

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAISO –CHILE



“PRODUCCION DE PHB EN *AZOTOBACTER VINELANDII* OP,
UTILIZANDO ORUJO DE UVA COMO FUENTE DE CARBONO
A DISTINTAS RAZONES CARBONO/NITRÓGENO”

YANARA ANDREA NÚÑEZ ARAVENA

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PROFESORA GUIA: DRA. ALEJANDRA URTUBIA

PROFESOR CORREFERENTE: DR. ÁLVARO DÍAZ

Marzo 2019, Valparaíso

Agradecimientos:

Gracias a cada persona que acompaña y acompañó mi camino, aunque a veces pareciera no ser tan significativa, la verdad, es que todos y todas afectamos casi sin querer el total del espacio que nos rodea. Y cada logro y cada fracaso, cada historia contada, vivida y escuchada, entregan un aporte, que sumado a un todo, hacen del presente un gran regalo y un buen pasar.

Gracias a todas y todos los que de alguna u otra forma formaron parte de este proceso. A mis amigos y amigas, mi familia de la vida, gracias por darle una chispa especial a todos mis días, de locura, juventud y de amor. Por el apañe, la sabiduría del convivir y todo lo aprendido junto a ustedes, muchas gracias.

A mi familia, que son mi fuente inagotable de cariño, comprensión y contención, gracias infinitas por todo lo enseñado y vivido. En especial a mi abuela y abuelo, mi mamá y mis dos hermanos, les amo.

A mis maravillosas compañeras del espacio de trabajo, por llenar con su alegría y fraternidad. A él compañero de laboratorio especiales gracias por la paciencia y las ganas de enseñar. Compartir la ciencia con tantas personas bellas me llenó y maravilló todos estos meses.

Especiales gracias a mis profesores también, por la entrega y la buena voluntad. Por apoyar la realización de esta investigación. Gracias por confiar en mí y hacerme parte de este interesante mundo que es la ciencia y la investigación. Por ayudarme a aportar mi grano de arena, para crear un mejor lugar para vivir en conjunto, seres humanos y naturaleza.

Resumen:

En el presente documento, se expone la investigación realizada sobre la influencia de la razón Carbono/Nitrógeno, sobre la producción de Polihidroxibutirato (PHB), un poliéster intracelular biodegradable y biocompatible, el cual puede ser utilizado como reemplazo de los plásticos obtenidos de la industria petroquímica. *Azotobacter vinelandii* OP es una bacteria productora de este bioplástico, la cual puede almacenar grandes cantidades de este mismo, haciéndola objeto de diversos estudios e investigaciones al respecto.

Para la producción de PHB en *Azotobacter Vinelandii* OP, se utilizó orujo de uva como sustrato, de la cepa Chardonnay. Este compuesto corresponde a un residuo de la industria del vino. Además, se utilizó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, con el fin de variar la razón inicial Carbono/Nitrógeno en el medio de cultivo. En primera instancia se evaluó la producción de PHB a nivel de matraces, a 200 rpm y 30 °C, utilizando orujo de uva sin agregar nitrógeno externo, a una razón Carbono/Nitrógeno de 190 [g_C/g_N].

Posteriormente se realizaron cultivos en un biorreactor con un volumen de trabajo de 2,7 [L], a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Acá, se evaluaron tres distintas razones C/N: 190, 9 y 7. Los principales resultados obtenidos en estas condiciones fue que la población celular, tuvo su mayor rendimiento con respecto al sustrato, cuando la razón C/N fue de 7, con un valor de $Y_{x/s}$: 0,423 [$g_{biomasa}/g_{sustrato}$]. Además, el rendimiento de PHB también fue mayor en este caso, alcanzando un valor de $Y_{PHB/s}$: 0,236 [$g_{PHB}/g_{sustrato}$]. Solamente la acumulación máxima de PHB obtenida disminuyó, con respecto a los parámetros obtenidos en el cultivo de razón C/N 9, donde en éste último, se obtuvo una acumulación máxima del 72%. Sin embargo, realizando intervalos de confianza, se encontró que los valores obtenidos de acumulación de PHB para estos dos cultivos son estadísticamente iguales, con un 95% de certeza.

Índice de contenido

Agradecimientos:	2
Resumen:	3
1. Introducción	13
2. Objetivos	15
3. Antecedentes generales	16
3.1 Los Plásticos convencionales.	16
3.1.1 Origen y materias primas de los plásticos	16
3.1.2. Características y clasificación de los plásticos	17
3.1.3 Principales usos de los plásticos y producción mundial	18
3.1.4 Consecuencias de la utilización del plástico convencional	20
3.2 Bioplásticos, una alternativa a la problemática actual.	25
3.2.1 Características y tipos	25
3.2.2 Mercado de los bioplásticos	29
3.3 Polihidroxialcanoatos (PHA's)	30
3.3.1 Características y generalidades	30
3.3.2. Propiedades y usos actuales	31
3.3.3 Biodegradabilidad	33
3.3.4 Biosíntesis	34
3.3.5 Microorganismos productores	35
3.3.6 Métodos de producción de PHAs	36
3.3.6.1. Producción in vitro	36
3.3.6.2 Producción in vivo	36
3.3.6.2.1. Producción por cultivo de microorganismos	37
3.3.7 Producción y desarrollo actual de los PHAs en la industria	38
3.4 Polihidroxibutirato (PHB)	40
3.4.1. Características y generalidades	40
3.4.2 Propiedades y aplicaciones	40
3.4.3 Biosíntesis, catabolismo y regulación del PHB	41
3.4.4. Microorganismos sintetizadores de PHB	42

3.5	<i>Azotobacter vinelandii</i> , una bacteria productora de PHB	44
3.5.1	Biología de <i>Azotobacter vinelandii</i>	44
3.5.2	Fijación de nitrógeno	44
3.5.3	Protección de la nitrogenasa, sistema respiratorio y efectos de la razón carbono/nitrógeno.	45
3.5.4	Función biológica del PHB	46
3.5.5	Síntesis de PHB	47
3.6	Estudios de producción de PHB	50
3.6.1	Estudios utilizando <i>Azotobacter vinelandii</i>	51
3.6.1.1	Variando las condiciones nutricionales de cultivo	51
3.6.1.2	Variando las condiciones operacionales de cultivo	52
3.6.2	Con otros microorganismos	53
3.6.2.1	Variando las condiciones nutricionales de cultivo	53
3.7	Sustratos utilizados en la producción de PHB	54
3.7.1	Orujo de uva como sustrato	56
3.7.1.1	Industria del vino en Chile	57
4.	Materiales y Métodos	60
4.1	Microorganismo utilizado	60
4.1.1	Conservación	60
4.1.2	Activación	60
4.2	Medios utilizados	60
4.2.1	Medio sintético o Burk	61
4.2.2	Medio sintético o Burk con fuente de nitrógeno	61
4.2.3	Medio complejo de orujo de uva	61
4.3.	Preparación del inóculo	63
4.4.	Cultivo de bacterias	64
4.4.1	Cultivo en matraces	64
4.4.2	Cultivos en reactor	64
4.5	Diseño de experimentos	65
4.6	Cuantificación y métodos analíticos	67
4.6.1	Biomasa celular	67
4.6.2	Azúcares reductores (sustrato)	67
4.6.3	Amonio	68

4.6.4	pH	68
4.6.5	Oxígeno disuelto	68
4.6.6	Concentración de PHB	69
4.6.7	Recuperación y extracción de PHB	69
4.7	Equipos utilizados	70
4.8	Cálculo de parámetros de cultivo	72
4.8.1	Rendimiento de biomasa	72
4.8.2	Rendimiento de PHB	72
4.8.3	Velocidad específica de crecimiento	72
4.8.4	Acumulación del PHB dentro de la célula	73
5	Resultados y Discusión	74
5.1	Estudios preliminares	74
5.2	Cultivos en biorreactor	77
5.2.1	Evolución de la biomasa	77
5.2.2	Evolución del consumo de azúcares reductores	78
5.2.3	Evolución del consumo de Amonio	79
5.2.4	Evolución de la producción de PHB	80
5.2.5	Parámetros de cultivo	83
5.2.6	Variación del pH	84
5.2.7	Influencia de la razón C/N en los cultivos	85
5.2.8	Recuperación y extracción de PHB de experimento final	88
6	Conclusiones	89
7	Recomendaciones	90
8	Bibliografía	91
9.	Anexos	98
9.1	Curvas de calibración	98
9.1.1	Curva de calibrado de biomasa	98
9.1.2	Curva de calibrado de glucosa	99
9.1.3	Curva de calibrado amonio	100
9.1.4	Curva de calibrado PHB	101
9.2	Métodos analíticos cuantitativos	102
9.2.1	Determinación del crecimiento microbiano por espectrofotometría y peso seco	102
9.2.1.1	Por espectrofotometría:	102

9.2.1.2 Por peso seco:	102
9.2.2 Determinación de la cantidad de azúcares reductores	102
9.2.3 Determinación de la cantidad de amonio por el método de fenolhipoclorito	103
9.2.4 Determinación de la cantidad de PHB por hidrólisis ácida	104
9.2.5 Determinación de la cantidad de nitrógeno asimilable con potenciómetro	104
9.3 Preparación reactivo DNS	105
9.4 Modo de uso de sensores de oxígeno	105
9.5 Recuperación y extracción del PHB	106

