta 0,34 g/g a las 22 h. (Tabla 4.3.5).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>	Ррнв
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,20	-	-	-
16	0,24	0,08	0,33	0,02
19	0,21	0,08	0,39	0,03
22	0,34	0,13	0,38	0,06
25	0,50	0,19	0,38	0,10
41	0,65	0,26	0,40	0,14
45	0,68	0,28	0,42	0,15
46	0,67	0,27	0,40	0,15
49	0,68	0,27	0,39	0,14
66	0,75	0,28	0,38	0,12
69	0,75	0,28	0,38	0,12

Tabla 4.3.5: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 4.

Durante la tercera etapa, la biomasa residual permanece relativamente constante. Por lo tanto, el aumento de la biomasa total se debe exclusivamente a la acumulación de PHB. Puede observarse que la pendiente de crecimiento exponencial, esto es la velocidad específica de crecimiento con la que aumenta la biomasa disminuye en la tercera etapa. La velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial, la denominaremos  $\mu_2$ , y aparece debido a la acumulación intracelular de polímero, como se ha propuesto en la Sección 4.2.4. Al cabo de 66 h de fermentación se logró obtener 11,15 ± 0,07 g/l de biomasa y 8,07 ± 0,21 g/l de PHB. La productividad máxima, de 0,15 g/(l.h) se alcanzó entre las 41 y 46 h, con una concentración de PHB entre 6,0 ± 0,3 y 6,8 ± 0,4 g/l. El rendimiento Y<sub>p/x</sub> alcanzó los 0,72 g/g entre las 66 y 69 h, es decir que un 72 % de la biomasa seca es PHB acumulado intracelularmente.

La fermentación se repitió bajo las mismas condiciones para evaluar la repetitividad y reproductividad del proceso (batch 5); agitación inicial: 350 rpm, aireación: 1 lpm. La regulación del O<sub>2</sub> disuelto mediante cascada de agitación se encendió a las 25 h (Fig. 4.3.5).



Fig. 4.3.5: Fermentación *batch* 5 en biorreactor. *C. necator* ATCC 17697 cultivado en medio de cultivo de sales minerales con fructosa 30 g/l y sulfato de amonio 2,25 g/l. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo, la flecha gruesa indica el inicio de la cascada de agitación en función del O2 disuelto; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ).

Los rendimientos y productividades son comparables a los de la fermentación *batch* 4 (Tabla 4.3.5)

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	$Y_{\text{P/S}}$	Y <sub>X/S</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,19			
17	0,20	0,02	0,10	0,00
25	0,20	0,03	0,17	0,01
39	0,56	0,23	0,40	0,10
42	0,61	0,22	0,36	0,11
45	0,62	0,23	0,37	0,12
48	0,73	0,28	0,39	0,14
63	0,67	0,26	0,39	0,12
65	0,68	0,26	0,39	0,12

Tabla 4.3.6: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 5.

El rendimiento  $Y_{P/X}$  aumentó de 0,20 a 0,56 g/g cuando el sulfato de amonio cayó de 1,8 a 0,01 g/l, entre las 25 y 39 h.

Los resultados de las estrategias, concentraciones de biomasa y PHB, rendimientos y productividades, alcanzadas en cada una de las fermentaciones realizadas hasta este punto se resumen en la Tabla 4.3.7.

Tabla 4.3.7: Estrategias, rer	ndimientos y productividades	de las distintas	fermentaciones
-------------------------------	------------------------------	------------------	----------------

Formontación	Medio de	Estrategia	PHB	х	PPHB final	t <sub>final</sub>	PPHB máx	t (Ррнв máx)
rementacion	Cultivo		g/l	g/l	g/(l.h)	h	g/(l.h)	h
Erlenmeyer		150 rpm	4,6	6,5	0,06	72	0,06	72
Batch 1	<b>.</b>	Sin aireación	0,4	2	0,01	72	0,01	72
Batch 2	Optimizado	Con aireación	3,4	4,6	0,05	72	0,05	72
Batch 3		Agitación reg. por O₂ disuelto	3,4	7,9	0,11	31	0,11	72
Batch 4	Aumento	Agitación reg.	8	11,2	0,12	66	0,15	45
Batch 5	C y N	por O <sub>2</sub> disuelto	7,7	13,3	0,12	63	0,14	48

Una vez verificada la reproducibilidad de los resultados de la fermentación se aumentaron las fuentes de C y N un 100% respecto del medio optimizado en Erlenmeyer, manteniendo la relación C/N de 25, para incrementar las cantidades de biomasa y PHB. Esto es, una concentración de fructosa y de sulfato de

amonio de 40 g/l y 3g/l, respectivamente. También se aumentó la concentración del inóculo al 10 % para disminuir la duración de la fase lag. Con estas condiciones se realizaron las fermentaciones *batch* 6 y 7.La agitación y aireación inicial se aumentaron a 600 rpm y 1,5 lpm, respectivamente, para disminuir la duración de la fase lag. A las 28 h se encendió la regulación de la agitación (entre 200 y 400 rpm) en cascada con el O<sub>2</sub> disuelto. A las 60 hs se ajustó la agitación entre 200 y 300 rpm y la aireación a 1 lpm, para mantener el O<sub>2</sub> disuelto en 20% de saturación (Figura 4.3.6).



Figura 4.3.6: Fermentación *batch* 6 en biorreactor. *C. necator* ATCC 117697 cultivado en medio de cultivo de sales minerales con fructosa 40 g/l y sulfato de amonio 3 g/l. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo, la flecha gruesa indica el inicio de la cascada de agitación en función del O2 disuelto; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ).

En la Fig 4.3.6.b se observan las tres etapas de crecimiento. Efectivamente el aumento del inóculo, de la aireación y agitación permitió reducir la fase lag a 8 h, prácticamente a un tercio de las fermentaciones anteriores. La segunda etapa, de crecimiento microbiano con acumulación de PHB, finalizó a las 23 h; en esta etapa se consumieron 4 g/l

La limitación de N induce la tercera etapa, de acumulación de PHB. En esta etapa de producción exclusiva de PHB, la biomasa residual permanece relativamente constante, entre 5 y 6 g/l, desde las 23 hasta las 71 h. La biomasa total aumenta a 14,3  $\pm$  0,2 g/l, que se debe a la acumulación intracelular de 8,3  $\pm$  0,2 g/l de PHB por el consumo de 35 g/l de fructosa. Respecto a la fermentación anterior, la concentración de biomasa aumentó casi un 25 %, mientras que la concentración de PHB prácticamente no aumenta. Es por ello, que el rendimiento Y<sub>P/x</sub> disminuye. La productividad volumétrica de PHB tiene su valor máximo de 0,16 g/(l.h) entre las 46 y 52 h. Este valor es mayor que en las fermentaciones anteriores (Tabla 4.3.8).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,20	-	-	-
7	0,20	0,00	0,02	0,00
23	0,29	0,09	0,32	0,09
28	0,39	0,14	0,36	0,13
32	0,40	0,16	0,39	0,12
46	0,58	0,23	0,39	0,16
49	0,62	0,23	0,37	0,16
52	0,62	0,24	0,38	0,16
56	0,63	0,23	0,36	0,15
69	0,61	0,22	0,37	0,13
71	0.61	0.22	0.37	0.12

Tabla 4.3.8: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 6 en biorreactor con cascada de agitación en función del oxígeno disuelto.

Se repitió la fermentación con el mismo medio de cultivo que en el batch 6, con leves cambios en las estrategias de alimentación y aireación para evaluar la posibilidad de lograr mayores rendimientos y productividades. La agitación y aireación inicial fueron de 450 rpm y 1,5 lpm, respectivamente. A las 8 h se encendió la bomba que la reguló la agitación (entre 350 y 200 rpm) en cascada

con el O<sub>2</sub> disuelto y se bajó la aireación a 1 lpm, para mantener el O<sub>2</sub> disuelto en 20% de saturación (Figura 4.3.7).



Fig. 4.3.7: Fermentación *batch* 7 en biorreactor. *C. necator* ATCC 17697 cultivado en medio de cultivo de sales minerales con fructosa 40 g/l y sulfato de amonio 3 g/l. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo, la flecha gruesa indica el inicio de la cascada de agitación en función del O2 disuelto; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ).

El batch 7 es prácticamente equivalente al batch 6. A las 49 h llegaron a los máximos valores la productividad volumétrica de 0,15 g/(l.h) y el rendimiento  $Y_{P/S}$  de 0,41 g/g. A las 76 h, se lograron los máximos rendimientos de  $Y_{P/X}$  y  $Y_{P/S}$  de 0,66 y 0,25 g/g, respectivamente. Sin embargo, el aumento de las fuentes de C

y N produjo un aumento en la cantidad de PHB almacenado cuando se aplicó mayor agitación, aireación y tiempo de fermentación (Tabla 4.3.9).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	Y <sub>P/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/g	g/g	g/(l.h)
0	0,20	-	-	-
8	0,20	0,09	0,44	0,02
25	0,42	0,17	0,41	0,12
29	0,43	0,17	0,40	0,12
33	0,41	0,17	0,41	0,12
49	0,55	0,22	0,41	0,15
54	0,55	0,21	0,39	0,14
57	0,56	0,21	0,38	0,13
72	0,65	0,24	0,38	0,13
76	0,66	0,25	0,38	0,13

Tabla 4.3.9: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la fermentación *batch* 7 en biorreactor con cascada de agitación en función del oxígeno disuelto.

Los resultados de las estrategias, concentraciones de biomasa y PHB, rendimientos y productividades, alcanzadas en cada una de las fermentaciones realizadas hasta este punto se resumen en la Tabla 4.3.10.

Tabla 4.3.10: Estrategias, rendimientos y productividades de las distintas fermentaciones

			PHR	x	PPHB	tfinal	PPHB	t (Р <sub>РНВ</sub>
Fermentación	Medio de	Estrategia		Λ	final	unai	máx	máx)
	Cultivo	C	g/l	g/l	g/(l.h)	h	g/(l.h)	h
Erlenmeyer		150 rpm	4,6	6,5	0,06	72	0,06	72
Batch 1		Sin aireación	0,4	2	0,01	72	0,01	72
Batch 2	Optimizado	Con aireación	3,4	4,6	0,05	72	0,05	72
Batch 3		Agitación reg. por O₂ disuelto	3,4	7,9	0,11	31	0,11	72
Batch 4	Aumento	Agitación reg.	8	11,2	0,12	66	0,15	45
Batch 5	C y N	por O2 disuelto	7,7	13,3	0,12	63	0,14	48
Batch 6	Aumento	Agitación reg.	8,3	14,3	0,12	71	0,15	46
Batch 7	de C y N	por O2 disuelto	9,9	14,4	0,13	76	0,15	49

El escalado del proceso de producción de PHB en biorreactor agitado en modo *batch*, permitió aumentar más del 50 % la concentración de biopolímero y la productividad del proceso en comparación con el proceso en escala de Erlenmeyer agitados. Estos resultados, comparables a los reportados por 112

Khanna y Srivastava, mostraron una ligera mejora en los valores de concentración de PHB y rendimiento de  $Y_{P/X}$  durante la fermentación batch con la misma cepa nativa de *C. necator*. (2)

#### 4.3.2 Fermentaciones *fedbatch*

Varios estudios demuestran que la concentración de la fuente de carbono se debe mantener en 20 g/l en las fermentaciones *fedbatch*, para un óptimo crecimiento de *C. necator* (3–5). Mozumder y colaboradores calcularon la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial a diferentes concentraciones de la fuente de carbono y encontraron que la máxima velocidad de crecimiento se halla entre 10 y 20 g/l (3). Por esta razón se comenzó la fermentación *fedbatch* con 20 g/l de fructosa en el medio de cultivo, esto es, la misma concentración que la que resultó del proceso de optimización de la producción de PHB en Erlenmeyer. Durante la etapa de alimentación con fructosa, la concentración de fructosa se mantuvo entre 10 y 40 g/l para aumentar tanto el crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 como la producción de PHB. También se aumentaron las concentraciones de algunos nutrientes que se hallaban en bajas concentraciones respecto a las fermentaciones en *batch*: la solución de microelementos hasta 5 ml/l y el sulfato de magnesio hasta 1,25 g/l.

Las fermentaciones se efectuaron aplicando un proceso conformado por tres etapas. Una primera etapa para permitir el crecimiento celular, que consistió en un cultivo *batch* con una agitación de 1000 rpm y aireación de 2 lpm. Una segunda etapa de crecimiento celular con producción de PHB, realizada mediante un cultivo *fedbatch* en la cual se aplicaron dos estrategias de alimentación con fructosa: i) regulada en función de la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el cultivo y ii) por alimentación exponencial. La tercera etapa consistió en un cultivo *fedbatch* alimentado con fructosa en función del O<sub>2</sub> disuelto, sin suplementación de nitrógeno para la producción exclusiva de PHB. En las dos primeras etapas el NH<sub>4</sub>OH agregado en el medio de cultivo para regulación de pH, permitió evitar la limitación de nitrógeno en el sistema fermentativo. Según López-Cuellar y colaboradores estas condiciones resultaron ideales para producir PHA con solo una fuente de carbono disponible (6). Para tal fin, se reemplazó NH<sub>4</sub>OH por NaOH (Ver Sección 3.1.5).

#### Alimentación en cascada con el O<sup>2</sup> disuelto

La segunda etapa de cultivo fue *fedbatch*, mediante alimentación con fructosa (600 g/l) regulada en función de la concentración de  $O_2$  disuelto en el cultivo, para mantener el O2 disuelto en de 70% de saturación. En esta fase la agitación se redujo a 750 rpm y la aireación a 1,5 lpm. En estas dos etapas el NH<sub>4</sub>OH permitió evitar la limitación de nitrógeno. En la tercera etapa la alimentación con fructosa se reguló en función del  $O_2$  disuelto con un corte de 30-20%, NH<sub>4</sub>OH se reemplazó por NaOH y la agitación y la aireación se redujeron a 650 rpm y 1 lpm, respectivamente (Fig. 4.3.8).



Figura 4.3.8: Fermentación *fedbatch* de 3 etapas con alimentación de fructosa regulada por el O<sub>2</sub> disuelto. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo, la flecha 1 (20 h) indica el inicio de la cascada de alimentación en función del O<sub>2</sub> disuelto, la flecha 2 (43 h) indica el cambio NH4OH por NaOH; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa ( $\blacktriangle$ ), biomasa total ( $\diamond$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ).

La primera etapa del proceso fermentativo (cultivo *batch*) presentó una duración de 20 h. En las primeras 10 h, el O<sub>2</sub> disuelto superó al 90 % de saturación, luego el valor comenzó a descender, debido al crecimiento exponencial del cultivo. A 115

las 20 h de fermentación se produjo el consumo total de fructosa, lo que coincidió con el aumento abrupto de la concentración de  $O_2$  disuelto. En esta etapa se obtuvo un nivel de biomasa de 8 g/l y una leve síntesis de PHB de 1,6 g/l, lo que indica que la fuente de carbono fue utilizada para la producción de biomasa. La segunda etapa presentó una duración de 23 h, iniciándose con el encendido de la bomba a través de la cual se efectuó la alimentación con fructosa en función del consumo de  $O_2$  disuelto. La bomba se enciende cuando el  $O_2$  disuelto supera un valor de 70 % de saturación. En esta etapa de cultivo *fedbatch* la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se mantiene relativamente constante, debido a que su ingreso y consumo se equipararon. Los niveles de biomasa y PHB aumentaron a 30 g/l y 13,7 g/l, respectivamente.

La tercera etapa inició a las 49 h, cuando se reemplazó la base NH<sub>4</sub>OH por NaOH para bajar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo y así favorecer la síntesis de PHB. Durante las primeras 6 h la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permaneció casi constante, decreciendo luego hasta llegar a cero. Al final de la fermentación, se produjeron 35,5 g/l de biomasa y 17,5 g/l de PHB, con una productividad de PHB de 0,25 g/l/h. La productividad máxima de 0,29 g/l/h se obtuvo a las 49 h (Tabla 4.3.11). Estos resultados son similares a los obtenidos por Khanna y Srivastava con la misma cepa pero con una estrategia de alimentación de flujo constante de 100 ml/h (7).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	P <sub>PHB</sub>
h	g/g	g/(l.h)
0	0,20	-
20	0,20	0,08
27	0,35	0,21
43	0,46	0,32
49	0,42	0,29
68	0,50	0,26

Tabla 4.3.11: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la repetición de la fermentación *fedbatch* 2

Estos resultados son superiores a los obtenidos anteriormente mediante fermentaciones *batch* alcanzando prácticamente el doble de concentración de biomasa y PHB, además de un aumento notable de su productividad volumétrica.

#### Alimentación exponencial

En esta estrategia para la segunda etapa *fedbatch*, el cultivo se alimentó de modo exponencial con fructosa (600 g/l). La agitación y aireación se mantuvieron igual al *fedbatch* anterior. En estas dos etapas, la utilización de NH<sub>4</sub>OH como base, permitió evitar la limitación de nitrógeno. En la tercera etapa la alimentación con fructosa se reguló en función del O<sub>2</sub> disuelto con un corte de 60-20%, el NH<sub>4</sub>OH se reemplazó por NaOH y se disminuyó la agitación a 700 rpm (Fig. 4.3.9).



Figura 4.3.9: Fermentación *fedbatch* de 3 etapas con alimentación exponencial de fructosa 600 g/l. a) Perfiles de pH, temperatura, agitación y oxígeno disuelto entregado por el software del equipo, la flecha 1 indica el inicio de la alimentación exponencial, la flecha 2 indica el fin de la alimentación exponencial, comienzo de la alimentación en cascada con el O2 disuelto y cambio de base; b) Medición de las concentraciones de: sulfato de amonio ( $\blacksquare$ ), fructosa (▲), biomasa total ( $\blacklozenge$ ), biomasa residual ( $\circ$ ) y PHB ( $\bullet$ ).

El cultivo *batch* tuvo una duración de 17 h, en la que se obtuvieron 8,17  $\pm$  0,05 g/l de biomasa y 0,30  $\pm$  0,02 g/l de PHB. A las 13 horas se produjo el aumento del O<sub>2</sub> disuelto por el consumo total de fructosa. Desde las 17 h hasta las 28 h se alimentó el cultivo en forma exponencial. Para ello se aplicó la ecuación de flujo exponencial (Ec. 3.2.1) utilizando, Y<sub>X/S</sub> = 0,44 g/g calculado en la Sección

4.2.4,  $\mu$  = 0,11 1/h calculado en la Sección 4.2.6, S = 600 g/l, V<sub>0</sub>= 2,2 l y X<sub>0</sub>= 7,5 g/l, determinados al momento de comenzar la alimentación.

En estas dos etapas del cultivo la concentración de NH<sup>4+</sup> ingresa con la sustancia base para regulación de pH, evitando que el cultivo se limite en N y la biomasa continúe creciendo. Al final de la segunda etapa la biomasa alcanza los  $32,2 \pm$ 0,9 g/l con un contenido de PHB de 6,64 ± 0,51 g/l, siendo la biomasa residual de 25,56 ± 1,41 g/l. La tercera etapa comienza con el cambio de NH<sub>4</sub>OH y de alimentación exponencial a alimentación regulada por el oxígeno disuelto. Esta etapa de exclusiva producción de PHB, por la limitación de N y exceso de C, la biomasa residual permanece constante y la biomasa total alcanza su máximo de 55, 77 ± 0,90 g/l g/l con un contenido de PHB de 25,66 ± 0,90 g/l. siendo la productividad volumétrica máxima del proceso de 0,43 g/g a las 60 h del cultivo, con un rendimiento Y<sub>p/x</sub> de 0,51 g/g (Tabla 4.3.11). Este resultado es superior al obtenido por Khanna y Srivastava con la cepa *C. necator* ATCC 17697 y una estrategia *fedbatch* distinta. Los autores utilizaron flujos de alimentación de nutrientes en disminución (decreciente), y lograron obtener 36,2 g/l de biomasa y 16,8 g/l de PHB (7).

Tiempo	Y <sub>P/X</sub>	P <sub>PHB</sub>		
h	g/g	g/(l.h)		
0	0,20			
17	0,20	0,09		
20	0,20	0,18		
24	0,20	0,22		
28	0,21	0,23		
35	0,32	0,34		
40	0,40	0,42		
51	0,47	0,42		
60	0,51	0,43		
68	0,51	0,38		

Tabla 4.3.12: Rendimientos y productividades obtenidos a distintos tiempos de la repetición de la fermentación *fedbatch* 2

Los resultados de las estrategias, concentraciones de biomasa y PHB, rendimientos y productividades, alcanzadas en cada una de las fermentaciones realizadas hasta este punto se resumen en la Tabla 4.3.13.

Fermentación Medio de Cultivo	Estrategia	PHB	Х	Ррнв	t <sub>final</sub>	Ррнв	t (Р <sub>РНВ</sub>	
				final		máx	máx)	
		g/l	g/l	g/(l.h)	h	g/(l.h)	h	
Erlenmeyer	Optimizado	150 rpm	4,6	6,5	0,06	72	0,06	72
Batch 1		Sin aireación	0,4	2	0,01	72	0,01	72
Batch 2		Con aireación	3,4	4,6	0,05	72	0,05	72
Batch 3		Agitación reg. por O₂ disuelto	3,4	7,9	0,11	31	0,11	72
Batch 4	Aumento	Agitación reg.	8	11,2	0,12	66	0,15	45
Batch 5	C y N	por O2 disuelto	7,7	13,3	0,12	63	0,14	48
Batch 6	Aumento	Agitación reg.	8,3	14,3	0,12	71	0,15	46
Batch 7	de C y N	por O2 disuelto	9,9	14,4	0,13	76	0,15	49
Fedbatch 1	h 1 Fedbatch	Alimentación reg. por O <sub>2</sub> disuelto	17,5	35	0,25	69	0,29	49
Fedbatch 2		Alimentación Exponencial	25,7	50,8	0,38	68	0,43	60

Tabla 4.3.13: Estrategias, rendimientos y productividades de las distintas fermentaciones

Al aplicar una alimentación exponencial en la segunda etapa, se logró aumentar notablemente las concentraciones de biomasa y PHB, la productividad volumétrica y el rendimiento de producto en biomasa.

# 4.3.4 Cinética y productividad de fermentaciones *batch* y *fedbatch*

### Productividad

En primer lugar, la Fig. 4.3.10 presenta la evolución de la biomasa (en escala logarítmica) en función del tiempo de fermentación para las modalidades *batch* y *fedbatch* implementadas en el biorreactor.



Figura 4.3.10: Ln(biomasa) vs. tiempo de fermentación para cada una de las estrategias realizadas en biorreactor.

En la Figura 4.3.10 se destaca el incremento de la producción de biomasa y consecuente producción de PHB en cada paso de optimización del proceso de fermentación. Cabe señalar que la medición de la biomasa en la etapa inicial de la fermentación tiene mucho error porque se emplea el método indirecto de turbidimetría; este error se reduce considerablemente para las concentraciones más altas y además se pudo pesar directamente la biomasa seca.

En la Tabla 4.3.13 puede observarse que en biorreactor, cuando se aplicó agitación en cascada con el O<sub>2</sub> disuelto (*batch* 3), mejoró la producción de biomasa en menos de la mitad de tiempo y la productividad de PHB de 0,06 a 0,11 g/(l.h), respecto a Erlenmeyer con el medio optimizado. En el biorreactor, se produjo un rápido aumento de la biomasa con poca acumulación de PHB, que consumió todo el sustrato; este hecho impidió que siguiera aumentado la concentración de biopolímero. Por ello se aumentaron las concentraciones de C y N, primero un 50 % en las fermentaciones *batch* 4 y 5 y luego un 100% en las fermentaciones *batch* 6 y 7. De esta forma se logró aumentar la producción de biomasa y PHB en ambos pasos, resultando la de mayor concentración de

PHB la fermentación *batch* 7, con 9,9 g/l de PHB. Cabe señalar que en la fermentación *batch* 4 se logró la misma productividad máxima que en la fermentación *batch* 7 en aproximadamente el mismo tiempo de cultivo. Luego se modificaron las concentraciones de los componentes del medio para aplicar un sistema de alimentación *fedbatch*.

La fermentación de la bacteria *C. necator* ATCC 17697 en biorreactor agitado mediante un proceso que incluyó una etapa *batch* y dos etapas *fed-batch* resultó efectiva para la producción de PHB. La concentración de PHB lograda en el *fedbatch* 1 es más de tres veces mayor que en Erlenmeyer y aumentó un 50 % respecto a la fermentación *batch* 7. La concentración de PHB en la fermentación *fedbatch* 2, en la que se aplicó alimentación exponencial, se logró aumentar la concentración de PHB un 150 % respecto a la fermentación *batch* 7 y aumentar nás de 5 veces respecto a la fermentación en Erlenmeyer en medio optimizado.

Todos los pasos de mejora de resultados resultaron efectivos. Finalmente se logró una concentración de PHB de 25,7 g/l con una productividad volumétrica máxima de 0,43 g/(l.h) a las 60 h de cultivo.

#### Cinética de la producción de PHB

Se demostró que el crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 tiene un comportamiento particular: en los ensayos Erlenmeyer mostró tener un  $\mu$  distinto de cero en la fase estacionaria, es decir, difiere del crecimiento microbiano típico. Esta diferencia se atribuye a la capacidad de acumulación de biopolímero que caracteriza a *C. necator* ATCC 17697, que continúa incrementándose aun cuando la biomasa residual haya alcanzado su estado estacionario. Es decir que, si bien luego del crecimiento exponencial la biomasa residual permanece constante, la biomasa total aumenta con una velocidad  $\mu_2$ , debido al aumento del PHB almacenado en forma de gránulos intracelulares.

Para determinar  $\mu_2$  en todas las fermentaciones en biorreactor se seleccionaron los puntos que pertenecen a la fase exponencial y los que pertenecen a la fase estacionaria con acumulación de PHB, para cada una de las fermentaciones realizadas. A partir del ajuste lineal de la representación ln(biomasa) vs. tiempo se calcularon las velocidades específicas, tal como se hizo en la Sección 4.2.2 para la fermentación en Erlenmeyer. Los ajustes de las ecuaciones lineales de ambas fases se realizaron con el programa Origin 8.0 (Fig. 4.3.11). Los valores de la pendiente ( $\mu$ ) arrojados por el ajuste, el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) y la cantidad de biomasa en función del tiempo. Selección de la fase exponencial y fase estacionaria para el cálculo de  $\mu_1$  y  $\mu_2$  para cada una de las fermentaciones realizadas en biorreactor: *batch* 3 (b), *batch* 4 (c), *batch* 5 (d), *batch* 6 (e), *batch* 7 (f), *fedbatch* 1 (g) y *fedbatch* 2 (h), comparado con el cálculo realizado previamente en Erlenmyer (a). Para cada fermentación se realizó un ajuste a una ecuación lineal mediante OriginLab 8.0, para  $\mu_1$  (cuadro inferior) y  $\mu_2$  (cuadro superior). La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) arrojadas por el ajuste, el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) y la cantidad de puntos que se utilizaron en cada fase para realizarlo, se resumen en la Tabla 4.3.14.



Figura 4.3.11: Cálculo de  $\mu$  de *C. necator* ATCC 17697 cultivado en biorreactor. Ln de biomasa en función del tiempo de todas las fermentaciones.

Tabla 4.3.14. Calculo de la velocidad de crecimiento de biomasa en las etapas
exponencial ( $\mu_1$ ) y en la etapa estacionaria con acumulación de PHB ( $\mu_2$ ) para los
distintos batch y fedbatch, con los correspondientes coeficientes de regresión llineal y
cantidad de datos considerados.

مممور المام مام

1--

ala la valacidad da avasimistante

Table 1011. Offeria

Fermentación	μı	R² Aj.	Número de puntos	μ <sub>2</sub>	R² Aj.	Número de puntos
Erlenmeyer	0,115	0,993	5	0,006	0,942	10
Batch 3	0,118	0,932	3	0,004	-	2
Batch 4	0,127	0,971	4	0,014	0,756	4
Batch 5	0,125	-	2	0,013	0,983	4
Batch 6	0,123	0,956	3	0,010	0,841	8
Batch 7	0,114	-	2	0,011	0,784	8
Fedbatch 1	0,101	-	2	-	<0,63	-
Fedbatch 2	0,119	0,803	4	0,011	0,876	6
Promedio	0,118	0,009		0,012	0,002	

Las velocidades específicas de crecimiento de la biomasa ( $\mu_1$ ) calculadas para los distintos *batch* y *fedbatch* realizados en este trabajo de investigación, coinciden con el valor medido en Erlenmeyer. El promedio de las mismas tiene un valor de 0,118 ± 0,009, el cual es el mismo que el previamente calculado. Los R<sup>2</sup> ajustados varían entre 0,80 a 0,99, aunque en la mayoría de los casos es superior a 0,93. En algunos casos, la velocidad de crecimiento se estimó con sólo dos puntos, por lo tanto, carecen de grados de libertad y de R<sup>2</sup> ajustado. Una buena cantidad de puntos es crucial para lograr un ajuste confiable.

En cambio, la velocidad de crecimiento de la fase estacionaria con acumulación del polímero ( $\mu_2$ ) cambia según las características de la fermentación. En la fermentación *fedbatch* 1, R<sup>2</sup> < 0,63, por lo que se desestimó este valor. En el caso de la fermentación *batch* 3 la etapa de acumulación de PHB se detuvo por falta sustrato. Este parámetro fue determinado sólo con 2 puntos, cuando ya se estaba deteniendo el metabolismo, es por ello que el valor obtenido es menor que el obtenido en Erlenmeyer. Por lo tanto, para obtener el promedio de la velocidad específica de acumulación de PHB se tuvieron en cuenta los valores obtenidos para las restantes fermentaciones. El promedio de las velocidades específicas de acumulación de PHB ( $\mu_2$ ) en biorreactor tiene un valor de 0,012 ± 0,002, lo que corresponde a más del doble del obtenido en Erlenmeyer. Como se ha mencionado antes, el biorreactor es un fermentador más eficiente que los frascos agitados, por lo tanto, duplica la velocidad de producción del biopolímero.