Índice de figuras

Figura 3.1. Tipos de plásticos según el orden de sus cadenas moleculares. Fuente: Xunta de Galicia, 2013.....	17
Figura 3.2 Evolución de la producción mundial de plásticos y europeos (EU-28) durante la última década. Fuente: Plastics, 2016.	19
Figura 3.3. Duración de distintos tipos de plásticos en el ambiente. Fuente: Doiser de prensa Greenpeace, 2015.	20
Figura 3.4. Cantidad de residuos arrojados a medios ambientes naturales según países del mundo. Fuente: Jambeck, 2015.....	21
Figura 3.5. Clasificación de los plásticos según materia prima y degradabilidad. Fuente: Anakabe et al., 2011.....	24
Figura 3.6. Ilustración realista de la descomposición biológica de un bioplásticos. Fuente: Van der Hoeven, 2016.....	26
Figura 3.7. Exploración (a, b) y transmisión (c, d) de microfotografías electrónicas de <i>P. putida</i> U (a, c) y su Δ fadBA β -oxidación mutante (b, d) Fuente: Luengo et al., 2003.....	28
Figura 3.8. Distribución del consumo de BPL por sectores. Fuente: Ecoembes, 2013	29
Figura 3.9. Estructura química básica de los PHAs. Fuente Peña et al., 2011.....	30
Figura 3.10. Rutas biosintéticas de los polihidroxialcanoatos. Fuente S. Philip et al., 2007.	35
Figura 3.11. Diagrama de flujo de la producción industrial de PHAs. Fuente: Anjum et al., 2016.....	39
Figura 3.12. Estructura química del P (3HB) Fuente: Castillo et al., 2014.....	40
Figura 3.13. Esquema de la ruta biosintética de la producción de PHB y su posterior degradación. Fuente: Albuquerque y Malafaia, 2017	42
Figura 3.14. Micrografía electrónica de transmisión de una sección delgada de <i>A. vinelandii</i> que contiene gránulos de P (3HB) (inclusiones blancas). Fuente: Castillo et al., 2014.....	43
Figura 3.15. Modelo de los sistemas reguladores que controlan la expresión de los genes <i>phb</i> en <i>A. vinelandii</i> . (+) indica regulación positiva; (-) indica regulación negativa. Los promotores	

están indicados como rectángulos. Los reguladores inactivados en las cepas. Fuente: Hernández-Eligio et al., 2012.....	48
Figura 3.16. (a) Productos de la acetil-CoA en condiciones de crecimiento equilibrado y exceso de carbono. (b) Biosíntesis y descomposición del PHB. Fuente: Byrom, 1987.....	49
Figura 3.17. Superficie vitícola mundial en miles de hectáreas. Fuente: Oficina de estudios y políticas agrarias (2018) elaborado con información de la OIV.	56
Figura 3.18. Evolución de la superficie nacional de vides viníferas por cepa en hectáreas: Fuente Oficina de estudios y políticas agrarias (2018) elaborado con información del SAG	58
Figura 4.1. Orujo de uva de la cepa Chardonnay, utilizada en la experimentación. Fuente: Elaboración propia.....	62
Figura 4.2. Proceso de elaboración del medio de cultivo de orujo de uva para la experimentación. Fuente: Elaboración propia	62
Figura 4.3. Esquema fotográfico del procedimiento para preparar los inóculo. Fuente: Avendaño, 2018. Con modificaciones.....	63
Figura 4.4. Montaje del biorreactor donde se realizaron los cultivos. Fuente: Elaboración propia.....	65
Figura 4.5. Diseño de experimentos a distintas razones C/N. Fuente: Elaboración propia.....	66
Figura 4.6. Autoclave marca AMILAB modelo mx-80 utilizado para esterilizar material y medios de cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	70
Figura 4.7. Shaker orbital utilizado para el cultivo de la cepa en placas y en matraces. Fuente: Elaboración propia.....	70
Figura 4.8. Espectrofotómetro modelo optizen pop.Fuente: Elaboración propia	70
Figura 4.9. Centrifuga HERMLE modelo Z323K utilizada para procesar las muestras del cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	70
Figura 4.10. Balanza electrónica modelo HX-T. Fuente: Elaboración propia	70
Figura 4.11. Estufa MEMERT utilizada para secar muestras de biomasa del cultivo a 80°C. Fuente: Elaboración propia	71

Figura 4.12. Refractómetro digital Hanna Instruments, modelo HI 9681. Fuente: Elaboración propia.....	71
Figura 4.13. Equipo de medición óptica de oxígeno disuelto. Fuente: Elaboración propia.....	71
Figura 4.14. Centrifuga Thermo Scientific modelo SL 16R. Fuente: Elaboración propia.....	71
Figura 4.15. pH-ímetro marca HANNA modelo edge utilizado para monitorear el pH del cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	71
Figura 4.6. Thermo-Shaker marca Bioscan modelo TS-100. Fuente: Elaboración propia.....	71
Figura 5.1. Evolución del cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> OP en matraces, a 200 [rpm] y 30°C. Fuente: Elaboración propia.	74
Figura 5.2. Evolución del pH para el cultivo en matraces con una C/N de 190, 200 rpm y 30°C. Fuente: Elaboración propia.	75
Figura 5.3. . Evolución de la tensión de oxígeno disuelto en el cultivo en matraces, a 200 [rpm] y 30°C. Fuente: Elaboración propia.....	76
Figura 5.4. Evolución del crecimiento celular durante los experimentos realizados a distintas razones C/N, a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.....	77
Figura 5.5. Evolución del consumo de la fuente de carbono en los cultivos realizados a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.....	78
Figura 5.6. Evolución del consumo de amonio en cultivos realizados a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.	79
Figura 5.7. Evolución de la producción de PHB en cultivos a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.....	80
Figura 5.8. Acumulación del PHB en los cultivos a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.....	81
Figura 5.9. Evolución del pH durante los tres experimentos realizados a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente. Elaboración propia.....	84
Figura 5.10. Variación de la razón C/N a lo largo del tiempo en el cultivo de C/N inicial 9. Fuente: Elaboración propia.....	85

Figura 5.11. Variación de la razón C/N a lo largo del tiempo en el cultivo de C/N inicial 7. Fuente: Elaboración propia	86
Figura 5.12. Recuperación del PHB del cultivo final. Fuente: Elaboración propia	88
Figura 5.13. Film de PHB extraído del caldo de cultivo final. Fuente: Elaboración propia.....	88
Figura 9.1. Curva de calibración para conocer la biomasa durante el cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	98
Figura 9.2. Curva de calibración de glucosa. Fuente: Elaboración propia.....	99
Figura 9.3. Curva de calibración amonio para conocer su evolución durante el cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	100
Figura 9.4. Curva de calibración de ácido crotónico para conocer la cantidad de PHB contenido en las muestras durante el cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	101

Índice de tablas:

Tabla 3.1. Usos de los plásticos según su clasificación. Fuente: Centro de investigación en biotecnología de la Universidad Autónoma del estado de Morelos.....	18
Tabla 3.2. Tipos de bioplásticos existentes según su obtención, aplicación y degradabilidad. Fuente: Álvarez, 2016.	26
Tabla 3.3 Propiedades físicas de diferentes tipos de PHAs y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo. Fuente: Babel y Steinbüchel, 2001.....	32
Tabla 3.4. Usos de los polihidroxicanoatos según sus propiedades. Fuente: Peña et al., 2011.	32
Tabla 3.5. Resumen de estudios que informan la producción de PHA por cultivo batch. Fuente: Gholami A et al., 2016.	37
Tabla 3.6. Empresas que producen polihidroxicanoatos. Fuente: Koller et al., 2017.....	38
Tabla 3.7. Resumen de los experimentos realizados más recientemente, que poseen potencial para replicar a gran escala. Fuente: Castillo et al., 2014.....	50
Tabla 3.8. Precios de sustratos, rendimientos de PHB y costos de sustratos para la producción de PHB. Fuente: Byrom, 1987.....	54

Tabla 3.9. Comparación de la producción volumétrica de P (3HB), el contenido y los rendimientos utilizando diferentes fuentes de carbono (n.i: no informado) Fuente: Castillo et al., 2014.....	55
Tabla 3.10. Resultados obtenidos en la experimentación a nivel de matraces con <i>Azotobacter vinelandii</i> OP, a diferentes fuentes de carbono. Fuente: Avendaño, 2018	59
Tabla 3.11. Comparación de dos escalas en la producción de PHB con <i>Azotobacter vinelandii</i> OP utilizando mosto como fuente de carbono. Fuente: Avendaño, 2018.....	59
Tabla 4.1. Composición y concentraciones del medio de cultivo sintético. Fuente: Díaz-Barrera et al., 2016.....	61
Tabla 4.2. Condiciones de operación para las dos escalas de cultivo utilizadas. Fuente: Elaboración propia.....	64
Tabla 4.3. Razones C/N estudiadas con sus respectivas cantidades en moles, en el medio de cultivo. Fuente: Elaboración propia.....	66
Tabla 5.1. Producción de PHB en cultivos de matraces C/N 190. Fuente: Elaboración propia.	74
Tabla 5.2. Parámetros de cultivos en matraces C/N 190. Fuente: Elaboración propia	75
Tabla 5.3. 3 Intervalos de confianza para los valores de acumulación de PHB dentro de la célula. Fuente: Elaboración propia.....	82
Tabla 5.4. Parámetros de cultivo obtenidos en los experimentos realizados. Fuente: Elaboración propia.....	83
Tabla 5.5. Comparación de rendimientos obtenidos con otros trabajos de producción de PHB. Fuente: Elaboración propia.	86

1. Introducción

El plástico convencional utilizado en la sociedad, es una macromolécula producida a partir del petróleo, un combustible fósil no renovable. Este producto, además, no es biodegradable, sólo se va debilitando a través del tiempo por efecto del medio ambiente, haciendo que se divida en partículas cada vez más pequeñas, pero nunca desapareciendo del todo (Perdomo et al., 2002). Este hecho, ha desencadenado uno de los más terribles desastres medioambientales de nuestra época.