En todos los casos  $\mu_2$  tiene valores semejantes, sin embargo, la diferencia radica en la biomasa con la que comienza esta etapa. En los tres primeros *batch*, con el mismo medio de cultivo, la velocidad de acumulación aumenta con la aireación. En el batch 3, con aireación regulado por O<sub>2</sub> disuelto, la producción de biomasa que alcanza los mismos valores que alcanza el *batch* 4 al inicio de la misma etapa, por lo que el medio optimizado resultó óptimo para la producción de biomasa total, en este punto del proceso. Sin embargo, al agotarse las fuentes de C y N, no pudo continuar la acumulación de PHB. En los *batch* 4 y 5, el aumento de las fuentes de C y N en un 50 % favorecieron la acumulación de biomasa respecto del *batch* 3. En los *batch* 6 y 7 el aumento de un 100 % en las concentraciones de C y N, favoreció aún más la producción de biomasa. En las fermentaciones en *fedbatch* se alimentó en N y C, de modo que la biomasa alcance mayores valores al entrar en esta etapa. El mayor aumento en la acumulación de PHB se logró al utilizar una alimentación exponencial que acompañara la fase de crecimiento exponencial de *C. necator*.

Otro aspecto a tener en cuenta es la concentración de N y el rendimiento Y<sub>P/X</sub>. El Y<sub>P/X</sub> de *C. necator* ATCC 17697 en medio rico es de aproximadamente 0,2. Esta relación se mantiene constante en la fase de crecimiento exponencial. Cuando la concentración de N se hace 0 el Y<sub>P/X</sub> comienza a aumentar, como se ya se ha mencionado en las fermentaciones. Por lo tanto, la relación Y<sub>P/X</sub> permanece constante durante la fase lag y exponencial. Y aumenta en la fase de acumulación de polímero, cuando la bacteria crece a velocidad  $\mu_2$ .

Un modelo matemático plausible para describir la cinética de la fermentación de *C. necator* ATCC 17697 en términos de la biomasa residual y la acumulación de polímero se detalla en el Anexo 2.

#### 4.3.5 Referencias

- 1. Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. J Ind Microbiol Biotechnol. 1999;23(6):456–75.
- Khanna S, Srivastava AK. Repeated batch cultivation of Ralstonia eutropha for poly (β-hydroxybutyrate) production. Biotechnol Lett. 2005;27(18):1401–3.

- Mozumder SI, Wever H De, Volcke EIP. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. Process Biochem [Internet]. 2014;49(3):365–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004
- Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by Ralstonia eutropha and its recombinant strain. 2004;83:79–86.
- Obruca S, Petrik S, Benesova P, Svoboda Z, Eremka L, Marova I. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(13):5883–90.
- López-Cuellar MR, Alba-Flores J, Rodríguez JNG, Pérez-Guevara F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. Int J Biol Macromol. 2011;48(1):74–80.
- Khanna S, Srivastava AK. Productivity enhancement of poly-(βhydroxybutyrate) by fed-batch cultivation of nutrients using variable (decreasing) nutrient rate by Wautersia eutropha. Chem Eng Commun. 2008;195(11):1424–36.

# 4.4 Caracterización del biopolímero sintetizado

# 4.4.1 Extracción y purificación del biopolímero

El biopolímero bacteriano producido por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa se extrajo de una biomasa liofilizada, mediante dos técnicas: digestión alcalina con hipoclorito de sodio y extracción con cloroformo (Ver sección 3.4.2). Luego fue purificado a través de dos etapas a baja temperatura (Fig. 4.4.1).



Figura 4.4.1: Biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa, purificado mediante dos etapas a baja temperatura.

El biopolímero purificado, presentó color blanco y textura de polvo fino después del proceso de molido.

# 4.4.2 Caracterización físico-química del biopolímero

### DSC

Las propiedades térmicas de biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa se determinaron mediante técnica de DSC (ver sección 3.4.4). La temperatura de fusión ( $T_m$ ), la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la cristalinidad ( $X_c$ ) son parámetros claves para el procesamiento y las aplicaciones de los polímeros. Las curvas obtenidas a partir del segundo calentamiento de la muestra se presentan en la Figura 4.4.2.



Figura 4.4.2: Termograma DSC para biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa.

Se determinaron los valores de la Tm de 165,4 °C, T<sub>g</sub> de 3,5 °C y de la temperatura de cristalización (T<sub>c</sub>) de 54,3 °C. A partir de estos datos se calculó la entalpía de fusión (H<sub>m</sub>) de 81,3 J/g y el grado de cristalinidad de 56 %. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para biopolímero PHB (1,2).

#### ATR-FTIR

Mediante esta técnica se pudo verificar la presencia de los principales grupos funcionales del biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa. La Figura 4.4.3 muestra el espectro ATR-FTIR de las muestras del biopolímero extraído a partir de biomasa liofilizada mediante dos técnicas: digestión alcalina con hipoclorito de sodio y extracción con cloroformo y el PHB disponible comercialmente Biocycle<sup>®</sup> 1000 (PHB Industrial S/A, Brasil).



Figura 4.4.3: Espectros ATR-FTIR de PHB disponible comercialmente (B) y biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa extraído con técnica de digestión con hipoclorito de sodio (A) y con cloroformo (C).

El espectro IR reveló una banda intensa a 1720 cm<sup>-1</sup> asociada al estiramiento de la unión C=O, que corresponde al grupo éster carbonilo característico de los PHAs (3,4). Otra banda acompañante localizada a 1181 cm<sup>-1</sup> es bien conocida en el espectro FTIR del PHB debido a la vibración de estiramiento asimétrico del grupo C-O-C. Los enlaces de C-H que se extienden desde los grupos metilo y etílico en el polímero se asignaron a las bandas situadas en la región espectral alrededor de 2900 cm<sup>-1</sup>. Los espectros ATR-IR obtenidos del polímero producido por fermentación y extraído mediante dos técnicas concuerdan con los espectros correspondientes al PHB comercial (5).

### RMN

Las Figuras 4.4.4 y 4.4.5 muestran los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C del biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa, respectivamente.



Figura 4.4.4: Espectros de RMN-<sup>1</sup>H del biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa.



Figura 4.4.5: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa.

En el espectro <sup>1</sup>H RMN del polímero, el doblete de cuadruplete a 2,45-2,63 ppm y el multiplete a 5,26 ppm, corresponde a los protones metileno (-CH<sub>2</sub>-) y metano

(-OCH-) de la cadena principal, respectivamente. El doblete a 1,27 ppm se atribuye a los protones metilo (-CH<sub>3</sub>) de la cadena lateral del PHB. Los picos observados corresponden a los reportados anteriormente para la estructura del PHB (6). En el espectro <sup>13</sup>C RMN del polímero, las señales en desplazamientos químicos (ppm): 169,3; 67,7; 40,1; 19,9 fueron asignadas a -CO-, -CH-, -CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>3</sub>, respectivamente. La señal a aproximadamente 0,77 ppm es un triplete que corresponde al solvente, CDCl<sub>3</sub>. El análisis de RMN <sup>13</sup>C está de acuerdo con los valores esperados para la estructura química del PHB (6).

Por lo tanto, mediante los análisis de DSC, ATR-FTIR y RMN se puede afirmar que el polímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa tiene propiedades físico químicas de PHB bacteriano.

## 4.4.3 Elaboración y caracterización de membranas de PHB

Se elaboraron membranas de biopolímero PHB sintetizado de 0,10 <u>+</u> 0,05 mm de espesor mediante la técnica de evaporación del solvente ("solvent casting method") (ver sección 3.5.1) (Fig. 4.4.6).



Figura 4.4.6: Foto de una membrana producida con el PHB sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa.

Para estudiar el comportamiento mecánico de las membranas, se realizaron ensayos de tracción (ver Sección 3.5.2). Los resultados obtenidos se

compararon con el comportamiento mecánico de membranas porosas elaboradas con PHBV comercial en nuestro grupo de investigación (Fig. 4.5.7).



Figura 4.4.7: Ensayos de tracción de las membranas producidas con PHB sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa (A) y membrana producida PHBV comercial (B).

En la Tabla 4.4.1 se muestran las propiedades mecánicas obtenidas a partir de estos ensayos de tracción.

Tabla 4.4.1: Valores característicos de la curva tensión-deformación de las membranas producidas con biopolímero sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa. Se los compara con los de PHBV comercial

	Biopolímero C.	
	necator	PHBV comercial
Módulo (GPa)	1,1 ± 0,15	0,97 ± 0,05
Tensión max. (MPa)	16 ± 5	12 ± 4
Deformación max.	2 ± 1	3 ± 1

Los valores del módulo tensil, la tensión máxima y la deformación máxima de la membrana elaborada con el biopolímero producido por fermentación bacteriana son comparables a los de las membranas porosas elaboradas en nuestro grupo de investigación para uso biomédico. Se destaca un pequeño incremento en el módulo tensil (pendiente al comienzo de la curva) de las membranas elaboradas
con el PHB producido en este trabajo. El módulo, que caracteriza la rigidez, se incrementa por la mayor cristalinidad del PHB respecto a la del PHBV comercial (8%mol de HV).

La extracción del PHB sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa, mediante disolventes orgánicos representó un buen método debido a la alta pureza del polímero y óptimas propiedades mecánicas de las membranas, semejantes a las membranas porosas para uso biomédico.

## 4.4.4 Ensayos de citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad indirecta y directa del biopolímero purificado y de las membranas, respectivamente (ver sección 3.5.3). Como controles del ensayo se utilizaron: medio de cultivo celular puro como control nulo, latex como control positivo y Teflon (DuPont, DE) como control negativo, según norma ISO 10993-5:2009.

Para determinar la citotoxicidad indirecta se realizaron pruebas con el extracto puro y una dilución 1/16. Para preparar el extracto puro se incubó el polímero a analizar en medio de cultivo celular en una relación 6:1 medio (ml): polímero (g) por 72 h.

Se compararon las fotografías microscópicas obtenidas para los ensayos de control y del biopolímero con el extracto puro y con una dilución 1/16 (Fig. 4.4.8).



Figura 4.4.8: Ensayo de citotoxicidad indirecta. Realizado con el polímero producido por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa.

Los resultados mostraron que el material polimérico sintetizado por C. necator ATCC 17697 en medio de cultivo optimizado presentó efecto citotóxico nulo; es decir, no hubo alteraciones en la morfología, tampoco muerte celular ni levantamiento de la mono-capa de fibroblastos, tanto para la dilución 1/16 como para el extracto.



Figura 4.4.9: Ensayo de citotoxicidad directa. Realizado con ellas membranas elaboradas con el polímero producido por *C. necator* a partir de fructosa.

En el ensayo de citotoxicidad directa (Figura 4.4.9), también se obtuvo un resultado negativo, es decir, la membrana elaborada con el PHB sintetizado por *C. necator*, no liberó sustancias tóxicas para la célula.

Para ambos ensayos, en el control positivo, se observa que no hay formación de mono capa de fibroblastos, por lo tanto, son citotóxicos. En los controles nulo y negativo, de ambos ensayos, hay formación de mono capa de fibroblastos, lo que indica que tienen efecto citotóxico nulo.

Por lo tanto, el material polimérico sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 a partir de fructosa como las membranas elaboradas con el mismo, demostraron ser no citotóxicas, lo que resulta promisorio para su aplicación biomédica.

## 4.4.5 Referencias

- Williams SF, Martin DP. Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. Biopolym Online. 2005;(January):1–38.
- Valappil SP, Misra SK, Boccaccini AR, Keshavarz T, Bucke C, Roy I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised Bacillus cereus SPV. J Biotechnol. 2007;132(3):251–8.
- Bayarı S, Severcan F. FTIR study of biodegradable biopolymers : P ( 3HB ), P ( 3HB- co -4HB ) and P ( 3HB- co -3HV ). 2005;747:529–34.
- 4. Aramvash A, Shahabi ZA, Aghjeh SD, Ghafari MD. Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by Cupriavidus necator. Int J Environ Sci Technol. 2015;12(7):2307–16.
- Aramvash A, Hajizadeh-Turchi S, Moazzeni-zavareh F, Gholami-Banadkuki N, Malek-sabet N, Akbari-Shahabi Z. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in Cupriavidus necator and its characterization. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016;87:397–404. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002
- Sindhu R, Ammu B, Binod P, Deepthi SK, Ramachandran KB, Soccol CR, et al. 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. Brazilian Arch Biol Technol. 2011;54(4):783–94.

# 4.5 Estudio de la producción y degradación intracelular de PHB

## 4.5.1 Análisis del perfil de producción y degradación

Se estudió la formación y degradación de gránulos de PHB en el citoplasma de *C. necator* ATCC 17697. Para tal fin, se preparó el inóculo del cultivo de *C. necator* crecido en medio TFL durante 24 h. El medio TFL (Triptona, Fructosa, Levadura) es un medio rico, sin limitación de nutrientes. Las células lavadas se inocularon al 5% en medio optimizado para la producción de PHB durante 72 h; luego se cultivaron 98 h en medio de degradación de PHB. Es decir, se cultivaron 170 h desde el tiempo de inoculación en medio optimizado hasta el tiempo de utilización de PHB. Se tomaron muestras a las 0 h (células crecidas 24 h en TFL), 24 h, 48 h, 72 h (células crecidas en medio optimizado) y 170 h (células crecidas en medio de utilización de PHB). Se midieron las concentraciones de fructosa, sulfato de amonio, biomasa y PHB (Fig. 4.5.1), y se prepararon muestras para observar en microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (MET) (Fig. 4.5.2 – 4.5.6).



Figura 4.5.1: Perfil de crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 incubada durante 170 h: 72 horas en medio de cultivo optimizado y luego, 98 h en medio de degradación de PHB. ( $\blacklozenge$ ) biomasa total, ( $\circ$ ) biomasa residual y ( $\bullet$ ) PHB, ( $\blacktriangle$ ) fructosa y ( $\blacksquare$ ) sulfato de amonio. En la parte superior se observa, a modo comparativo, una sección de las fotos tomadas por MET a 20000X, para cada una de las muestras.

#### Producción de PHB en medio rico

Se ha estudiado ampliamente que la limitación de nutrientes, como P, N, O y/o S, induce la producción y almacenamiento intracelular de PHAs como fuentes de C y energía (1). Sin embargo, poco se conoce sobre la producción de estos biopolímeros en medios ricos, es decir, sin limitación de nutrientes. En este trabajo se observó que *C. necator* ATCC 17697 es capaz de almacenar PHB también en medio rico, pero con un valor bajo. Las mediciones de biomasa y PHB en las muestras incubadas 24 h en medio TFL fueron  $3,47 \pm 0,09$  g/l y  $0,75 \pm 0,04$  g/l, respectivamente. Esto corresponde a un 22 % de polímero acumulado en la biomasa seca, equivalente a un Y<sub>P/X</sub> de 0,22 g/g (Tabla 4.5.1 a tiempo 0 h). Este resultado concuerda con el trabajo de Tian y colaboradores, en el que

demostraron que *C. necator* ATCC 17699, crecido en medio rico de soja (dextose – free tryptic soy broth) durante 24 h, es capaz de almacenar un 10 % de biomasa seca como PHB (2).

#### Producción de PHB en medio optimizado

El perfil de *C. necator* ATCC 17697 crecido en medio optimizado durante 72 h destaca las tres etapas observadas en el perfil de la bacteria en estudios preliminares: fases lag, exponencial y estacionaria con producción de PHB. Aunque no se puede definir la duración de las fases, para la cantidad de muestras tomadas, se puede afirmar que el período comprendido desde las 48 h hasta las 72 h, pertenece a la fase estacionaria, debido a que la biomasa residual permanece constante. La producción de PHB comienza en la fase exponencial y aumenta a medida que disminuye la concentración de sulfato de amonio. El rendimiento Y<sub>P/X</sub> permanece constante durante la fase exponencial y comienza a aumentar a las 48 h, cuando el nitrógeno se consume totalmente. En la fase estacionaria, el aumento de la biomasa total se debe exclusivamente al aumento de la concentración de PHB. Al final de esta etapa la biomasa total es de 7,43 ± 0,05 g/l, con un contenido de PHB de 4,62 ± 0,01 g/l, resultando la biomasa residual de 2,82 ± 0,06 g/l.

#### Degradación de PHB

En este perfil, se observa una cuarta etapa, la etapa de degradación de PHB, en la que el biopolímero almacenado se biodegrada intracelularmente. Esta etapa comienza cuando las células son transferidas a un medio sin fuente de C y en exceso de N. En efecto, al finalizar la cuarta etapa a las 98 h, la biomasa total disminuye a  $4,30 \pm 0,05$  g/l, junto con la disminución de la concentración de PHB hasta  $0,09 \pm 0,01$  g/l, consumiéndose casi totalmente. Sin embargo, la biomasa residual aumenta de 2,82 a 4,21 g/l  $\pm 0,05$  g/l en las 98 h cultivado en medio de utilización de PHB. Es decir que el almacenamiento de PHB como reserva de C y energía en las fases exponencial y estacionaria, permitió, no solo que las células sobrevivan sin fuente de carbono en el medio de cultivo de degradación de PHB, sino también aumente la concentración de biomasa residual en 1,4 g/l.

Se propone aquí, calcular un nuevo rendimiento, el rendimiento de biomasa residual en función del consumo polímero acumulado  $(Y_{X_R/P})$  como la relación

entre el aumento en la biomasa residual por el consumo de PHB, en ese período de tiempo:

$$Y_{X_R/P} = \frac{\Delta X_R}{\Delta PHB} = \frac{(4,21-2,82)g_{X_R}/l}{(4,62-0,09)g_{PHB}/l} = 0.31 \frac{g_{X_R}}{g_{PHB}}$$

En conclusión, el medio optimizado mediante diseño de experimentos, permite a la bacteria *C. necator* ATCC 17697 aumentar su biomasa a total a 7,43  $\pm$  0,05 g/l, con un contenido de PHB de 4,62  $\pm$  0,01 g/l, resultando la biomasa residual de 2,82  $\pm$  0,06 g/l, en 72 h. Luego transformar los 4.6 g de PHB acumulados en 1,4 g/l de biomasa residual, en 98 h, con un rendimiento de polímero acumulado en biomasa residual de 0,31 g/g. Logrando que el cultivo sobreviva 170 h de fermentación.

## 4.5.2 Análisis de micrografías MET

Mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión, se observa que el tamaño y la morfología de las células varían para diferentes medios y a lo largo de la fermentación.

Para estudiar estos procesos cuantitativamente, a partir de las micrografías MET se calcularon las áreas de las células y de los gránulos mediante un procesado de imágenes descrito en Materiales y Métodos (ver Sección 3.6.2 y Anexo 3).

#### C. necator ATCC 17697 en medio rico

Las micrografías MET muestran los gránulos de PHB dentro de las células de *C. necator* ATCC 17697 incubadas en medio rico TFL durante 24 h (Fig. 4.5.2) lo que confirma que *C. necator* ATCC 17697 almacena PHB en medio rico. Se observan coco-bacilos con áreas que varían entre 0,10 y 0,51  $\mu$ m<sup>2</sup>; más del 85 % de las células miden entre 0,1 y 0,35  $\mu$ m<sup>2</sup>. En el 50 % de las células se visibiliza un gránulo en su interior, el resto presenta de 2 a 6 gránulos. Si bien el tamaño de los gránulos varía de 0,01 a 0,18  $\mu$ m<sup>2</sup> de los cuales, más del 85 % de los mismos varía entre 0,01 y 0,08  $\mu$ m<sup>2</sup>.



Figura 4.5.2: Micrografía MET de *C. necator* ATCC 17697 inoculado en medio optimizado a las 0 h, incubado previamente en medio TFL durante 24 h. a) Microscopía óptica 1000X; b) MET 7000X, c) MET 20000X; d) MET 50000X; e) MET 85000X; f) MET 140000X, g) y h) áreas de las células y de los gránulos vs. frecuencia de aparición, respectivamente.

#### C. necator en medio optimizado para la producción de PHB

Imágenes de las células a las 24 horas en TFL (Fig. 4.5.2) y en fase temprana del cultivo optimizado, 24 h (Fig. 4.5.3) revelan resultados sorprendentes. Al cambiar a *C. necator* ATCC 17697 de medio rico al medio optimizado, el tamaño de las células se triplicó en largo y quintuplicó en área, en la fase inicial de la fermentación. Se puede visualizar tanto en las fotos de microscopía óptica como en las de electrónica de transmisión, que la mayoría de las células son cocobacilos, pero hay un grupo de bacilos muy alargados (Fig. 4.5.3). En las micrografías MET se midieron células con tamaños muy dispares, entre de 0,02  $\mu$ m<sup>2</sup> a 2,54  $\mu$ m<sup>2</sup>. Por medición directa sobre la micrografía MET se determinó una célula con un largo máximo de 5  $\mu$ m de largo y 2,54  $\mu$ m<sup>2</sup> de área, dentro de la cual se pueden contabilizar 17 gránulos con diámetros que comprenden desde 0,11  $\mu$ m hasta 0,64  $\mu$ m de diámetro (micrografía f). En la micrografía e pueden observarse dos células contiguas de 1,25  $\mu$ m y 4,5  $\mu$ m de largo; debido a la morfología que presenta podría tratarse de una célula de 5,75  $\mu$ m dividiéndose.

Una bacteria típica (por ejemplo, *Escherichia coli*) se alarga poco o nada. Crece hasta que alcanza aproximadamente el doble de la circunferencia original y luego se separa en dos células que son casi de igual tamaño (3). En *C. necator* ATCC 17697, en cambio, un aumento tan significativo en el largo celular podría estar relacionado con la capacidad de las células para detectar la limitación de nutrientes, en este caso de nitrógeno. Por lo tanto, el aumento del tamaño de la célula puede ser un factor de regulación necesario para maximizar la capacidad de la célula para el almacenamiento de gránulos. Sin embargo, el aumento del largo celular requiere de mayor investigación.

Por otro lado, en las micrografías g y h, se muestran células en las que se puede distinguir la membrana plasmática, dentro de la cual se evidencian secciones más gruesas, del mismo color que los gránulos. Una hipótesis para estas imágenes es que el PHB se sintetiza en el intersticio de la doble capa lipídica; la formación de gránulos se daría por la gemación hacia el citoplasma celular. Estos resultados concuerdan con el modelo de formación de gránulos "en ciernes" presentado por Thomson y colaboradores (4).

En las micrografías tomadas a las 48 h de incubación (Fig. 4.5.4) se observan células con áreas entre 0,05  $\mu$ m<sup>2</sup> hasta 0,68  $\mu$ m<sup>2</sup>, conteniendo hasta 5 gránulos de 0,01  $\mu$ m<sup>2</sup> hasta 0,13  $\mu$ m<sup>2</sup> de área.

Las micrografías de las muestras incubadas 72 h de en medio de cultivo optimizado (Fig. 4.5.5) revelaron la formación de 1 a 3 gránulos de PHAs de forma esférica. Se observó la coalescencia de gránulos, que podían dar lugar a un granulo único de 0,43  $\mu$ m<sup>2</sup> de área y 0,7  $\mu$ m de diámetro (Fig. 4.5.8.e) cuyo tamaño celular máximo es de 0,75  $\mu$ m<sup>2</sup> (Fig. 4.5.7.e).

Como conclusión, las tendencias de los tamaños de las células y gránulos de PHB intracelulares cambian en función del tiempo de fermentación en medio optimizado. En tiempos iniciales de la fermentación (24h) las células triplican el largo y quintuplican su área y luego se dividen. A lo largo de la fermentación los gránulos y las células aumentan su tamaño hasta alcanzar el tamaño máximo de un granulo único de 0,43  $\mu$ m<sup>2</sup> y tamaño celular máximo es de 0,75  $\mu$ m<sup>2</sup>.

Si bien Tian y colaboradores, realizaron un estudio similar donde midieron los largos de las células a diferentes tiempos de micrografías MET de la cepa *C. necator* ATCC 17699 (2), no realizaron un seguimiento del tamaño del tamaño de los gránulos en los distintos medios y a diferentes tiempos de incubación. El seguimiento de este proceso nos resultó fundamental para estudiar la cinética de formación y degradación de gránulos intra-citoplasmáticos de PHB en *C. necator*.



Figura 4.5.3: Micrografía de *C. necator* ATCC 17697 incubada en medio optimizado durante 24 h. a) Microscopía óptica 1000X; b) MET 7000X; c) y d) MET 20000X; e) MET 50000X y f) MET 140000X; g) y h) áreas de las células y de los gránulos vs. frecuencia de aparición, respectivamente.



Figura 4.5.4: Micrografía de *C. necator* ATCC 17697 incubada en medio optimizado durante 48 h. a) Microscopía óptica, 1000X; b) MET 7000X; c) y d) MET 20000X; e) MET 30000X y f) 85000X; g) y h) áreas de las células y de los gránulos vs. frecuencia de aparición, respectivamente.



Figura 4.5.5: Microscopía de *C. necator* ATCC 17697 incubado en medio TFL durante 72 h. Células inoculadas en medio optimizado (Tiempo 0). a) Microscopía óptica, 1000X; b) MET 7000X; c) y d) MET 20000X; e) 50000X; f) 85000X; g) y h) áreas de las células y de los gránulos vs. frecuencia de aparición, respectivamente.

#### C. necator en medio de utilización de PHB

Al pasar las células de *C. necator* ATCC 17697 incubadas 72 h en medio de cultivo optimizado al medio de cultivo de utilización de PHB, e incubarlas durante 98 h en este medio (170 h totales de incubación) (Fig. 4.5.6), los gránulos de PHB formados en la mayoría de las células se consumieron. El tamaño celular disminuyó a valores entre 0,01  $\mu$ m<sup>2</sup> y 0,37  $\mu$ m<sup>2</sup>, y los gránulos a áreas menores que 0,17  $\mu$ m<sup>2</sup>. Algunas células no consumieron su gránulo interno; probablemente, al pasarlas al medio de cultivo de utilización, ya no eran viables. La mayoría de las células presenta una zona oscura en el centro del citoplasma, en lugar de gránulos de PHB, en algunas se destaca una zona oscura con restos pequeños de los gránulos de PHB. Probablemente estas zonas oscuras pueden ser maquinarias celulares destinadas a la degradación del gránulo, que logran aumentar la biomasa residual, como se ha discutido en la primera sección de este análisis.



Figura 4.5.6: Micrografías de *C. necator* ATCC 17697 incubado 170 h, 72 h en medio optimizado para la producción de PHB y luego 98 h en medio de utilización de PHB. a) Microscopía óptica, 1000X; b) MET 7000X; c) MET 20000X; d) y e) MET 30000X; f) 50000X. g) y h) áreas de las células y de los gránulos vs. frecuencia de aparición, respectivamente.

#### Análisis integrado

En conclusión, el tamaño y la morfología de las células y el tamaño y la cantidad de gránulos intra-citoplasmáticos dependen del medio de cultivo y del tiempo de fermentación.

Para facilitar el análisis se muestran los valores de áreas de las células y de los gránulos de PHB máximos resumidos en la Tablas 4.5.1. La cantidad de gránulos que se halla por célula se muestra en la Tabla 4.5.2.

Tabla 4.5.1: Áreas máximas medidas para las células y los gránulos a distintos tiempos de incubación.

Área máximas (µm²)						
	0 h	24 h	48 h	72 h	170 h	
Área cellular	0,51	2,54	0,68	0,75	0,37	
Área de los gránulos	0,18	0,18	0,13	0,43	0,17	

Tabla 4.5.2: Cantidad de gránulos por célula a distintos tiempos de incubación.

Cantidad de gránulos por célula						
	011	24 11	40 11	1211	17011	
Mínimo	1	1	1	1	0	
Máximo	6	17	5	3	2	

Se observa que *C. necator* ATCC 17697 almacena 1 a 6 gránulos de PHB en medio de cultivo optimizado. Al pasar las células de un medio rico a un medio productor de PHB, en tiempos iniciales de la fermentación (24h) las células triplican el largo y quintuplican su área y los gránulos intracitoplasmáticos pueden aumentar hasta 17. Luego se dividen en células más pequeñas con una cantidad de gránulos similar a la del medio rico. A lo largo de la fermentación, los gránulos van aumentando su tamaño (excepto para 48 h donde los cortes eran de menor calidad), de modo que también aumenta el tamaño celular. A medida que aumenta el tamaño de los gránulos se observa coalescencia de 1 a 3 gránulos por célula. Finalmente, al pasarlos a medio de cultivo de utilización del PHB almacenado intracelularmente, los gránulos disminuyen su tamaño, hasta prácticamente desaparecer; por lo tanto, el tamaño de las células también disminuye. Aunque la biomasa residual, es decir la biomasa catalítica, aumenta.

## 4.5.3 Referencias

- 1. Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Vol. 40, Process Biochemistry. 2005. p. 607–19.
- 2. Tian J, Sinskey AJ, Stubbe JA. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in Wautersia eutropha H16 by transmission electron microscopy. J Bacteriol. 2005;
- 3. Ingraham JL, Maaløe O, Neidhardt FC. Growth of the bacterial cell. Sinauer Associates I, editor. Sunderland, Mass.; 1983.
- 4. Thomson N, Summers D, Sivaniah E. Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles. Vol. 6, Soft Matter. 2010. p. 4045–57.