Sin embargo, existe una infinidad de sustancia que poseen un tiempo de degradación suficiente como para que el ambiente se limpie y los residuos sean incorporados en un ciclo. Es por esto, que actualmente, se está trabajando en buscar nuevas alternativas para la sustitución de los plásticos convencionales. Dentro de estas alternativas se encuentran los bioplásticos. Éstos últimos, son compuestos que poseen propiedades similares a los plásticos convencionales, pero que son producidos a partir de microorganismos u otras fuentes renovables de materia prima. Esto genera, por lo tanto, que una vez que sean desechados, puedan ser biodegradados fácilmente por la naturaleza, evitando así la contaminación de la misma.

Dentro de los bioplásticos, se destacan los polihidroxialcanoatos o PHAs. Estos compuestos son poliésteres producidos por microorganismos. El más estudiado y simple de los PHAs es el polihidroxibutirato o PHB. Éste compuesto, presenta propiedades mecánicas similares a los plásticos derivados del petróleo, con la ventaja de ser biodegradable, biocompatible y producirse a partir de fuentes renovables. Es un polímero producido por diversas bacterias, entre ellas *Azotobacter vinelandii*, la cual puede almacenar un 80 % de su peso en PHB y en ocasiones, incluso más que eso. (Castillo et al., 2017)

Para producir estos compuestos tan necesarios de manera industrial, es necesario tener un proceso de producción adecuado que permita obtener productos a un costo tal que su precio de venta, sea competitivo con respecto a los costos de obtención de plásticos convencionales, derivados de la industria petroquímica. Para esto existen tres puntos a profundizar:

- El uso de materias primas de bajo costo, como biomasa renovable disponible localmente cerca del sitio de producción.
- Seleccionar y modificar los microorganismos robustos que podrían sintetizar acumular una gran cantidad de PHB dentro de sus cuerpos de inclusión.
- Mejorar los procesos de cultivo y recuperación para obtener un alto rendimiento de PHB y de recuperación del mismo.

En el presente documento se expone el estudio que se realizó para identificar las condiciones bajo las cuales se producen mejoras en el rendimiento de PHB, producido a partir de la cepa *Azotobacter vinelandii* OP, la cual dentro de su metabolismo, inhibe la formación del polisacárido extracelular Alginato, produciendo por lo tanto sólo PHB como polímero de reserva de energía, en gran cantidad.

Además, tomando en cuenta el punto número uno nombrado anteriormente, se trabajó con un sustrato de bajo costo que es el orujo de uva, el cual corresponde a un residuo de la industria vitivinícola, que actualmente se desecha y puede ser aprovechado para este proceso, debido a su alto contenido de azúcares fermentables por la bacteria. De esta manera se hace el aprovechamiento de un residuo, al mismo tiempo que se genera un producto limpio, que sustituye uno de los mayores contaminantes del mundo en la actualidad.

Por otro lado, a modo de mejorar la producción de plástico microbiano dentro de los cultivos tipo lote, es posible modificar la razón Carbono/Nitrógeno inicial del medio de cultivo en el cual crece la bacteria. Esto, debido a que se ha estudiado que esta razón controla el consumo de oxígeno celular, y la actividad y formación del sistema respiratorio de *Azotobacter vinelandii* (Oelze, 2000). Estos procesos, están íntimamente relacionados con la formación de biomasa dentro de los cultivos, y también con la producción de PHB.

2. Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la producción de PHB en *Azotobacter vinelandii* OP, a partir de orujo de uva como fuente de carbono, a distintas razones Carbono/Nitrógeno.

Objetivos Específicos:

- Analizar la capacidad de producción de PHB en *Azotobacter vinelandii* OP, usando orujo de uva como fuente de sustrato a dos escalas de laboratorio.
- Determinar la razón Carbono/Nitrógeno que aumente el rendimiento de producción de PHB, en *Azotobacter vinelandii* OP, usando orujo de uva como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente externa de nitrógeno, en un reactor de 4 litros.

3. Antecedentes generales

3.1 Los Plásticos convencionales.

3.1.1 Origen y materias primas de los plásticos

Los plásticos o polímeros, son materiales sintéticos derivados del petróleo, aunque algunos se pueden obtener a partir de otras sustancias naturales, la mayoría de los plásticos que se ocupan en la vida cotidiana, son provenientes de la industria petroquímica. Estos se obtienen mediante procesos de polimerización, y su significado literal es: objetos moldeables. Sin embargo, *plásticos*, es la palabra con que se popularizó mundialmente el gran invento del primer cuarto del siglo XX.

El uso de los polímeros se remonta al año 1600, antes de nuestra era, cuando culturas antiguas mesoamericanas procesaron por primera vez el caucho natural en objetos sólidos como bolas, figurillas humanas, bandas para atar cabezas de hacha a los agarradores de madera y otros objetos. Los antiguos mesoamericanos obtenían la materia prima para fabricar objetos de caucho de látex producido por el árbol Castilla elástica. Ésta especie es nativa de las tierras bajas tropicales de México y América Central. El látex es un líquido blanco pegajoso que cuando se seca es un sólido frágil que retiene su forma. Así, estos descubrimientos preceden por 3500 años al proceso de vulcanización utilizado actualmente (Hosler et al., 1999).

Polímeros como el originado por la modificación de la celulosa con nitratos llegó a conocerse durante el siglo XIX como “celuloide” y fueron muchos los beneficios que brindó y brinda a la sociedad. El poliestireno y el poli(etilénico) datan del mismo siglo. Por otro lado, uno de los primeros polímeros verdaderamente sintéticos y de amplia proyección comercial ha sido la resina de fenol – formaldehído, conocida como “bakelita”, en homenaje a su creador, el químico de origen Belga Leo Baekeland. Este polímero aparece en los comienzos del siglo XX y alcanza su apogeo alrededor de los años veinte de ese siglo.

Queda finalmente, en manos de la sociedad dar uso racional a tan valiosos materiales. La creación de leyes que regulen la producción y el control de los desechos, las políticas de desarrollo de nuevos materiales polímeros, el mejoramiento de las propiedades y las novedosas aplicaciones, son un reto para los y las científicas. La versatilidad de los materiales polímeros, los hacen cada día más insustituibles en el avance de la humanidad y cada vez son muchos los descubrimientos que se develan ante los ojos atónitos de quienes buscan en el conocimiento el confort de la sociedad mundial. Actualmente, el 95% de los plásticos se fabrica a partir de derivados del petróleo crudo, los que se transforman en monómeros y luego, al polimerizarlos, en polímeros (Asiplas, 2016).

3.1.2. Características y clasificación de los plásticos

Los plásticos a nivel molecular, son largas cadenas macromoleculares de átomos de carbonos, obtenidos por medio de la polimerización de sustancias naturales como derivados del petróleo, proteínas animales y polisacáridos. Según la materia prima por la cual son sintetizados se pueden separar en dos grupos principalmente: Naturales y Sintéticos. Los plásticos naturales son obtenidos directamente de materias primas naturales renovables. Por otro lado, los sintéticos corresponden a los elaborados a partir del petróleo, el gas natural o el carbón, todas estas, materias primas no renovables.

Además, dependiendo de su estructura interna, estos materiales pueden ser divididos en tres grupos principalmente: Termoplásticos, Termorígidos o termoestables y Elastómeros. (Figura 3.1)

Los termoplásticos, son aquellos que por su estructura interna, formada por cadenas lineales, se desarmen fácilmente con el calor y se reconstruyen al enfriarse. Por esto mismo, que tienen buena capacidad para ser reciclados. Algunos ejemplos de termoplásticos son las bolsas plásticas, piezas de automóviles, etc. Dentro de este grupo se encuentra el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), metacrilato, teflón, celofán y nailon o poliamida (PA).

Los termoestables, por el contrario, mantienen su forma hasta al ser quemados, sólo pueden fundirse y fabricarse una vez. Esto, debido a que su estructura interna es de cadenas entrecruzadas. En este grupo se encuentra el poliuretano, las resinas fenólicas y la melamina. Finalmente, los elastómeros, son un tipo de termoestables, pero su estructura interna posee cadenas ramificadas, presentando de esta forma un elevado grado de elasticidad. Aquí se encuentra el caucho natural, el caucho sintético y neopreno.



Figura 3.1. Tipos de plásticos según el orden de sus cadenas moleculares. Fuente: Xunta de Galicia, 2013.

3.1.3 Principales usos de los plásticos y producción mundial

Son inmensas las aplicaciones y los tipos de materiales polímeros que existen hoy en día. Existen polímeros con excelentes propiedades térmicas y resistentes a la oxidación o a los efectos de la luz solar, los cuales sirven de base para la construcción en general. También los hay livianos y resistentes a la aplicación de fuerzas, muchas veces impenetrables a los impactos de proyectiles. Capaces de reemplazar los metales en muchas aplicaciones: engranajes, barras, cuerdas, láminas, etc.

Existen también fibras aromáticas altamente resistentes a la tensión, producto de la tecnología del cristal líquido, con aplicaciones que van desde cauchos para automóviles hasta soportes para anclar plataformas submarinas. Para aplicaciones biomédicas, desde suturas biocompatibles y degradables, hasta órganos artificiales.

De acuerdo a su importancia comercial y por sus aplicaciones en el mercado, se muestra en la Tabla 3.1 el nombre de los diferentes tipos de plásticos que se usan en la vida cotidiana, todos poseen un número de identificación impreso en el producto plástico y se muestran también ejemplos de aplicaciones como las nombradas anteriormente.

Tabla 3.1. Usos de los plásticos según su clasificación. Fuente: Centro de investigación en biotecnología de la Universidad Autónoma del estado de Morelos

Nombre	Símbolo	Numero	Principales aplicaciones
Polietilen-tereftalato	PET o PETE	1	Envases para bebidas, electrodomésticos, usos en industria textil.
Polietileno de alta densidad	PEAD o HDPE	2	Envases y empaques, aislantes, industria eléctrica, sector automotriz, etc.
Policloruro de vinilo o vinilo	PVC o V	3	Tuberías, botellas, películas y láminas, calzado, recubrimiento de cable, etc.
Polietileno de baja densidad	PEBD o LDPE	4	Películas, bolsas transparentes, tuberías.
Polipropileno	PP	5	Productor médicos, juguetes, recipientes para alimentos, cajas, hieleras, industria automotriz, electrodomésticos entre otros.
Poliestireno	PS	6	Envases de productos alimenticios, edificación, carcazas, juguetes, etc.
Otros	Otros	7	

Es por esto, que los plásticos se han convertido en un soporte básico para el estilo de vida moderno, causando el reemplazo de materiales tradicionales, como la madera, metales y cerámicas. Lo que se ve reflejado en la alta producción de este material a nivel mundial. Esta producción, ha aumentado constantemente en los últimos años (Figura 3.2), alcanzando un total anual mundial de 322 millones de toneladas en 2015 (Plastics, 2016).

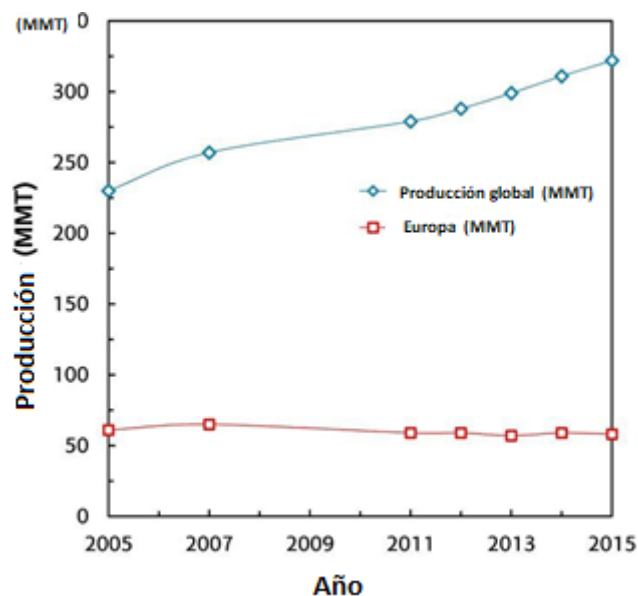


Figura 3.2 Evolución de la producción mundial de plásticos y europeos (EU-28) durante la última década. Fuente: Plastics, 2016.

Sin embargo, el uso de plásticos por los humanos en estos últimos años ha realizado daños irreparables en el medio ambiente. A pesar de su indiscutible utilidad en la vida cotidiana, una vez que la mayoría de los plásticos se han utilizado, éstos se convierten en importantes actores de los residuos sólidos urbanos (RSU). Los RSU originan problemas de contaminación del agua, aire y suelo, que impactan directamente al ambiente y a la salud de los seres vivos. Esto se debe principalmente a que estos compuestos no son biodegradables, es decir, no existe en la naturaleza organismo alguno que pueda degradarlos. Las bacterias en general no conocen estos materiales y, por lo tanto, no los digieren. Sólo hasta hace unos 3 o 4 cortos años, fueron descubiertas enzimas de bacterias capaces de degradar casi en su totalidad, laminas delgadas de polietileno tereftalato (PET), un plástico muy utilizado en envases de bebida y textiles, y sólo bajo condiciones específicas de temperatura y tiempo. Estos descubrimientos están aún en sus primeras etapas y falta tiempo y estudios para poder llevar a cabo de manera más formal o comercial la aplicación de estas alternativas.

3.1.4 Consecuencias de la utilización del plástico convencional

Existen dos aspectos importantes por los cuales los plásticos comprenden un problema para el medio ambiente. El primero es que el plástico tarda cientos de años en descomponerse en el medio ambiente, dependiendo del tipo de plástico, este proceso puede tardar hasta 1.000 años. Y lo segundo es que es un producto que posee una muy alta tasa de producción, esto, sumado a que en general son utilizados como artículos desechables en el estilo de vida actual de los seres humanos, hacen de este producto, uno de lo más preocupantes a nivel ambiental, debido a la eliminación inadecuada de los desechos, la distribución ubicua de este mismo y los dos aspectos nombrados anteriormente (Andrady, 2015). Utilizar masivamente un material tan duradero para objetos desechables, es un error de consecuencias catastróficas.

En julio del 2015, un artículo publicado en la revista Science Advances por el ecologista industrial Roland Geyer y sus colegas, de la Universidad de California en Santa Bárbara, Estados Unidos, calculó el volumen total de todo el plástico producido hasta esa fecha. El resultado fue de 8.300 millones de toneladas. De ese número, unos 6.300 millones de toneladas ahora son residuos, y el 79% de ellos, se encuentra en vertederos o en el entorno natural. Esta gran cantidad de desechos fue impulsada por la vida moderna, donde el plástico se usa para muchos artículos desechables o de "uso único". Las botellas de bebida son uno de los tipos más comunes de desechos plásticos. A continuación, en la figura 3.3 se exponen ejemplos de cuanto se demoran en descomponerse, sin embargo, como se verá más adelante, estos valores no serían del todo reales.

Plásticos: ¿cuánto tiempo tardan en descomponerse?			El mismo tiempo que hace que...	
HILO DE PESCA		± 600 años		Colón llegó a América (1492)
BOTELLA		± 500 años		Nació Cervantes (1547)
CUBIERTOS		± 400 años		Galileo Galilei dijo: "la Tierra es redonda" (1630)
MECHERO		100 años		Se hundió el Titanic (1912)
VASO		65- 75 años		Terminó la II Guerra Mundial (1945)
BOLSA		55 años		Llegó el hombre a la Luna (1969)
SUELA DE ZAPATO		10- 20 años		1º teléfono móvil con pantalla de color (2000)
COLILLA		1- 5 años		Accidente de Fukushima (2011)
GLOBO		6 meses		Acuerdo del Clima de París (2015)

Se **Figura 3.3. Duración de distintos tipos de plásticos en el ambiente. Fuente: Doiser de prensa estima Greenpeace, 2015.**

que como consecuencia de una mala gestión de residuos o su abandono simplemente, unos 8 millones de toneladas de plásticos acaban en los mares y océanos anualmente, formando aproximadamente dentro del 60 a 80% de la basura marina (Derraik, 2002). Esto, ha convertido a los plásticos en contaminantes reconocidos mundialmente tanto como de interés económico, social y político, ya que representan una amenaza para la vida silvestre marina y los ecosistemas, la industria y la seguridad alimentaria.

China encabezó la lista de países que peor administraban los desechos de plástico. En el segundo lugar se encuentra Indonesia, le siguen Filipinas, Vietnam y Sri Lanka. Más países asiáticos que actualmente experimentan una potente expansión económica como Bangladesh, Malasia o Myanmar también aparecen en lo alto de la lista, intercalados con algunos africanos como Egipto, Nigeria o Suráfrica, entre otros. En el puesto 16 está Brasil, en el 19 Corea del Norte y en el 20, EE UU, ésta última es una de las naciones con mayor tasa de desperdicio por persona. Dentro de Europa, más de dos tercios de la demanda de plásticos se concentran en cinco países: Alemania (24,9%), Italia (14,3%), Francia (9,6%), Reino Unido (7,7%) y España (7,4%) (Plastics Europe, 2015) (Figura 3.4).

Océano de plástico



Figura 3.4. Cantidad de residuos arrojados a medios ambientes naturales según países del mundo. Fuente: Jambeck, 2015.

Los desechos marinos, como ya se mencionó, figuran entre las principales amenazas a la biodiversidad, y son motivo de especial preocupación debido a su abundancia, durabilidad y persistencia en el medio ambiente del mar. Estudios recientes han demostrado que la “degradación” de estos compuestos, es un proceso de cambio químico, que lleva a la desintegración parcial de las moléculas de polímeros, disminuyendo su peso molecular. Los polímeros más utilizados (polietileno y polipropileno) tienen pesos moleculares elevados y no son biodegradables. Sin embargo, cuando estos se encuentran en el medio acuático, comienzan la degradación foto-oxidativa por radiación solar (UV), seguida de una degradación termal y/o química. Esto hace que los plásticos sean susceptibles a la acción microbiana. Pero cualquiera sea el mecanismo de degradación, produce sólo un debilitamiento de la estructura del plástico, lo suficientemente como para fragmentarse cuando se traslada o agita (por corrientes de agua). (Andrady, 2011)

Este proceso ocurre por siempre, incluso a nivel molecular. De aquí se deriva otro punto muy importante dentro de esta problemática, y es que no existe una real degradación de estos contaminantes, ya que sólo se hacen cada vez más pequeños. Es por esto, que diversos estudios recientes han informado sobre la presencia de “micro plásticos” o fragmentos de plásticos de tamaño inferior a 5 milímetros, los cuales, lo más probable es que provengan de la fragmentación de objetos plásticos más grandes. Estos compuestos pequeños se han estado acumulando de forma constante y considerable en los mares, arenas de playas y estuarios.