# 4.6 Fuentes de carbono alternativas

El estudio de utilización de fuentes de carbono alternativos a fructosa grado PA se realizó con el fin de abaratar los costos de producción, evitar disposición final de los residuos en el ambiente y obtener biopolímeros PHAs con diferente composición monomérica. Se probaron subropductos y residuos agroindustriales como: glicerol residual (glicerina cruda) de una planta de Biodisel de la provincia de Córdoba; miel rica y melaza de caña de azúcar del Ingenio Concepción de Tucumán, yerba mate pos-infusión (SYM) y otras fuentes alternativas.

## 4.6.1 Glicerol

Inicialmente se realizó una prueba cualitativa de tolerancia, incubando *C. necator* ATCC 17697 en TFL que contenía adicionalmente 10 g/l de glicerol grado PA. Se observó un buen crecimiento de cultivo, similar al del cultivo control sin agregado de glicerol.

Luego se probaron diferentes concentraciones de glicerol analítico (10, 20, 30, 40 y 50 g/l) como única fuente de carbono en reemplazo de fructosa, en el medio de cultivo optimizado en este trabajo de tesis. Se utilizó el inóculo de 48 hs de células lavadas crecidas en TFL. Se tomaron muestras para medición de PHB biomasa y consumo de sustratos (Fig. 4.6.1).



Figura 4.6.1: Crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 en glicerol analítico a distintas concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50 g/l). Consumo de glicerol (a) y de sulfato de amonio (b), producción de biomasa (c) y de PHB (d).

El consumo de sulfato de amonio fue prácticamente total en todos los casos. El mismo hecho se observó para el consumo de glicerol en los experimentos con 10 g/l. Sin embargo, el consumo total de glicerol es mayor en el experimento con 50 g/l. (Fig. 4.6.1 a, b), La producción de biomasa y PHB a las 96 h es escasa, sin embargo, a las 186 h ascendió proporcional a la concentración de glicerol, llegando a los valores máximos de 4,57 g/l y 2,63 g/l respectivamente (Fig. 4.6.1 c, d), con una productividad de PHB de 0,02 g/(l.h).

Cabe destacar que para todas las concentraciones de glicerol probadas, se observó una gran fase lag de cultivo entre 70 y 90 horas. Para disminuir esta fase lag, se realizaron experimentos con un inóculo de 73 h crecido en el mismo medio que se utilizó para los cultivos experimentales.



Figura 4.6.2: Producción de PHA y biomasa a partir de inóculo de *C. necator* ATCC 17697 adaptado al glicerol.

A diferencia de lo observado en el experimento anterior, el aumento de concentración de sustrato en el medio de cultivo, provocó disminución de la producción de biomasa y polímero alcanzando a sus máximos valores en 93 h de incubación. Se halló la concentración óptima de 20 g/l de glicerol con la cantidad de biomasa y PHA de 4,3 g/l y 2,22 g/l, respectivamente (Fig.4.6.2). De este modo, con menor gasto de sustrato se logró aumentar la productividad de PHA a 0,05 g/(l.h). Posteriormente se realizaron experimentos de producción de polímero en medio de cultivo con glicerol residual en las condiciones y la concentración óptima obtenida anteriormente de 20 g/l. (Fig. 4.6.3).



Figura 4.6.3: Producción de biomasa (♦) y PHA (●) con *C. necator* ATCC 17697 en glicerol residual.

*C. necator* ATCC 17697 muestra un rápido crecimiento y acumulación de PHA en el medio de cultivo con glicerol residual. En 21 h se obtuvieron 3,8 ± 0,6 g/l de biomasa con un contenido de 2,2 ± 0,2 g/l de PHA. En este tiempo se logró un rendimiento de Y<sub>P/X</sub> de 0,59 g/g y una productividad volumétrica de 0,1 g/(l.h). Posteriormente la biomasa aumentó, pero la concentración de PHA permanece relativamente constante en el cultivo.

Las pruebas con el inóculo de 22 h dieron los mismos resultados, por lo tanto se pudo optimizar la variable de tiempo de inóculo para proceso productivo.

## 4.6.2 Melaza

Las pruebas de utilización de melaza residual cruda y tratada térmicamente (ver Anexo 5) para la producción de polímero se realizaron durante 72 h en el medio de cultivo optimizado, donde varían las concentraciones de melaza y fructosa.

Las mayores concentraciones de biomasa y PHB se obtuvieron en los experimentos a las 24 h (Fig. 4.6.4).



Figura 4.6.4: Producción de PHA y biomasa con *C. necator* ATCC 17697 en medios suplementados con melaza residual.

En el medio control (C), con 5 g/l de fructosa como fuente de carbono, se obtuvieron 2,4  $\pm$  0,1 g/l y 0,5  $\pm$  0,02 g/l de biomasa y PHB, respectivamente. No se observó el crecimiento de cultivo en el medio con melaza como única fuente

de carbono (medio MC, con 10 g/l de melaza). Sin embargo, al suplementar el medio que contiene fructosa (5 g/l) con melaza tratada térmicamente en concentración 20 g/l (MT.20) y melaza cruda en concentraciones 10 g/l (Medio M.10), 20 g/l (medio M.20) y 30 g/l (medio M.30) aumentaron las cantidades de biomasa y PHA en todos los casos, respecto al control. En el medio M.20 se obtuvieron los valores más significativos: las concentraciones de biomasa y PHB aumentaron a  $3,7 \pm 0,2$  g/l y  $0,9 \pm 0,02$  g/l, respectivamente.

El tratamiento térmico de melaza no tuvo ningún efecto significativo sobre el crecimiento de cultivo de *C. necator* ATCC 17697 y la producción de PHA y de biomasa (ver Anexo 4)

## 4.6.3 Yerba mate

Según la investigación de Koller y colaboradores, fuentes de nitrógeno complejas mejoran la producción de PHB por *C. necator* (1). Interesaba, en este trabajo, probar fuentes residuales nacionales como fuente de nitrógeno complejas. Teniendo en cuenta que los residuos de yerba mate poseen este tipo de fuentes y considerando que tiene presencia significativa en los residuos domiciliarios orgánicos en Argentina (2), se decidió evaluar el efecto de suplementar el medio de cultivo con infusión de yerba mate, que es una solución de yerba mate (SYM) sin sólidos según Anexo 5. Las pruebas para la producción de polímero realizadas durante 72 h con en el medio de cultivo optimizado, donde varían las concentraciones de SYM y fructosa, se detallan en el Anexo 5. Las mayores concentraciones de biomasa y PHB para todos los experimentos se lograron a las 48 h (Fig. 4.6.5).



Figura 4.6.5: Crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 y acumulación de PHA en medio optimizado con diferentes concentraciones de SYM.

En el medio de cultivo control (C), con 10 g/l de fructosa como fuente de carbono, se obtuvieron 4,3 g/l de biomasa, con un contenido de PHB de 1,6 g/l y rendimiento  $Y_{P/X}$  0,37 g/g. En el medio de cultivo sin fructosa, pero con yerba mate en concentración 1% v/v (SYM C), no se observó crecimiento bacteriano. Al suplementar el medio de cultivo que contiene fructosa (10 g/l) con SYM en concentraciones 1% (SYM 1), 3% (SYM 3), 6% (SYM 6) y 9% (SYM 9) la producción de biomasa varía levemente. La concentración de polímero acumulado y el rendimiento Y<sub>P/X</sub> en el medio SYM 1 % aumentaron hasta 2 g/l y 0,48 g/g, respectivamente. Sin embargo, al aumentar la concentración de suplemento de 3% a 9%, disminuyo la acumulación intracelular de PHA, Por lo tanto, la suplementación del medio de cultivo con solución de PHA.

#### 4.6.4 Melaza y yerba mate

Se formularon 3 medios de cultivo con fructosa en concentración de 10 g/l y diferentes combinaciones de suplementos de melaza, con el objetivo de aumentar la producción de biomasa, y SYM, para aumentar la concentración de PHB (Tabla 4.6.1). Otros componentes del medio se mantuvieron iguales al del medio optimizado. Los cultivos se incubaron durante 48 h.

Experimento	Fructosa	Melaza	SYM
Experimente	g/l	g/l	% v/v
С	10	0	0
SYM	10	0	1%
Melaza	10	20	0
SYM + Melaza	10	20	1%

Tabla 4.6.1: Medio de cultivo optimizado suplementado con SYM y melaza.

Las mayores concentraciones de biomasa y PHB para todos los experimentos se lograron al cabo de 24 h (Fig. 4.6.6).



Figura 4.6.6: Crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 y acumulación de PHA en los medios suplementados con SYM y melaza.

La suplementación del medio C con ambos residuos mejoró la producción de biomasa y polímero acumulado hasta 4,97 g/l y 2,55 g/l, respectivamente. Este resultado es un camino potente para la formulación de un medio de cultivo para la producción PHB a través de fuentes residuales nacionales por medio de *C. necator* ATCC 17697.

## 4.6.5 Otras fuentes de carbono alternativas

Para evaluar la posibilidad de producir distintos PHAs la fructosa en el medio de cultivo optimizado fue suplementada con ácidos orgánicos de cadena larga,

motivados por los trabajos citados en antecedentes (Ver Tabla 2.3.1). Estos mediante *C. necator* ATCC 17697 en medio de cultivo optimizado con fructosa 20 g/l suplementado con tres tipos de ácidos orgánicos en concentración 1 g/l. En la tabla 4.6.2 se muestran las concentraciones de biomasa y PHB obtenidas y el rendimiento Y<sub>P/X</sub> y P<sub>PHA</sub> calculadas para las 72 de fermentación.

Tabla 4.6.2: Crecimiento de *C. necator* y acumulación de biopolímero en medio de cultivo optimizado suplementado con 1 g/l de ácidos orgánicos de cadena larga.

Suplemento de						
fuente de carbono	Biomasa	±	PHA	±	Y <sub>P/X</sub>	PPHA
	g/l		g/l		g/g	g/(l.h)
Ac. Miristico	4,95	0,35	2,8763146	0,24	0,581	0,040
Ac. Estearico	6,32	0,35	4,0502691	0,59	0,641	0,056
Ac. Palmitico	5,65	0,87	2,9040856	1,26	0,514	0,040

En los tres casos se observa un muy buen crecimiento y acumulación de polímero intracelular. Los rendimientos y productividades son similares a los obtenidos con el medio de cultivo optimizado, siendo el de mayores valores el experimento con suplemento de ácido esteárico.

Los resultados más relevantes con suplementos y fuentes de carbono alternativos probados en este trabajo de investigación, se resumen en la tabla 4.6.3.

Tabla 4.6.3: Medios de cultivo investigados para la producción de PHAs por *C. necator*. Los demás componentes del medio de cultivo, son las del medio de cultivo optimizado.

Fuente alternativa		Fructosa	Biomasa	PHA	Yp/x	P <sub>PHA</sub>
de C	g/l	g/l	g/l	g/l	g/g	g/(l.h)
Medio optimizado	0	20	6,5	4,6	0,70	0,06
Glicerol residual	20	0	6,4	2,2	0,35	0,10
SYM + melaza	1% y 20	10	5,0	2,6	0,51	0,05
Ac. Mirístico	1	20	4,9	2,9	0,58	0,04
Ac. Esteárico	1	20	6,3	4,1	0,64	0,06
Ac. Palmítico	1	20	5,7	2,9	0,51	0,04

A partir de las biomasas obtenidos con estos medios de cultivo estudiados y discutidos en esta sección se extrajo y purificó el polímero a fin de caracterizarlo para evaluar el tipo de polímero producido. Para evaluar esto, se realizaron pruebas de caracterización que se mostrarán en la siguiente sección.

#### 4.6.6 Caracterización química

Los espectros de RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H de los polímeros sintetizado por *C. necator* ATCC 17697 crecido en los medios de cultivo resumidos en la Tabla 4.6.3 se muestran en el Anexo 6.

En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los biopolímeros sintetizados por *C. necator* ATCC 17697 en medios de cultivo optimizados con glicerol, melaza y SYM, aceite de ác. mirístico, ác. esteárico y ác. palmítico, (Anexo 6) se observaron resultados similares a los del biopolímero PHB sintetizado a partir de fructosa. En todos estos espectros RMN-<sup>1</sup>H las señales en desplazamientos químicos (ppm): aproximadamente en 169, 67, 40 y 19,7 fueron asignadas a -CO-, -CH-, - CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>3</sub>, respectivamente.

En los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de los PHAs sintetizados por C. necator ATCC 17697 en medios de cultivo optimizados con glicerol, melaza y SYM, ác. mirístico, ác. esteárico y ác. palmítico (Anexo 6), se observaron las mismas señales características: El doblete de cuadruplete a 2,45-2,63 ppm y el multiplete a 5,26 ppm, corresponde a los protones metileno (-CH<sub>2</sub>-) y metano (-OCH-) de la cadena principal, respectivamente. El doblete a 1,27 ppm se atribuye a los protones metilo (-CH<sub>3</sub>) de la cadena lateral del PHB. Además, en todos los casos, se observan picos en aproximadamente 0,89 ppm y 1,6 ppm, con muy baja señal. Las señales alrededor de 0,89 ppm se asignan para el grupo CH<sub>3</sub> del monómero HV (3). Sin embargo, la relación de las áreas de integración correspondientes a los picos de 0.89 ppm (CH<sub>3</sub> de HV) y 1.27 ppm (CH<sub>3</sub> de HB) de un valor aproximado de 0.5 %. Por lo tanto, en ninguno de estos casos puede asegurarse la presencia de HV u algún otro monómero que no sea HB en la cadena polimérica sintetizada por C. necator ATCC 17697 a partir de los medios de cultivo estudiados en este trabajo de investigación. Los picos observados corresponden a los reportados anteriormente para la estructura del PHB (4) y con los observadas para el biopolímero PHB sintetizado por . *necator* ATCC 17697 a partir de fructosa.

En ninguno de los casos se puede asegurar la presencia monómeros constituyentes diferentes a HB.

## 4.6.7 Referencias

- Koller M, Bona R, Hermann C, Horvat P, Martinz J, Neto J, et al. Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) with Wautersia eutropha by application of green grass juice and silage juice as additional complex substrates. Biocatal Biotransformation. 2005;23(5):329–37.
- 2. Https://www.infocampo.com.ar/el-consumo-de-yerba-mate-en-argentinaesta-estancado-desde-hace-diez-anos/. Accedido el 28/2/2019.
- Aramvash A, Hajizadeh-Turchi S, Moazzeni-zavareh F, Gholami-Banadkuki N, Malek-sabet N, Akbari-Shahabi Z. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in Cupriavidus necator and its characterization. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016;87:397–404. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002
- Sindhu R, Ammu B, Binod P, Deepthi SK, Ramachandran KB, Soccol CR, et al. 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. Brazilian Arch Biol Technol. 2011;54(4):783–94.

# 5. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo de investigación están presentadas a partir de los resultados de cada sección del Capítulo 4.

1. *C. necator* ATCC 17697 es capaz de acumular el polímero PHB en forma de gránulos intra-citoplasmáticos en condiciones de estrés nutricional en el medio de cultivo con fructosa como única fuente de carbono. Durante 72 h de fermentación se produjo la máxima cantidad de PHB de 1,9 g/l.

2. El diseño de experimentos acoplado a la metodología RSM resultaron herramientas útiles para la optimización del inóculo y del medio de cultivo con fructosa en Erlenmeyer. Se estableció la edad y concentración de inoculo óptimas como 24 h y 5%, respectivamente. El modelo ajustado para el medio de cultivo presentó un máximo en C=20,412, N=1,50, pH=7,5, P=8,74, y M resultó no significativa. El valor experimental del punto optimizado y validado fue de 4,6 g/l de PHB, lo que corresponde a un aumento de casi 2,5 veces, respecto a los experimentos iniciales. Los rendimientos Y<sub>P/X</sub>, Y<sub>P/S</sub> y YP<sub>X/S</sub>, y la P<sub>PHB</sub> de 0,70 g/g, 0,31 g/g, 0,44 g/g y 0,06 g/(l.h), del punto optimizado, resultaron máximas para todos los puntos experimentales del diseño. En estas condiciones se definió la relación óptima de C/N de 25. Se determinó la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial ( $\mu_1$ ) de 0,115 ± 0,05, calculado a partir de 5 puntos experimentales y la velocidad de crecimiento en la fase estacionaria ( $\mu_2$ ) de 0,006 ± 0,0005 calculado a partir de 10 puntos experimentales.

3. En biorreactor con el medio optimizado y agitación en cascada del O<sub>2</sub> disuelto, mejoró la producción de biomasa en menos de la mitad de tiempo y la productividad de PHB de 0,06 a 0,11 g/(l.h), respecto a Erlenmeyer con el medio optimizado, sin embargo, no resultó óptima para la producción de PHB. Con el aumento de las cantidades de C y N en el medio hasta 50 % se logró ascender la producción de biomasa y PHB a 11 y 8 g/l, respectivamente. Con el aumento hasta 100% se logró ascender la producción de biomasa y PHB a 12 y 8 g/l, respectivamente.

Con la estrategia *fedbatch*, en la que se aplicó una alimentación regulada por el oxígeno disuelto se logró un aumento del 50 % en la producción de PHB, respecto a las fermentaciones *batch*. Con la estrategia *fedbatch* en la que se aplicó alimentación exponencial se logró llegar a una concentración de PHB de 25,7 con una productividad volumétrica máxima de 0,43 g/(l.h) en De este modo, la concentración de PHB se aumentó un 150 % respecto a la fermentación *batch* y más de 5 veces respecto a la fermentación en escala de Erlenmeyer en medio optimizado.

Las velocidades específicas de crecimiento de la biomasa ( $\mu_1$ ) calculadas en escala de fermentador coincidieron con el valor  $\mu$ 1 medido en Erlenmeyer.

Se demostró que el crecimiento de *C. necator* ATCC 17697 tiene un comportamiento particular: un  $\mu$  distinto de cero en la fase estacionaria, lo que difiere del crecimiento microbiano típico. Esta diferencia se atribuyó a la capacidad de *C. necator* ATCC 17697 de acumular biopolímero, que continúa incrementándose aun cuando la biomasa residual haya alcanzado su valor máximo y constante en el estado estacionario. En todos los casos  $\mu_2$  tiene valores semejantes, sin embargo, la diferencia radica en el valor de biomasa con la que comienza esta etapa.

El Y<sub>P/X</sub> de *C. necator* ATCC 17697 en medio rico es de aproximadamente 0,2. Este valor se mantiene constante en las fases lag y exponencial. Cuando el nitrógeno se agota el Y<sub>P/X</sub> asciende en la fase de estacionaria

4. El biopolímero PHB obtenido a partir de *C. necator* ATCC 17697, resultó apto para la producción de membranas que resultaron no citotóxicas y cuyas propiedades mecánicas fueron comparables con las de membranas de uso biomédico desarrolladas por nuestro equipo de trabajo. Estos resultados alientan a considerar al biomaterial producido en esta tesis para aplicaciones biomédicas.

5. Mediante el análisis de las micrografías MET se confirmó que la bacteria puede acumular PHB también sin limitación de nutrientes. En el medio de cultivo optimizado, se observaron resultados novedosos: las células triplican su largo para posteriormente dividirse en células más pequeñas, mientras que los gránulos van aumentando su tamaño. En un medio de cultivo sin fuente de carbono los gránulos disminuyen su tamaño, hasta prácticamente desaparecer,

transformándose en biomasa catalítica o residual con un rendimiento de biomasa residual en función de polímero acumulado de 0,31 g/g. Logrando que el cultivo sobreviva 170 h de fermentación.

6. De los residuos industriales empleados como fuentes de carbono alternativas para la producción de PHAs por *C. necator* ATCC 17697, glicerol residual y melaza de caña de azúcar resultaron ser más prometedoras. La productividad volumétrica en glicerol de 0,10 g/(l.h) es superior a la productividad de 0,06 g/(l.h) en fructosa.

# Anexo

Anexo 1: Fermentador BioFlo 110 de New Brunswick Scientific utilizado en el proceso de escalado conteniendo una fermentación de *C. necator* ATCC 17697



## Anexo 2: Modelo matemático propuesto

Considerando que

$$X = R + P \tag{2.2.2}$$

$$y \mu = \frac{d\ln X}{dt} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$$
(2.2.9)

se propone que

$$P = R. p \tag{1}$$

donde p es el porcentaje de polímero promedio por bacteria, equivalente al rendimiento Y<sub>P/X</sub>

De esta forma se obtiene una nueva expresión para la biomasa y polímero acumulado

$$X = R.(1 + p)$$
 (2)

$$P = X.\frac{p}{1+p}$$
(3)

Igualando 1 y 3 se obtiene

$$R = X.\frac{1}{1+p}$$
(4)

Derivando la ecuación 1 se obtiene

$$\frac{\mathrm{dP}}{\mathrm{dt}} = \frac{\mathrm{dR}}{\mathrm{dt}} \cdot \mathbf{p} + \frac{\mathrm{dp}}{\mathrm{dt}} \cdot \mathbf{R}$$
(5)

Por otro lado, aplicando In en Ec. 2 se obtiene

$$\ln(X) = \ln(R) + \ln(1+p)$$
(6)

En la fase exponencial,  $\frac{dp}{dt} = 0$ , pues Y<sub>P/X</sub> es constante; luego las ecuaciones 2 y 5 se reducen a:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dR}{dt} \cdot p_{\min}$$
(7)

$$X = R. (1 + p_{min})$$
 (8)

donde  $p_{min}$  es el p inicial o mínimo de *C. necator*.

Aplicando In a la ec (4) y derivando respecto al tiempo resulta

$$\frac{\mathrm{dlnX}}{\mathrm{dt}} = \frac{\mathrm{dlnR}}{\mathrm{dt}} \tag{9}$$

El primer término es  $\mu_1$ , de modo que la biomasa residual crece con la misma velocidad que la biomasa total en la fase exponencial.

En la fase de acumulación de polímero,  $\frac{dR}{dt} = 0$ , por lo tanto la ecuación 5 queda:

$$\frac{\mathrm{dP}}{\mathrm{dt}} = \frac{\mathrm{dp}}{\mathrm{dt}} \,.\,\mathrm{R}_{\mathrm{máx}} \tag{10}$$

donde  $R_{max}$  es la biomasa residual máxima que se alcanzó en la fase exponencial y permanece constante en la fase de acumulación de polímero.

#### Derivando la ecuación 2

$$\frac{\mathrm{dX}}{\mathrm{dt}} = \frac{\mathrm{d}(1+\mathrm{p})}{\mathrm{dt}} \,.\,\mathrm{R}_{\mathrm{máx}} \tag{11}$$

$$\frac{\mathrm{dX}}{\mathrm{dt}}\frac{1}{\mathrm{X}} = \frac{\mathrm{d}(1+\mathrm{p})}{\mathrm{dt}} \cdot \frac{\mathrm{R}_{\mathrm{máx}}}{\mathrm{X}}$$
(12)

Sabiendo que

$$\frac{\mathrm{dX}}{\mathrm{dt}}\frac{1}{\mathrm{X}} = \frac{\mathrm{dln}(\mathrm{X})}{\mathrm{dt}} = \mu \tag{13}$$

$$\frac{d\ln(X)}{dt} = \frac{d(1+p)}{dt} \cdot \frac{1}{1+p_e} = \mu_2$$
(14)

donde  $p_e$  es el porcentaje de polímero alcanzado al final de la etapa exponencial. Integrando la ecuación entre la finalización de fase exponencial y un tiempo (t)

$$\int_{p_e}^{p_t} (1+p) dp = \int_{t_e}^{t} \mu_2 dt$$
 (15)

$$\ln \frac{1+p}{1+p_0} = \mu_2. (t - t_0) \tag{16}$$

$$\frac{1+p}{1+p_0} = e^{\mu_2} \cdot (t - t_0) \tag{17}$$

Para determinar  $p_{min}$  y  $R_{máx}$  se requiere incrementar la frecuencia de medición de la biomasa total en función del tiempo. Estos ensayos forman parte de las actividades consideradas para la siguiente etapa del trabajo.

# Anexo 3 Procesado de imágenes TEM

En la Figura A.3.1 se muestra el procesado de la micrografía 4.5.2.c para hallar las áreas de las células que aparecen en el corte de la muestra a las 0 h a 20000X. Se realizó el mismo procesamiento para hallar las áreas de las células a todos los tiempos observados en las micrografías a 20000X



Figura A.3.1

De modo similar se procedió para calcular el área de los gránulos. En la Figura A.3.2 se muestra el procesado de la micrografía 4.5.2.c para determinar el área de los gránulos de PHB a tiempo 0 h. Se realizó el mismo procesamiento para hallar las áreas de los gránulos de PHB a todos los tiempos observados en las micrografías a 20000X.



Figura A.3.2

# Anexo 4 Procedimiento de tratamiento térmico de melaza cruda

Se prepara una solución de melaza 20 g/l con agua desionizada. Se centrifuga la solución durante 20 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se mantiene durante 5 h a 40 °C con una agitación constante de 200 rpm. Luego se centrifuga y el sobrenadante obtenido después del siguiente paso de centrifugación se considera como melaza tratada térmicamente.
## Anexo 5 Solución de Yerba mate

La solución de yerba mate se preparó con 10 g de yerba mate comercial y 100 ml de agua deshionizada calentada 2 minutos en microondas. Se dejó reposar 2 h y luego se filtró con papel de filtro Watman n° 2.

# Anexo 6 RMN de los biopolímeros sintetizados con fuentes de carbono alternativas por *C. necator* ATCC 17697



Figura A.6.1: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHB sintetizado por *C. necator* en glicerol residual.





Figura A.6.3: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHB sintetizado por *C. necator* en melaza y SYM.



Figura A.6.4: Espectro RMN-<sup>13</sup>C de PHB sintetizado por *C. necator* en melaza y SYM.



Figura A.6.5: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHB sintetizado por *C. necator* en ác. mirístico.



Figura A.6.6: Espectro RMN-<sup>13</sup>C de PHB sintetizado por *C. necator* en ác. mirístico.



Figura A.6.7: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHB sintetizado por *C. necator* en ác. esteárico.



Figura 4.6.8: Espectro RMN-<sup>13</sup>C de PHB sintetizado por *C. necator* en ác. esteárico.



Figura A.6.9: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PHB sintetizado por *C. necator* en ác. palmítico.



Figura A.6.10: Espectro RMN-<sup>13</sup>C de PHB sintetizado por *C. necator* en ác. palmítico.

## Presentaciones a Congresos surgidas del trabajo de tesis

XVI Jornadas Argentinas de Microbiología - III Congreso Bioquímico del Litoral

### Lugar y fecha: Rosario, Santa Fe. Agosto de 2015



#### XI Congreso Argentino de Microbiología General

#### Lugar y fecha: Córdoba, Córdoba. Agosto de 2015



#### FACTORIAL DESIGN IN OPTIMIZATION OF PHB PRODUCTION



#### O. Yashchuk , D. Nygaard , E. Hermida

ECyT, UNSAM, Campus Miguelete, 1650, San Martín, Argentina; CONICET; oyashchuk@unsam.edu.ar

Poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) is a natural, biodegradable polymer that a large number of bacteria accumulate as an energy reserve. They are produced when the carbon source is in excess while nutrients such as nitrogen or phosphorous are available in limited. In terms of morphological and mechanical properties, the PHB homopolymer is comparable to some of the more common petrochemical thermoplastics. However, the high price of commercial grade PHB limits its use to specialist niches. Spreading the use of PHB requires reduction in the production costs by improving fermentation strategies, using low-cost media, and applying easier downstream recovery methods. This contribution presents an experimental design-based developed to optimize the medium for the production of PHB by Cupriavidus necator. American Type Culture Collection 17697, in 500-ml shake flasks (30 1°C, 200 rpm). The experimental design proposes an efficient way to obtain optimization of a process or product with a minimum number of experiments. The medium optimization is based on three stages of experimentation: screening, optimization and verification. Screening enabled to determine the relevance of five experiments. The medium optimization is based on three stages of experimentation: screening, optimization and verifications. Screening enabled and enables and the relevance of five experimentations of the productions of the production screening enabled and the mine screen further endevance. to determine the relevance of five experimental conditions: concentration of the carbon source, concentration of the nitrogen source, culture pH, ionic strength and agitation to determine the relevance of five experimental conditions: concentration of the carbon source, concentration of the nitrogen source, culture pH, ionic strength and agriation intensity. A two-level fractional factorial design (5 factors, 16 combinations) was employed. Optimization experiments allowed to provide in-depth information about the factors with higher impact on performance during screening. Finally, verification experiments were used to validate the results under specific experimental conditions. Biomass content was evaluated by gravimetry and turbidimetric measurements. Fructose and Ammonium concentration in the supernatant was determined by colorimetric methods. Crotonic acid formed from PHB during acid digestion was detected by absorbance at 234 nm. Among the main results it is observed that the yield of PHB strongly depends on the culture growth and that its degradation begins at the onset of the stationary phase. Hence, timing the harvest is essential to prevent a loss of the produced PHB. When using ammonium sulfate and fructose, the optimal C/N ratio was 23,5 which allowed a PHB concentration of 2,84g/l. The sensitivity of the biomass and PHB yields to changes in C/N depends on the nitrogen source used. The characteristics of the optimal culture were: maximum specific fructose consumption rate of 0,49 g/h, a maximum specific FPHB enduction for experimental coefficient of 0,61 and the cell widel coefficient for functose of 0.84 maximum specific PHB production rate of 0,048 g/lh; a maximum product yield coefficient of 0,51 and the cell yield coefficient for fructose of 0,38.

Niveles Factor Unidad 20 25 15 С g/l 1,5 2,25 3 N g/l 7,5 pН 6.5 FI a/l 4 8 12 m ml/I 3 1

Tabla 1. Niveles elegidos para los cinco factores En este trabajo se utilizó un diseño factorial fraccionado (FFD) de cinco factores en En este trabajo se utilizió en las consistina de la composición del medio de cultore en la producción de PHB (Tabla 1). Se evaluó el efecto de: concentración de fuente de carbono (C), concentración de la fuente de nitrógeno (N), concentración de microelementos (m), pH inicial y fuerza iónica (FI) del medio. Se construyó una matriz donde se añadió el punto central por triplicado para chequear la reproductibilidad del sistema (Tabla 2). El diseño fraccionario elegido fue de resolución V (RV).