La primera mención de plásticos de menor tamaño de lo normal en mar abierto, fue en la década de los setenta, y un nuevo interés científico en los microplásticos ha demostrado que estos contaminantes están ampliamente distribuidos y son prácticamente ubicuos en el medio marino.

La existencia de residuos micro plásticos en los mares va mucho más allá de un problema estético, éstos representan un peligro real para todos los organismos marinos, incluyendo el plancton, los crustáceos y los peces, los cuales pueden sufrir daños por ingestión. Este daño se presenta ya sea debido a los contaminantes químicos que estos compuestos poseen, o simplemente por atragantamiento, debido a la presencia física de éstos, dentro de los intestinos y áreas respiratorias. Debido a su pequeño tamaño (2 a 5 mm), los micro plásticos son considerados biodisponibles, es decir, se encuentran disponibles para que se incorporen accidental o intencionalmente a un organismo. La ingestión de estos micro plásticos puede, por lo tanto, ser responsable de introducir toxinas a la base de la cadena alimentaria, donde existe potencial de bioacumulación (Rochman et al., 2013), este último término se refiere a que, la existencia de los microplásticos en el cuerpo de los organismos, va avanzando en conjunto a la cadena trófica de los animales, incorporando cada vez más plástico a sus organismos, llegando incluso a ser traspasados hasta llegar a nuestros platos. Actualmente se desconocen las implicaciones de este hecho para la salud humana, por lo cual se requieren más investigaciones en este aspecto, como lo apuntan las Naciones Unidas (UNEP, 2016).

Se calculan cientos de miles de muertes de mamíferos marinos al año por estas causas. En aves, se determinó que 82 de 144 especies estudiadas contenían fragmentos de plástico en sus estómagos y en algunas especies hasta el 80% de los individuos los presentan. Se ha

demostrado también que los plásticos acumulan compuestos químicos tóxicos como los bifenilospoliclorados (PCBs), el diclorodifenildicloroetano y los nonifenoles, que no son muy solubles en agua y por lo tanto se adhieren y acumulan en los plásticos (Espín, 2007). Los PCBs en particular no tienen efectos evidentes, pero se ha demostrado que sí llevan a desordenes reproductivos, alteran los niveles hormonales e incrementan el riesgo de muerte, conduciendo a ella finalmente (Lee et al., 2001).

Existen también consecuencias económicas negativas a causa de este problema. La pesca fantasma, derivada de los instrumentos de pesca abandonados, constituye el mayor impacto de los macro plásticos en la industria pesquera. Debido a redes y trampas abandonadas en mar abierto, la mortalidad de peces y crustáceos se ve en aumento. Además, para las numerosas industrias basadas en el aprovechamiento de los recursos del mar, que posean actividades tales como navegación, pesca, acuicultura y producción de energía, los plásticos son una amenaza debido a enredos o daños en los equipos.

El sector turístico también se ve afectado por la presencia de basura plástica en el mar. La sola presencia de plásticos de gran tamaño, significa la pérdida a nivel estético del sitio donde se encuentran los desechos, teniendo de esta forma implicancias económicas negativas para la industria del turismo en dicho lugar. Además de los costos de limpiar playas y zonas costeras, para las autoridades competentes, se estiman costos de casi 630 millones de euros anuales en las naciones europeas.

A nivel mundial, en el norte del océano pacifico se encuentra una masa flotante de fragmentos de plásticos, conocida popularmente como “El parche de basura del Pacifico Norte”. El parche es claramente un eufemismo del tamaño de esta masa, ya que la extensión de esta misma es aún indeterminada. Este parche o isla como también se le llama, está formado principalmente por plásticos provenientes de fuentes terrestres (80%) y el resto es un aporte de los barcos, todos estos residuos son arrastrados hasta una gran región ubicada en medio del océano pacifico norte (entre Norte América y Japón). En ese lugar, la corriente marina, junto con los vientos y la presión atmosférica, producen una circulación que encierra los desechos flotantes y los mantiene unidos en esa masa de agua. El área puede llegar a contener cerca de 100 millones de toneladas de desechos. El tamaño de la zona afectada se desconoce, pero se estima que va desde los 700.000 km^2 hasta más de 15 millones de km^2 , lo cual corresponde a cerca del 0,41 al 8,1% del tamaño del Océano Pacífico. (Goldstein et al., 2013)

Afortunadamente existe una amplia variedad de tipos de plásticos, aunque los más utilizados sean los provenientes de la industria petroquímica, hay más. Analizando los termoplásticos desde el punto de vista del ciclo de vida, se obtiene una clasificación de cuatro cuadrantes, mostrada a continuación (Figura 3.5), que toma en cuenta la materia prima con la cual se producen y el tratamiento final que estos tienen, una vez que cumplen su función y son desechados.

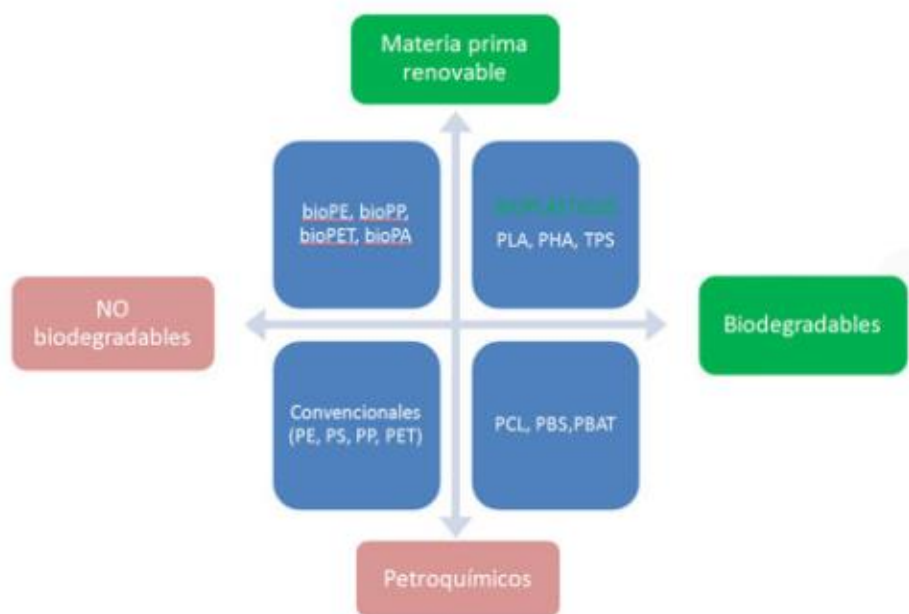


Figura 3.5. Clasificación de los plásticos según materia prima y degradabilidad. Fuente: Anakabe et al., 2011.

Los conocidos plásticos petroquímicos no biodegradables, se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo, a su diagonal tenemos los bioplásticos, que son el polo opuesto, es decir, son plásticos renovables y degradables. Sin embargo, existe otra gama intermedia entre ambos extremos. En el cuadrante superior izquierdo tenemos los plásticos renovables análogos a los plásticos petroquímicos actuales, que presentan la misma estructura química (poliolefinas, poliésteres, poliamidas) pero que han sido producidos a partir de fuentes renovables, a diferencia de la industria popular del petróleo. Estos plásticos suelen ser elegidos por aquellos sectores en los que prima el independizarse de la actual industria petroquímica, sobre la posibilidad de un fin de vida sostenible. Por lo general, sectores que trabajan con aplicaciones duraderas como el de automóviles, electrodomésticos, juguetería, etc. Por último, en el cuadrante inferior derecho tenemos los plásticos sintéticos (en su mayor parte petroquímicos) biodegradables, interesantes para sectores donde la vida útil del producto es muy corta, como el de envase y embalaje, pero donde, sin embargo, se está abusando de un recurso no renovable. Claramente la mejor opción son los bioplásticos, ya que no comprometen ningún problema para el medio ambiente, en estos dos aspectos que se ven representados.

3.2 Bioplásticos, una alternativa a la problemática actual.

La problemática existente, por el uso indiscriminado de plásticos sintéticos y su persistencia en el ambiente, ha estimulado la investigación para el desarrollo de diversas soluciones. Soluciones que se basan en el desarrollo de nuevos materiales y nuevos métodos de producción que permitan generar compuestos, con propiedades similares a las de los plásticos convencionales, pero esta vez, con la capacidad de ser degradables en un menor tiempo que estos mismos, o directamente, ser biodegradables. Los compuestos que mejor se adaptan a estas características, son los bioplásticos.

3.2.1 Características y tipos

Los bioplásticos, son plásticos naturales biodegradables, esto, debido a que son producidos por materias primas renovables dentro del ecosistema natural del medio ambiente. Pueden ser producidos a partir de biomasa o directamente por seres vivos, mediante reacciones enzimáticas. Es por esto que también son biodegradables, es decir, son susceptibles a la degradación por sistemas biológicos, ya que han estado presentes en el ambiente desde hace mucho tiempo, y así como han evolucionado organismos capaces de producirlos, también están los cuales tienen la capacidad de aprovecharlos, degradándolos y obteniendo energía y nutrientes a partir de ellos. Es más, las mismas bacterias que los producen como reserva de alimento, deben ser capaces de degradarlos para utilizarlos eventualmente (Espín, 2007).