**Tabla 3.** Resultados de la fermentación de 72hs: pH final del medio, fructosa consumida (C), biomasa (X), producción de PHB y rendimientos del proceso ( $Y_{
m pkc}$  de biomasa en producto;  $Y_{
m pkc}$  de sustrato en producto,  $Y_{
m skc}$  de sustrato en producto,  $Y_{
m skc}$ 

Exp. N°	pH final	с	X	PHB	$\mathbf{Y}_{\mathbf{p}/\mathbf{x}}$	Y <sub>p/s</sub>	Y <sub>x/s</sub>
		g/l	g/l	g/l	g <sub>p</sub> /g <sub>x</sub>	gp/gs	g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub>
1	4,14	7,08	2,22	1,03	0,46	0,15	0,31
2	6,15	13,97	3,83	2,70	0,71	0,19	0,27
3	6,37	13,53	5,24	2,86	0,55	0,21	0,39
4	7,03	11,80	4,80	2,54	0,53	0,22	0,41
5	4,30	7,17	2,21	0,96	0,44	0,13	0,31
6	5,30	14,15	4,64	1,00	0,22	0,07	0,33
7	4,61	13,83	5,64	2,14	0,38	0,16	0,41
8	6,59	13,40	4,84	0,28	0,06	0,02	0,36
9	4,22	6,92	2,44	1,04	0,43	0,15	0,35
10	6,06	13,46	4,88	2,89	0,59	0,22	0,36
11	6,25	16,93	6,36	4,12	0,65	0,24	0,38
12	6,97	15,32	5,40	3,12	0,58	0,20	0,35
13	4,21	7,58	2,06	0,92	0,45	0,12	0,27
14	5,71	12,44	4,21	1,32	0,31	0,11	0,34
15	4,28	15,46	4,92	2,46	0,50	0,16	0,32
16	6,55	18,72	7,57	3,31	0,44	0,18	0,40
0	6,26	18,02	6,64	4,38	0,66	0,24	0,37

El medio de cultivo óptimo para que el proceso sea productivo debe combinar isfactoriamente la producción de biom

celular con un alto contenido de PHB

Л El consumo de fructosa y fuente de nitrógeno

están relacionados con el crecimiento bacteriano y la posterior acumulación de PHB.

Û

La concentración de N en el medio de cultivo debe ser optima: sin limitar el crecimiento celular durante la fase exponencial de

crecimiento y a su vez limitante en la fase estacionaria donde se acumula la mayor cantidad de PHB.

N٥	С	N	рН	FI	m
	g/l	g/l		g/l	ml/l
1	15	1,5	6,5	4	3
2	15	1,5	6,5	12	1
3	15	1,5	7,5	4	1
4	15	1,5	7,5	12	3
5	15	3	6,5	4	1
6	15	3	6,5	12	3
7	15	3	7,5	4	3
8	15	3	7,5	12	1
9	25	1,5	6,5	4	1
10	25	1,5	6,5	12	3
11	25	1,5	7,5	4	3
12	25	1,5	7,5	12	1
13	25	3	6,5	4	3
14	25	3	6,5	12	1
15	25	3	7,5	4	1
16	25	3	7,5	12	3
17	20	2,25	7	8	2
18	20	2,25	7	8	2
19	20	2,25	7	8	2
The second	1		an an	1	e

Tabla 2. Matriz de diseño

Exp

Se calcularon los efectos de los factores principales y de las interacciones de segundo orden sobre ensayos de un sistema de 6 variables con la producción de PHB como respuesta. La relevancia de los factores del sistema estudiado se hizo mediante la prueba de normalidad o "Ranquit" (Figura 1)

Figura 1. Rankit de la Muestra vs Distribución No.



El factor de mayor relevancia resultó ser el nitrógeno con nivel negativo, lo que indica que a mayor concentración de nitrógeno, menor contenido de PHB . En segundo orden de relevancia se ecuentra la asociación negativa de pH-FI y en tercer lugar se encuentra el pH con nivel positivo. El resto de los factores y asociaciones no se alejan demasiado de la prueba (recta) de normalidad, por lo que no resultan significativos

Con la matriz de diseño y la producción de PHB como respuesta, se calculó un modelo de regresión lineal para los factores principales y las asociaciones de segundo orden y no ajusta correctamente. Lo mismo se hizo con la producción de biomasa como respuesta pero tampoco ajusta a un sistema lineal. El centro del sistema es el de mayor respuesta, esto indica que hay una curvatura muy fuerte, es por eso que un modelo lineal no es apropiado para describir este sistema. Para trazar un modelo cuadrático se necesita completar el modelo con la otra mitad del diseño para tener suficiente cantidad de experimentos.

#### Agradecimientos

Al **Dr. Jorge Magallanes** por su colaboración para planificar y analizar el diseño experimental y al Instituto de Investigación e Ingeniería al Instituto de Inves Ambiental **3IA** (UNSAM).

≻Se observa consumo de fructosa en todos l experimentos, sin llegar al consumo total.

#### Exp. Nº: 1, 5, 9 y 13

Los valores de producción de biomasa consumo de fructosa son bajos: 2,06 - 2,44 g/l 6,92 - 7,58 g/l, respectivamente. El pH del medio disminuyó abruptamente has llegar a valor 4, aproximadamente, lo que inhib ol crecimiento bacteriano. Esto es consecuenc de los bajos valores de FI (4 mg/l) y pH (6, iniciales, es decir, el bajo poder amortiguador d

≻Esto conduce a una baja producción de PH entre 0,92 y 1,04 g/l.

#### EXD. Nº 16

El consumo de fructosa y producción de biomasa fueron máximos: 18,72 g/l y 7,57 g/ respectivamente, lo que esta relacionado con e pH óptimo inicial, la alta FI y el alto nivel de N y

>Se observan condiciones optimas para el crecimiento bacteriano, pero no son optimas para la generación del producto: el contenido de para la generación del producto, del producto, el produc

Exp. № 0 y 11 >El contenido de PHB es máximo en el punto central del diseño Exp. № 0 (4,38 g/l) y en el Exp. Nº11 (4,12 g/l), generando a su vez máximos rendimientos del proceso (0,66 g/g y 0,65 g/g, respectivamente). observa un buen crecimiento bacteriano

alrededor de 6,5 g/l. ➢El pH inicial es de 7 y 7,5, y no se observa una caída brusca del mismo durante la fermentación.

El sistema regulador de pH tiene máxima capacidad

Las concentraciones de la fuente de C y N son óptimas, entre 20-25 g/l y 1,5 - 2,25 g/l, respectivamente

## XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología- XIV Congreso Argentino de Microbiología 2016

#### Lugar y fecha: Rosario, Santa Fe. Septiembre de 2016

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA PRODUCCIÓN CONICET UNSAM DE POLIHIDROXIBUTIRATO MEDIANTE DISEÑO DE EXPERIMENTOS NYGAARD D., YASHCHUK O. Y HERMIDA E. LAB3BIO, ECYT, UNSAM; CONICET; dnygaard@unsam.edu.ar INTRODUCCIÓN Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son materiales poliméricos biodegradables que se acumulan en numerosas bacterias en forma intracelular, en condiciones de fuente de carbono en exceso y otros nutrientes, como N, P y O en forma limitante en el medio de cultivo. La bacteria más ampliamente estudiada para la producción de PHAs, es *Cupriavidus necator* debido a su capacidad para acumular grandes cantidades de este biopolímero en medio de cultivo simple. El polihidroxibutirato (PHB) es el tipo más común de PHA, que ha cobrado gran importancia en el campo de la industria por sus propiedades físico-químicas. Si bien ha sido considerado como posible sustituto de los plásticos de origen petroquímico, su alto costo de producción lo hace poco competitivo. Por ello, se han diseñado diferentes estrategias para disminuir el costo final del polímero; una de ellas comprende el diseño y la optimización de la composición del medio de cultivo. MATERIALES Y MÉTODOS Microorganismo: Cupriavidus necator ATCC 17697; Edad y volumen de inóculo: 24hs, 5 % Medio de cultivo: medio basal con fructosa como única fuente de carbono. Condiciones experimentales: Erlenmeyer de 250 ml con 60 ml de medio de cultivo; 30 °C, 150 r.p.m , 72 hs. La acumulación cuantitativa de PHB se realizó midiendo la absorbancia a 235 nm del ácido crotónico formado por la deshidratación del PHB con ácido sulfúrico concentrado. La biomasa se midió con la técnica gravimétrica RESULTADOS Figura 1: Superficie de respuesta de PHB para el diseño de optimización Crecimiento bacteriano y producción de PHB en el cultivo inicial cinco variables en tres niveles. (Variables fijas: C=20g/l, N=1,5g/l, Los cultivos iniciales de *C. necator* se realizaron usando el medio de cultivo no optimizado. La biomasa máxima obtenida fue 2,54 g/l con un contenido de PHB del 36 %. P=8,75 g/l y m=2 ml/l) a) h 
 FFD y Metodologia de Superficie de Respuesta

 Tabla 1: Variables y niveles del FFD

 Factor Unidad
 0

 +
 medio de cultivo se evaluó mediante un "Full Factorial Desien"
 medio de cultivo se evaluó mediante un "Full Factorial Design" g/l 15 20 25 g/l 1,5 2,25 3 (FFD) de tres niveles, cuyas las variables fueron: fructosa (C), Ν sulfato de amonio (N), pH, buffers fosfatos (P) basado en la suma 
 g/l
 1,3
 2,23
 3

 6,5
 7
 7,5

 g/l
 4
 8
 12

 ml/l
 1
 2
 3
 pH de iguales concentraciones de los buffers fosfato Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y solución de microelementos (m). (Tabla 1) m Tabla 2: Coeficientes calculados en el FFD De este modo se obtuvieron los coeficientes F p-value 45.05 < 0.0001 Factor Estimate F significativos (Tabla 2) con el que se construyó la Interc. 4.07 superficie de respuesta. Este modelo resultó ser < 0.0001 N -1.62 32.13 adecuado con un nivel de confianza del 95% según P 0.98 16.10 0.0001 ANOVA y R2 = 0,824. pH P-pH 1.54 29.03 < 0.0001 -0.36 30.31 < 0.0001 Se predijo un punto de producción máxima de PHB (Figura 1). Los valores reales para las variables independientes C<sup>2</sup> -1.19 38.30 < 0.0001 que corresponden a dicho punto fueron: C=20 g/l, N=1,5 g/l, P=8,75 g/l, pH=7,5 y m=2 ml/l. En tales condiciones, P<sup>2</sup> -0.93 23.47 < 0.0001 el modelo predice una respuesta máxima de PHB: 7,26 + 0,41 g/l. C-N-P 0.29 19.64 < 0.0001 18.43 < 0.0001 N-P-pH 0.28 Para validar el modelo se llevaron a cabocultivos en frascos agitados en condiciones optimizadas, obteniéndose una 1.12 0.0003 C<sup>2</sup>N 14.67 concentración de PHB de 7,05 + 0,3 g/l. C<sup>2</sup>P -0.79 9.70 0.0026

La correlación entre la respuesta predicha y la respuesta experimental evidenció la adecuación del modelo elegido.

Para el punto de máxima producción de PHB el rendimiento de producto a partir de sustrato, Yp/s, es de 0,375 g/g, el de biomasa a partir de sustrato, Yx/s, es de 0,40 g/g y el rendimiento de producto a partir de biomasa Yp/x resultó en 0,89 g/g. Con una productividad de 0,098 g/l/h. El pH final fue de 6,9. Este resultado evidencia que el medio de cultivo tiene la capacidad de regular el pH. De este modo las células crecen en un pH óptimo durante todo el proceso fermentativo, mejorando los rendimientos del mismo, tal como se comprobó experimentalmente.

10.12 0.0022

FFD de dos variables

Las variables N y pH resultaron óptimas en el borde del modelo, pudiendo entonces, obtener mayores valores de PHB, fuera del rango de trabajo. Por lo tonto, se planteó un FFD de tres niveles con estas dos variables N (0.75, 1.5 y 2.25 g/l) y pH (7, 7,5 y 8). El valor central de dichas variables fueron los valores máximos obtenidos en el primer FFD. Las demás variables fueron fijadas en los valores ya optimizados (C=20 g/l, P=8,75 g/l y m=2 ml/l). Los resultados experimentales revelaron que el máximo rendimiento se da en el valor central. De este modo quedo comprobado que los valores optimizados son realmente los mejores anu saliendo del rango de trabajo de las variables cuyos máximos quedaron en el borde del diseño.

#### DISCUSIÓN

C<sup>2</sup>pH -0.93

En este trabajo de optimización se logró transformar 90 % de la biomasa en producto, coincidiendo con los valores experimentales ya reportados en bibliografía (1, 2). A su vez, la producción de PHB máxima obtenida de 7.05 g/l, coincidió con los máximos valores experimentales reportados en trabajos de optimización en frascos agitados para la bacteria estudiada (1). Sin embargo, en el trabajo citado, se llegó a similares concentraciones de PHB partiendo con 35 g/l de fructosa. En el presente trabajo se logró la misma concentración de PHB con 20 g/l de fructosa, produciendo un mejor rendimiento de producto a partir de sustrato, Yp/s. Por lo tanto, el medio de cultivo optimizado, tiene las concentraciones necesarias de los componentes del medio de cultivo, para maximizar los rendimientos. Se concluyó que el diseño FFD se puede aplicar tanto como método de búsqueda de factores significativos, como método de optimización, mediante el acoplamiento de RSM.

#### BIBLIOGRAFÍA

 Aramvash A, Akbari Shahabi Z, Dashti Aghjeh S, Ghafari MD. Statistical, physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by Cupriavidus necator, Int. J. Euvinon. Sci. Technol. 2015, 12:2307–2316.
 Kim B, Lee S, Lee S, Chang H, Chang Y Y Seong W. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed- batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control.

2) Kim B, Lee S, Lee S, Chang H, Chang Y y Seong W. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed- batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control. Biotechnology and Bioengineering. 1994; 43(9): 892-898. VII Jornadas Argentinas de Microbiología (JAM 2017) y Jornadas Bioquímicas del Sur Argentino (JBS2017).

Lugar y fecha: Bahía Blanca, Bs. As.. Junio de 2017



El escalado del proceso de producción de FHB en biorreactor agitado permitió aumentar más del 50 % la concentración de biopolímero y duplicar la productividad del proceso.

## XII SIMPOSIO ARGENTINO DE POLÍMEROS

### Lugar y fecha: Los Cocos, Córdoba. Octubre de 2017



XII Simposio Argentino de Polímeros - SAP 2017 18 al 20 de octubre de 2017 – Los Cocos, Córdoba, Argentina



#### BIOSÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

O Yashchuk (1)\*, D Nygaard (1), B Araoz (1), I Ruiz (1), A González Wusener (2) y E Hermida (1)



opinación en napositivo sobritación e El método de extracción y purificación mediante solventes orgánicos demostró ser efectivo dada la citotoxicidad nula del polímero y óptimas propiedades mecánicas de las membranas reabsorbibles.