Esta biodegradación, es un proceso natural de digestión, asimilación y metabolismo de un compuesto orgánico, por la acción de agentes biológicos, como plantas, animales, microorganismos y hongos. Esto sucede bajo condiciones ambientales naturales, como el sol o la lluvia. Básicamente, se trata de que todas las sustancias se lleguen a descomponer en los elementos químicos que las conforman (Aamer et al., 2008). Este, es un proceso valioso para la conservación de los ecosistemas, ya que por un lado permite la eliminación de compuestos nocivos, evitando que se acumulen en el medio ambiente, y por otro lado es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas). La figura 3.6, muestra la biodegradación de una botella hecha de bioplástico en el tiempo.



Figura 3.6. Ilustración realista de la descomposición biológica de un bioplásticos. Fuente: Van der Hoeven, 2016.

Estos compuestos pueden clasificarse en tres grandes grupos: (a) Polímeros bio-quimiosintéticos, (b) Polímeros biosintéticos y (c) Polímeros naturales modificados (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Tipos de bioplásticos existentes según su obtención, aplicación y degradabilidad. Fuente: Álvarez, 2016.

Categoría	Ejemplos	Obtención	Degradabilidad
Polímeros Bio-Quimiosintéticos	• Poli (ácido láctico) (PLA) • Poli (succinato de butileno) • Alcohol polivinílico • Poli (ácido glicólico) • Politioésteres	Síntesis del monómero biológica y polimerización química	Degradación hidrolítica. Excepciones: • PLA cristalino • Politioésteres
Polímeros Biosintéticos	• Polihidroxialcanoatos	Biosíntesis del polímero por microorganismos	Degradación enzimática y/o hidrolítica
Polímeros naturales modificados	• Polímeros a base de almidón • Derivados de celulosa • Proteínas	Modificación química del polímero natural	Degradación enzimática Excepciones: • Derivados de celulosa

Los polímeros obtenidos a partir de biomasa o polímeros naturales modificados, fueron los primeros en popularizarse, se conocieron por el nombre de *bioplásticos vegetales*. El almidón y la celulosa, polímeros de glucosa elaborados por las plantas, son la materia para obtener estos bioplásticos, los cuales se fabrican mayormente de desechos de papa, maíz, trigo, tapioca, caña de azúcar o yuca y se utilizan para producir cubiertos, envases o bolsas.

También, se pueden obtener bioplásticos a partir de la síntesis de monómeros de biomasa. Estos son los polímeros bio-químicosintéticos, y poseen propiedades más deseables que los anteriores. Los polímeros de glucosa, por ejemplo, sirven para que, tras un proceso de extrusión y otros tratamientos, acaben convirtiéndose en material para cubiertos, envases o bolsas. Este, es el popular polilactato o PLA, un poliéster obtenido por polimerización del ácido láctico resultante del consumo de azúcar por parte de los microorganismos. El PLA posee una alta resistencia, lo que le permite ser utilizado como capas de sellado térmico, etiquetas y bolsas de transporte, como alternativa para películas tradicionales y para la producción de envases rígidos, todos estos, compostables y totalmente biodegradables en menos de 60 días, lo que lo hace un material termoplástico capaz de competir en mercados de gran volumen, junto con los actuales polímeros termoplásticos derivados de fuentes petroquímicas.

Estos tipos de plástico natural, se producen en forma fluida y, por lo tanto, tiene una forma fácil y no se requiere gastar una gran cantidad de energía en su proceso. Esto se puede comparar con el plástico convencional que se almacena generalmente como gránulos y necesita una cantidad masiva de energía para que se pueda moldear mediante moldeo, inyección o extrusión.

Por otro lado, también existen los polímeros biosintéticos. Estos bioplásticos son directamente producidos por microorganismos, bajo distintas condiciones ambientales, los cuales son poliésteres que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Normalmente, son de naturaleza lipídica, y se acumulan intracelularmente en forma de gránulos de almacenamiento (Figura 3.7), lo que permite la supervivencia microbiana en condiciones de estrés. Estos polímeros generalmente se construyen a partir de derivados de hidroxil-acil-CoA a través de diferentes rutas metabólicas. Dependiendo de su microorganismo productor, el bioplástico diferirá en su composición monomérica, estructura macromolecular y propiedades físicas. Los bioplásticos microbianos más ampliamente producidos son los polihidroxialcanoatos, estos compuestos se han comercializado como los bioplásticos ecológicos con menos emisiones de CO_2 y con mayor índice de sostenibilidad, así como también con independencia de las fuentes de petróleo (Chen y Patel., 2012).

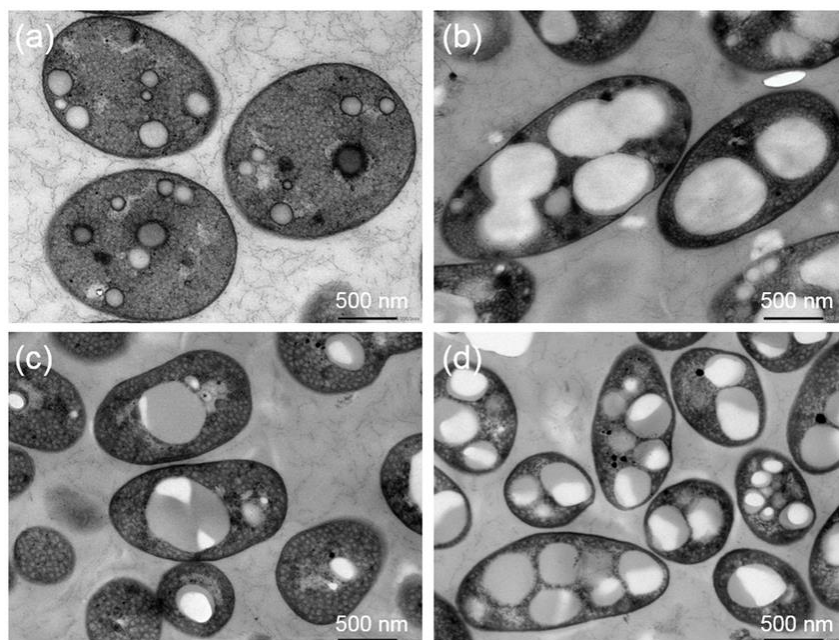


Figura 3.7. Exploración (a, b) y transmisión (c, d) de microfotografías electrónicas de *P. putida* U (a, c) y su Δ fadBA β -oxidación mutante (b, d) Fuente: Luengo et al., 2003.

Actualmente, las principales limitaciones para la producción a gran escala de bioplásticos son sus altos costos de producción y recuperación, comparados con los plásticos convencionales, estos compuestos son entre 5 y 10 veces más caros (c) y dentro de los cuales el costo del sustrato comprende casi el 50% del total de los costos de producción. (Byrom, 1987). Sin embargo, la ingeniería genética y metabólica ha permitido su biosíntesis en varios organismos recombinantes (otras bacterias, levaduras o plantas transgénicas), al mejorar los rendimientos de producción y reducir los costos generales.

El primer bioplástico de este tipo que fue descubierto, es el poli (3-hidroxibutirato) o P (3HB), el más simple de los polihidroxialcanoatos o PHA's. En 1926, el microbiólogo Maurice Lemoigne, del instituto Pasteur de Paris, observó la degradación anaeróbica de un bacilo similar al *Bacillus Megaterium*, el cual generaba este bioplástico. Luego, en 1958, Macrae y Wildkinson observaron que *B. megaterium* acumuló el polímero cuando la relación glucosa/nitrógeno aumentó, mientras que su degradación se produjo en condiciones de restricción de carbono y energía (Lee y Chang, 1995).

Estas observaciones iniciales fueron casi olvidadas, hasta mediados de la década de 1970 cuando, debido a la crisis del petróleo, se emprendió un movimiento científico destinado a descubrir fuentes alternativas a las reservas de combustibles fósiles. Es por esto que la estructura, las rutas biosintéticas y las aplicaciones de muchos de estos compuestos ya se han establecido. Los microorganismos utilizados pertenecen a más de 90 géneros, incluyendo aerobios, anaerobios, bacterias fotosintéticas, arqueobacterias y eucariotas inferiores, los cuales son capaces de acumular y catabolizar estos poliésteres.

3.2.2 Mercado de los bioplásticos

Se han descubierto hasta 300 PHAs pero solo algunos se han desarrollado para usos comerciales, como el polihidroxibutirato (PHB), polihidroxivalerato (PHV), y PHBV un copolímero de los dos. Se comercializan bajo la forma de tenedores de plástico y películas para embalaje, puesto que son resistentes al calor, a la grasa y al aceite. Los podemos encontrar bajo el nombre de Biopol® (Monsanto) o Nodax® (Procter & Gamble).

El polilactato o PLA por otro lado, es comercializado bajo los nombres de NatureWorks (Cargill-Dow LLC), Lacty (Shimadzu) o Lacea (MitsuiChemicals).

Las empresas líderes productoras de estos compuestos se encuentran en Estados Unidos, Canadá, Japón y la Unión Europea, aunque otros países como Australia, Brasil, Corea y China también los están produciendo. De una cifra de alrededor de 700.000 toneladas en 2010, la capacidad de producción de bioplásticos se incrementó en 2015 hasta 1.7 millones de toneladas. Las principales empresas que están desarrollando biopolímeros base protegidos por patentes son: BASF, DuPont, Mitsubishi Gas Química, Novamont, NatureWorks, Rodenburg Biopolimero y Biotec. (Catedra ecoembes del medio ambiente, 2013)

En México, particularmente, desde el 2012 la empresa Biofase, manufactura distintos productos plásticos biodegradables y compostables, tales como empaques para alimentos, bolsas, botellas, cubiertos, platos y vasos. En nuestro país, se destaca ZEApplast, ubicada unos kilómetros al sur de Concepción. Esta es una empresa que produce bioplásticos a partir de polímeros vegetales para su aplicación en industrias de alimento y retail.

Este rápido crecimiento se debe a que las aplicaciones de los bioplásticos se han visto expandidas en los últimos años. Desde envases a componentes de automóviles, juguetes, textiles y componentes electrónicos. En la figura 3.8 se muestra la distribución del consumo de Bioplásticos por sectores. Como se puede observar, uno de los sectores más importantes es el de los envases, con un 37,3% del consumo total.

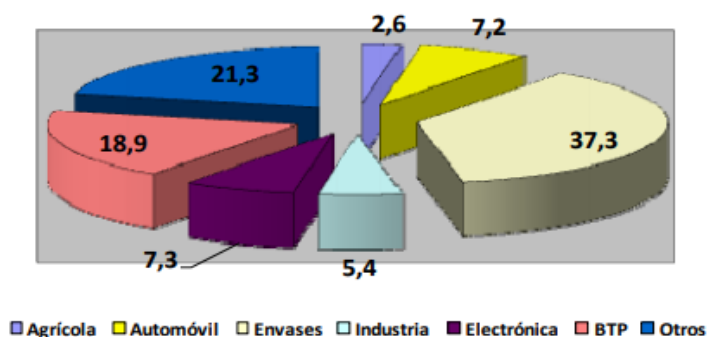
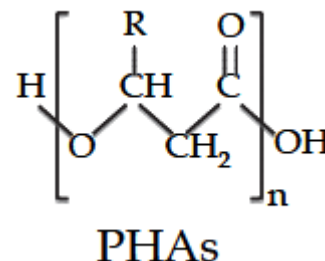


Figura 3.8. Distribución del consumo de BPL por sectores. Fuente: Ecoembes, 2013

3.3 Polihidroxicanoatos (PHA's)

3.3.1 Características y generalidades

Los PHA's o polihidroxicanoatos, son poliésteres alifáticos generalmente compuestos de monómeros de ácido graso β-hidroxi, en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino (Figura 3.9) (Madison y Huisman, 1999). El peso molecular (MM) del PHA, depende de las especies bacterianas utilizadas y las condiciones de cultivo, pero generalmente es del orden de 50 a 1.000 kDa.



Los gránulos de PHAs, fueron observados por primera vez en 1888 por Beijerinck, y la composición de estos mismos, fue descrita por Lemoigne, quien lo clasificó como material desconocido en forma de homopolíester de los ácidos 3-hidroxi-butírico llamado polihidroxi-butirato (PHB).

Figura 3.9. Estructura química básica de los PHAs. Fuente Peña et al., 2011.

La primera vez que se reportó alguna función para los PHAs fue en 1958 por Macrae y Wilkinson, quienes observaron la fácil y rápida degradación de estos biopolímeros producidos por *Bacillus Megaterium* y *Bacillus Cereus* y degradados por los mismos. De aquí en adelante las investigaciones no se han detenido, ya que los científicos y científicas entendieron la importancia que puede representar a futuro la producción a gran escala de estos bioplásticos y su potencial uso a niveles inimaginables.

La superficie del gránulo de PHA dentro de la célula, está rodeada por una membrana compuesta de fosfolípidos y proteínas, principalmente PHAsinas (PhaP), una clase de proteínas capaces de influir en el número y tamaño de gránulos de PHA. En la actualidad, más de 150 ácidos hidroxicanoicos diferentes han sido informados como PHAs, ya sea como homopolíesteres o como copolíesteres (Steinbüchel y Lütke-Eversloh, 2003). Y se han informado que más de 90 géneros de especies microbianas acumulan estos poliésteres.

El compuesto de interés, se puede obtener por centrifugación (extractos exentos de células) o por extracción con disolvente (bacterias intactas secas) con cloroformo, trifluoroetanol, dicloroetano, carbonato de propileno, cloruro de metileno o ácido dicloroacético.

Estos polímeros muy diversos pueden clasificarse según el tamaño de los monómeros que los componen, en tres grupos. Los PHA que contienen monómeros con átomos de C3-C5 se clasifican como PHA de cadena corta (scl-PHA). Algunos ejemplos de scl-PHA son el poli (3-hidroxi-butirato), P (3HB) y poli (4-hidroxi-butirato), P (4HB). Luego, están los PHA de longitud de cadena media, (mcl-PHA) los cuales están compuestos de ácidos grasos C6-C15-hidroxi. Aquí, se incluyen como ejemplos los homopolímeros de poli (3-hidroxi-hexanoato), P (3HHx), polo (3-hidroxi-octanoato), P (3HO) y heteropolímeros como P (3HHx-co-3HO). Y finalmente,

los monómeros de longitud de cadena larga (LCL) incluyen a los que poseen más de 15 átomos de carbono.

3.3.2. Propiedades y usos actuales

Los PHAs, son insolubles en agua, tienen buena resistencia al ataque hidrolítico, son resistentes a los rayos UV. Son biocompatibles y biodegradables y se comportan como materiales piezoeléctricos. Son solubles en cloroformo y otros solventes clorados. Su temperatura de transición vítrea varía de -50 a 4 °C, la temperatura de fusión de 40 a 180 °C. La temperatura de termodegradación, la resistencia a la tracción, el módulo de Young, el vapor de agua y la velocidad de transmisión de oxígeno varían según el tipo de polímero y la composición del monómero (Bugnicourt et al., 2014).

La mayoría de las bacterias sintetizan ya sea scl-PHA o mcl-PHAs (Madison y Huisman, 1999). Los scl-PHA tienen propiedades cercanas a los plásticos convencionales, es decir, propiedades termoplásticas. Mientras que los mcl-PHA se consideran elastómeros y cauchos. En lo que respecta a sus diferentes propiedades térmicas y mecánicas, los scl-PHA se consideran rígidos y quebradizos con un alto grado de cristalinidad (60-80%), mientras que los mcl-PHA son más flexibles con baja cristalinidad (25%), baja resistencia a la tracción y alta elongación, baja temperatura de fusión y temperatura de transición vítrea por debajo de la temperatura ambiente (Anjum et al., 2016).

Si bien los PHA con homopolímeros C4 fueron los primeros en ser apreciados industrialmente y se caracterizan por ser relativamente mejores en comparación con otros PHA, en cuanto a su versatilidad. P (3HB) tiene un alto peso molecular y cristalinidad, con un punto de fusión de 180 ° C y un alargamiento hasta la rotura del 5% (Hahn et al., 1994). Se han usado copolímeros diseñados específicamente para eliminar o reducir la fragilidad y la inestabilidad térmica del polihidroxibutirato. Sin embargo, los PHA de longitud de cadena media y sus copolímeros tienen baja cristalinidad (20-40%) y no se rompen fácilmente (extensión a rotura de 300-450%). Se comportan como elastómeros y su composición puede ser manipulada para una variedad de aplicaciones. La mayoría de los PHA son polímeros parcialmente cristalinos y por lo tanto sus propiedades térmicas y mecánicas usualmente se representan en términos de la temperatura de transición (Tg) o de la temperatura de fusión (Tm). Estos valores se presentan en la siguiente tabla 3.3 para diferentes tipos de PHA, comparados con los plásticos convencionales.

Tabla 3.3 Propiedades físicas de diferentes tipos de PHAs y su comparación con las observadas para plásticos derivados del petróleo. Fuente: Babel y Steinbüchel., 2001

Polimero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
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 %	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
Poliepropileno	170	1,7	34,5	400	45
Polietileno-tereftalato	262	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	-	21
Nylon- 6,6	265	2,8	83	60	-

Algunos de los usos que se ha estudiado que poseen los PHA's son los presentados en la tabla 3.4:

Tabla 3.4. Usos de los polihidroxialcanoatos según sus propiedades. Fuente: Peña et al., 2011.

Usos	Propiedades beneficiosas	Referencia
Bio-plásticos	Termo plasticidad, física y resistencia mecánica/Biodegradable.	Chen, 2009
Ingeniería de tejidos	Termoplasticidad, física y resistencia mecánica/Biocompatible.	Wu et al., 2009 Grage et al., 2009
Suministro de fármacos	Biocompatible / biodegradable	Chen, 2009
Microencapsulación y nanoencapsulación celular	Biocompatible / biodegradable	Grage et al., 2009
Soporte de afinidad	Biocompatible	Lee et al., 2005

Cromatografía de afinidad	Biocompatible	Wang et al., 2008
Biomarcadores /Biosensores	Biocompatible	Grage et al., 2009
Biocombustibles	Biodegradabilidad / Capacidad de esterificación de metilo	Zhang et al., 2007

3.3.3 Biodegradabilidad

El hecho que estos polímeros se biodegraden por completo, los hace totalmente atractivos para su producción y distribución, atacando de raíz la problemática de los plásticos convencionales. Al momento de su degradación se produce agua y dióxido de carbono, por lo que no dejan residuos indeseables en el ambiente, además, se ha estudiado que bajo algunas condiciones se podría producir metano como producto de la biodegradación.