• El polímero obtenido fue esencialmente polihidroxibutirato (PHB) con un 0,7 % de hidroxivalerato (HV) sólo con fructosa como fuente de carbono.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el subsidio PIP 083 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y el EMPRETECNO 0037/2012 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental y I Jornada de Microbiología General

Lugar y fecha: Mar del Plata, Bs. As.. Abril de 2018



IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental y I Jornada de Microbiología General

Lugar y fecha: Mar del Plata, Bs. As.. Abril de 2018

#### CONICET Influencia de las condiciones de crecimiento y fuentes de carbono sobre la producción de UNSAM polihidroxialcanoatos con Bacillus cereus NACIONAL DE SAN MARTÍN Yashchuk Oxana, Nygaard Daiana, Hermida Elida Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de General San Martín, Buenos Aires, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; Introducción Entre varios polimeros biodegradables se encuentran polimeros alifáticos de la familia de polihidroxialcanoatos (PHAs). Se producen naturalmente vía fermentación bacteriana bajo las condiciones de limitación de nutrientes y exceso de carbono en el medio de cultivo. El amplio uso de los PHAs está limitado debido su alto costo de producción comercial en comparación con los polímeros petroquímicos. Por lo tanto, se han desarrollado diferentes estrategias para disminuir el costo final del polímero, como el diseño y la optimización de la composición del medio de cultivo y el uso de los desechos agroindustriales como sustratos de carbono renovables y económicos. El objetivo de trabajo es diseñar un medio de cultivo y evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbono de grado analítico y residual en la producción de PHAs con la cepa Bacillus cereus **Materiales y Métodos** Los experimentos se realizaron en la escala de erlenmeyers de 500 ml con 100 ml del medio mineral. Se probaron diferentes condiciones de la incubac Micrografias TEM de aránulos intracclulares agitación 150-200 rpm, el temperatura 28-37°C y la cantidad del inoculo 1-3% > Como sustrato de carbono se utilizó: glucosa, sacarosa, fructosa, glicerol puro, Medio de cultivo para producción de PHAs gránulos intracclulares de PHA acumulados en 10-25 g/l 0.5-2,5 g/l F/Carbono Cono sustato de catobio se duntos gatosas sacarosa, naciosas gaterol parto, almidón soluble y de nitrógeno: sulfato de amonio, urea, acetato de amonio, cloruro de amonio en distintas concentraciones Se evaluó la capacidad de la cepa utilizar los residuos agroindustriales como F/Nitrógeno Extracto de levadura Sn de microelementos KH2PO4 K2HPO4 1-5 g/l 1-5 ml/l melaza, aceite de cocina usado, jugo de yerba mate, suero de leche. > Se monitoreó el proceso mediante la cuantificación de pH, biomasa y acumulación de biopolímero empleando técnica de gravimétria y de espectrofotometría ultravioleta (234nm), respectivamente. 2,5 g/l 3 g/l 6,5-7,5 pH Resultados Perfil típico de crecimiento de B.cereus y lación de PHA Cambio de pH Velocidad de agitación Temperatura de incubación H (1/6) PHA 16 6.5 7.5 150 m Biomasa PHA 28 % 32 % Tiempo n (hs) Concentración de extracto de levaduro Se seleccionó e tiempo de incubación 48 hs como Concentración de inóculo crecimiento y la acumulación del óptimo para polímero Se determ el efecto negativo de la fase de esporulación de *B.cereus* sobre la etapa de acumulación del polímero PHA Rendimiento Biomasa sec 1,5% Fuente de arbo (g/l) $\left(\frac{g}{l}\right)$ (%) Control $0.73 \pm 0.07$ $0.001 \pm 0.00$ 0.1 Concentración de la solución de Control 1 g/l 2 g/l 3 g/l 4 g/l 5 g/l $3.53 \pm 0.00$ Glucosa $0.83 \pm 0.01$ 23,4 3,60 ± 0,13 1,08 ± 0,09 29,9 Sacaro ≻ La presencia de levadura en el medio de cultivo era indispensable para crecimiento bacteriano. 7,17 ± 0,10 2,41 ± 0,15 33,6 Indispensadie para crecimiento bacceriano. Se determinó la composición final del medio de cultivo productivo de sales minerales, fructosa 20g/l, levadura 3 g/l, sulfato de amonio 2g/l, solución de microelementos 1 ml/l, pH 7.0 con el inoculo de 8 hs en la concentración de 3%. Se establecieron óptimas condiciones de incubación 32°C, 150 rpm y 48 hs. 7,80 ± 0,00 4.21 ± 0.23 54,0 Fruct 6,80 ±0,13 3,10 ±0,03 45,6 Glicerol pur 1 ml 2,5 ml 5 ml 5,33 ± 0,00 2,57 ± 0,00 48,3 de yerba mate 1,10 ± 0,03 0,03 ± 0,00 2,5 Tipo de fuente de nitrós 1,37 ± 0,10 0,01 ± 0,00 e de coci 1,0 Concentración de sulfato de 1,77 ± 0,03 0,22 ± 0,02 12,1 sustratos de grado máximo rendimiento Concentración de fructos se servó con fructosa y 45,6%, gli 54.0% У De los residuos probados se destavol la melaza como mejor sustrato de carbono para producción de PHAs con el rendimiento de 48,3% de PHA a partir de peso seco bacteriano en > De Se obtuvo la biomasa de 8,07±0,2 g/l con el máximo contenido de PHA y rendimiento mparación con los otros los donde este en co del producto a partir del peso seco celular de 5,21±0,15 g/l y 64,6%, respectivamente. 10 g/l 20 g/l 25 g/l resid era por debajo de rendi 10%

### 5° Congreso Argentino de Microscopía SAMIC

#### Lugar y fecha: La Falda, Córdoba. Mayo de 2018



Gram (-). Gram (-). Grécnica TEM contribuye a la determinación de la morfología de los gránulos del biopolímero y permite cuantificar el volumen acumulado, indispensable para la evaluación de la productividad del proceso de producción

### Simposio Argentino de Bioprocesos

Lugar y fecha: San Miguel de Tucumán, Tucumán. Agosto de 2018

Trabajo seleccionado para presentación oral y poster



La fermentación de la bacteria C. necator ATCC 17697 en biorreactor agitado mediante un proceso que incluyó una etapa batch y dos etapas fed-batch resultó efectiva para la producción del biopolímero PHB, alcanzando el doble de concentración de PHB y un aumento notable de su productividad volumétrica, respecto a fermentaciones batch.

#### <u>Bibliografía</u>

Control Contro

5th Euro BioMAT 2019 - European Symposium and Exhibition on Biomaterials and Related Areas.

Lugar y Fecha: Weimar, Alemania. Mayo de 2019

Fecha de aceptación del resumen: 6/3/2019

## Improvements in PHB production by wild type Cupriavidus necator using different feeding strategies.

Nygaard D, Yashchuk O, Noseda D and Hermida E

Polyhydroxyalkanoates (PHA), of which polyhydroxybutyrate (PHB) is the most abundant, are polymers of bacterial origin used for various applications in the medical, industrial and agricultural fields. In this work, we report, the medium optimization study in shaken flasks and large-scale production in stirred-tank bioreactor of PHB by wild type Cupriavidus necator. Variation in fermentation conditions has been explored to increase the yield of PHB.

In order to address the selection of the main factors and optimize the culture medium, an experiment was designed based on the coupled response surface methodology, with a complete factorial design. A maximum PHB production of 4,6 g/l and biomass production of 6,5 g/l was obtained under optimized conditions. Polymer production was then scaled up to 6 I batch fermentation, where a significantly higher biomass of 15 g/l with a content of 9,85 g/l of PHB and a productivity of 0,13 g/(l.h) was obtained. Afterwards fed-batch strategy was performed applying a three-stage procedure. The first stage consisted of a batch culture to allow cell growth. In the second phase a fed-batch culture was carried out by feeding with fructose (600 g/L), which was regulated according to the concentration of dissolved oxygen in the culture, with a 70% cut-off. In these two stages the NH4OH served to regulate the pH and also allowed avoiding nitrogen limitation. The third stage consisted of a fed-batch culture with nitrogen limitation; the fructose feed was regulated according to the dissolved oxygen with 30-20% cut-off and the base was replaced by NaOH. The maximum biomass production was 35 g/l with a PHB content of 17,5 g/l. Finally a fed batch process operated with an exponential feeding strategy in the second phase led to a maximum biomass production of 52,1 g/l with a PHB content of 27 g/l and a volumetric productivity of 0,40 g/(l.h).

## Publicación surgida del trabajo de tesis

Daiana Nygaard<sup>a,b,\*</sup>; Oxana Yashchuk<sup>a,b</sup>; Élida B Hermida<sup>a,b</sup>.

## Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: Application of the response surface methodology

 <sup>a</sup> UNSAM - National University of San Martín. Av. 25 de mayo 1147 (B1650HMK), San Martín, Buenos Aires, Argentina - Tel: +54 11 2033 1400.
 <sup>b</sup> CONICET- Argentine Council of Scientific and Technical Research. Godoy Cruz 2290 (C1425FQB) CABA - República Argentina - Tel: +5411 4899-5400.
 \*Corresponding author at: Av. 25 de mayo 1147 (B1650HMK), San Martín, Buenos Aires, Argentina. Email address: dnygaard@unsam.edu.ar (D. Nygaard)

https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01374

#### Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA), of which polyhydroxybutyrate (PHB) is the most abundant, are polymers of bacterial origin used for various applications in the medical, industrial and agricultural fields. In the present study we worked on the selection, evaluation and improvement of the significant variables of the medium for the production of PHB by Cupriavidus necator ATCC 17697. In order to address the selection of the main factors and optimize the culture medium, a complete factorial experimental design based on the coupled response surface methodology, was presented. The model with the best adjustment of the variables turned out to be quadratic in fructose (C), linear in ammonium sulphate (N) and pH, with interaction in pH and phosphate solution (P), where the pH was the most significant (p<0.0001) while the microelements solution could be neglected. Thus, optimum carbon concentration, adequate nitrogen limitation and interaction between initial pH and phosphate solution concentration are important factors to ensure a high production of PHB. The optimal values of the selected variables were C=20 g/l, N=1.5 g/l, P=8.75 g/l and pH 7.5. A maximum PHB production of 4.6 g/l, obtained under these conditions, increased almost 2.5 times. The polymer accumulated in the cytoplasm of C. necator ATCC 17697 in the form of granules showed an FTIR spectrum corresponding to that of commercial PHB.

#### Fecha de aceptación: 13/03/2019.

## Abstract

Native *Cupriavidus necator* is a useful and powerful tool for the biotechnological production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHAs are polymers with an increasing commercialization, due to the excellent combination of their attributes: thermoplastic, biodegradable and biocompatible.

In this work we studied the accumulation of PHAs from the native strain *C. necator* ATCC 17697 in order to generate PHAs at a laboratory scale and establish the parameters of the process that allow productive scaling. The culture medium was optimized with fructose as the sole carbon source for the production of PHA in *Erlenmeyer*. The production process was scaled and optimized in a 7 I bioreactor. Different fermentation strategies and culture media were analyzed in *batch* mode and different feeding strategies in *fedbatch* mode. The kinetics and morphology of PHA granule formation in different media and at different fermentation times were studied. In addition, a physicochemical characterization of the polymers produced was carried out and membranes were made to evaluate their possible use as biomedical material. Finally, alternative carbon sources were evaluated for the production of PHAs by the bacteria.

During the optimization of the culture medium in Erlenmeyer it was possible to increase the production of PHB by 2.5 times, compared to the initial experiments. By scaling and optimizing the bioreactor process, the production of PHA increased 5 times more, finally achieving 27 g/l of PHA in the fermenter, with a maximum volumetric productivity of 0.43 g/(l.h). Cell sizes and morphologies of *C. necator* ATCC 17697 were determined in the different productive stages, highlighting the variation in the quantity and size of accumulated PHA granules. The PHA produced, extracted, purified and characterized was useful for the production of membranes that were not cytotoxic and whose mechanical properties were comparable with those of biomedical membranes developed by our team. These results encourage to consider the biomaterial produced in this thesis for biomedical applications. Of the industrial waste used as alternative carbon sources for the production of PHAs by *C. necator* ATCC 17697, residual glycerol and sugarcane molasses proved to be more promising.

**Keywords:** *Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoate, optimization, scaling, residual carbon sources.

## Resumen

*Cupriavidus necator* nativa resulta una herramienta útil y poderosa para la producción biotecnológica de Polihidroxialcanoatos (PHAs), Los PHAs son polímeros con una ascendente comercialización, debida a la excelente combinación de sus atributos: termomoldeables, biodegradables y biocompatibles.

En este trabajo se estudió la acumulación de polihidroxibutirato (PHB) – uno de los miembros de la familia de PHAs – a partir de la cepa nativa C. necator ATCC 17697 con el fin de generar PHAs a escala de laboratorio y establecer los parámetros del proceso que permitan el escalado productivo. Se optimizó el medio de cultivo con fructosa como única fuente de carbono para la producción de PHB en Erlenmeyer. Se realizó el escalado y optimización del proceso productivo en fermentador de 7 l. Se analizaron diferentes estrategias de fermentación y medios de cultivo en modo *batch* y diferentes estrategias de alimentación en modo *fedbatch.* Se estudió la cinética y morfología de la formación de los gránulos de PHB en diferentes medios y a diferentes tiempos de fermentación. Además, se realizó una caracterización físico-química de los polímeros producidos y se elaboraron membranas para evaluar su posible uso como material biomédico. Finalmente, se evaluaron fuentes de carbono alternativas para la producción de PHAs por la bacteria.

Durante la optimización del medio de cultivo en Erlenmeyer se logró aumentar 2,5 veces la producción de PHB, respecto de los experimentos iniciales. Al escalar y optimizar el proceso en biorreactor, la producción de PHB aumento 5 veces más, logrando finalmente 27 g/l de PHB en el fermentador, con una productividad volumétrica máxima de 0,43 g/(l.h). Se determinaron tamaños y morfologías celulares de *C. necator* ATCC 17697 en las distintas etapas productivas, destacándose la variación en la cantidad y el tamaño de los gránulos de PHB acumulados. El PHB producido, extraído, purificado y caracterizado resultó útil para la producción de membranas que resultaron no citotóxicas y cuyas propiedades mecánicas fueron comparables con las de membranas de uso biomédico desarrolladas por nuestro equipo de trabajo. Estos resultados alientan a considerar al biomaterial producido en esta tesis para aplicaciones biomédicas. De los residuos industriales empleados como fuentes de carbono alternativas para la producción de PHB por *C. necator* ATCC 17697, glicerol residual y melaza de caña de azúcar resultaron ser más prometedoras.

**Palabras clave:** *Cupriavidus necator*, polihidroxibutirato, optimización, escalado, fuentes de carbono residuales.