La tasa de biodegradación, se ha estudiado en diversos entornos naturales, en suelo, agua de mar, agua de lago, etc. Y en todos estos, esta tasa se vio influenciada por una serie de factores, tales como la población microbiana del ambiente, la temperatura, la humedad, el pH, el suministro de nitrógeno, oxígeno, carbono, además de depender de las características propias del polímero, tales como la composición, cristalinidad, aditivos y área superficial. Es por ello que la estimación del período de desintegración de un material puede variar notablemente dependiendo del lugar donde se realice el compostaje del mismo.

El PHA, es un polímero sólido con un alto peso molecular, por lo que es incapaz de ser transportado a través de la pared celular. Sin embargo, diversos microorganismos excretan las depolimerasas de PHA extracelulares, que hidrolizan el PHA en oligómeros y monómeros solubles en agua, los cuales posteriormente pueden ser utilizados como nutrientes dentro de las células, produciendo su autodegradación. (Khanna y Srivastava, 2004)

Se realizó un estudio de la biodegradación del PHB en diferentes ambientes, bajo distintas condiciones ambientales durante un año. La degradación más rápida fue a 22°C en una composta, donde se alcanzó el 100% de la degradación después de 10 semanas de incubación. Por otro lado, la degradación más lenta ocurrió cuando el material fue depositado en suelo forestal, llegando a un 11% de degradación después de 1 año. (Itzel et al., 2014)

3.3.4 Biosíntesis

Existe una amplia variedad de monómeros diferentes que conforman los PHAs. Es por esto que la producción de este bioplástico, depende de la naturaleza química del sustrato de carbono utilizado en el medio de cultivo, así como también de las vías metabólicas que posee el microorganismo productor. En variadas etapas del metabolismo, el microorganismo puede generar productos intermedios en forma de hidroxiacil-CoA, que serán reconocidos y polimerizados por la enzima PHA sintasa, enzima clave para la biosíntesis de PHA. La especificidad de la PHA sintasa que posea un microorganismo en particular, es la responsable también de la diversidad existente de los PHAs. (Steinbüchel y Lütke-Eversloh, 2003)

Se puede observar un esquema general para el proceso de formación de PHA por microorganismos, en la figura 3.10. Dependiendo del sustrato que se le entregue al microorganismo es la vía que sigue para producir el monómero de PHA. Existen tres vías biosintéticas bien conocidas. En la vía I, los monómeros de 3HB se generan por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, a partir del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para formar acetoacetil-CoA por la enzima acetotilasa. La acetoacetil-CoA reductasa, actúa sobre la acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxibutiril-CoA. Finalmente, la enzima PHA sintasa actúa sobre esta catalizando la polimerización a través de la esterificación de 3 hidroxibutiril-CoA en poli (3-hidroxibutirato).

En el metabolismo de los ácidos grasos, se generan diferentes monómeros de hidroxialcanoato utilizados en la biosíntesis de PHA. La vía II genera sustratos por oxidación de ácidos grasos, que pueden ser polimerizados por las PHA sintasas de las pseudomonas que pertenecen al grupo I de ribonúcleos de RNA, como *Pseudomonas aeruginosa*. En *A. caviae*, el intermediario de oxidación, trans-2-enoil-CoA se convierte en (R) -hidroxiacil-CoA mediante una enoil-CoA hidratasa específica (R).

La vía III es de gran interés porque ayuda a generar monómeros para la síntesis de PHA a partir de fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas y simples, como la glucosa, la sacarosa y la fructosa. Los intermediarios de (R) -3-hidroxiacilo de la ruta biosintética de ácidos grasos se convierten de su forma de proteína transportadora de acilo (ACP) a la forma de CoA por la enzima acil-ACP-CoA transacilasa (codificada por phaG).

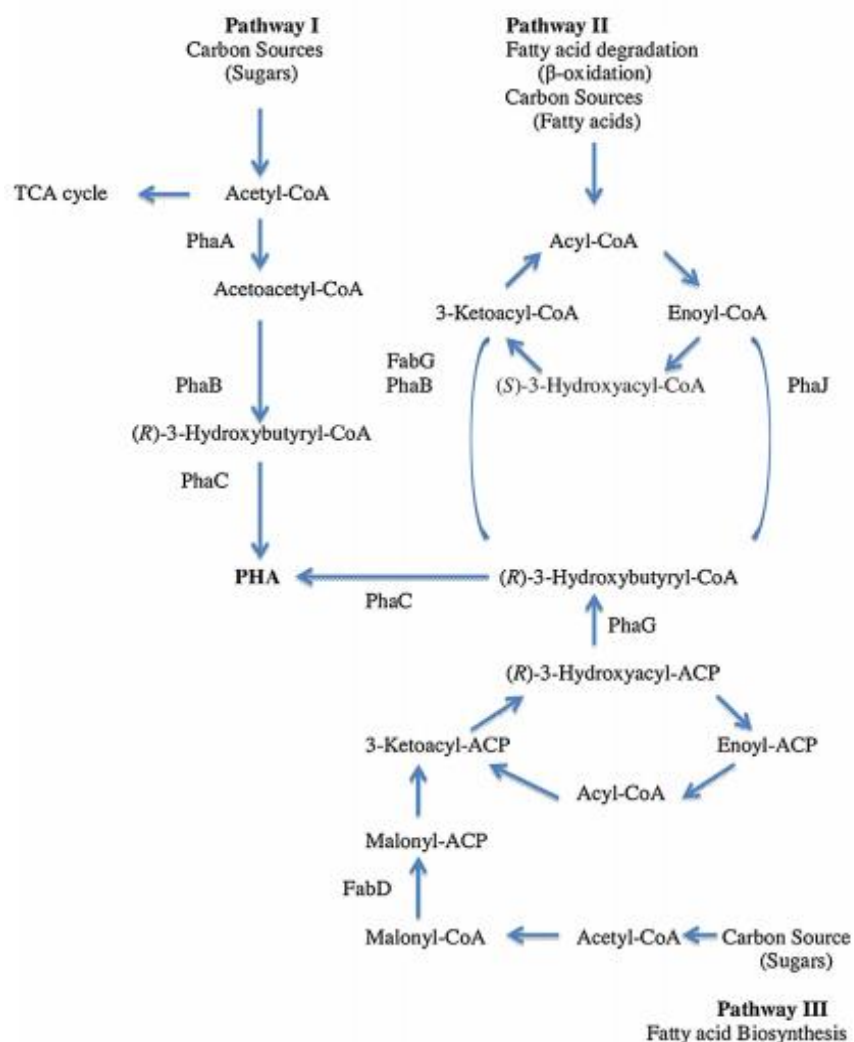


Figura 3.10. Rutas biosintéticas de los polihidroxialcanoatos. Fuente S. Philip et al., 2007.

3.3.5 Microorganismos productores

Tanto microorganismos de tipo procariotas y eucariotas pueden producir diferentes tipos de PHAs. Los PHA también se han notificado en sangre y tejidos, de humanos y animales (Rehm, 2009) y se usan para controlar las convulsiones, las enfermedades metabólicas y aumentar la eficacia cardíaca. Existen más de 300 especies de bacterias, Gram-positivas y Gram-negativas que tienen la capacidad metabólica de biosintetizar los PHA y acumularlos en su citoplasma como fuentes de carbono y energía en forma de gránulos.

Sin embargo, no todos los productores existentes pueden ser considerados como los apropiados para producir este biopolímero de manera industrial, ya que la mayoría posee una capacidad limitada de producción de PHA y muchas veces, insuficiente para ser comercializada y competir con el mercado de los plásticos convencionales. Una excelente producción de PHA está estrechamente relacionada con cepas que posean altas velocidades de crecimiento y producción, la capacidad que tenga la bacteria de utilizar sustratos de bajo costo y la eficiencia que posea para convertir el sustrato en producto. Lo ideal es que la cepa productora tenga la capacidad de acumular al menos el 60% de su masa celular en el polímero.

Las bacterias que se utilizan para la producción de PHAs, se pueden dividir en dos grupos, según las condiciones de cultivo que éstas requieren para la síntesis de este producto. Las primeras, corresponden a bacterias que requieren limitación de algún nutriente esencial (nitrógeno, oxígeno, fósforo, magnesio o azufre), junto con una fuente de carbono en exceso. Es decir, se necesitan condiciones nutricionales desequilibradas de crecimiento para promover la formación de este polímero de almacenamiento de energía. En este grupo se encuentra *Cupriavidus necator* (anteriormente llamada *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* y *Pseudomonas oleovorans*. El segundo grupo de bacterias, incluye a *Alcaligenes latur*, *Azotobacter vinelandii* UWD junto con otras mutantes y *Escherichia coli* recombinantes. Estas últimas, no requieren limitación de nutrientes para la síntesis de PHA y por lo mismo, pueden acumular PHA durante su crecimiento (Khanna y Srivastava, 2004).

3.3.6 Métodos de producción de PHAs

Los polihidroxialcanoatos pueden ser producidos in vitro o in vivo. Esta última categoría se divide, además, en la producción por cultivos de microorganismos y la producción a través de plantas modificadas genéticamente.

3.3.6.1. Producción in vitro

La producción in vitro, se realiza a partir de lactonas, ácidos hidroxialcanóicos o el tioéster sintético 3-hidroxiacetil-CoA empleando enzimas aisladas tales como lipasas, esterasas o algunas proteasas. Este proceso, permitirá la síntesis de nuevos poliésteres, ya que la síntesis de PHAs no estará restringida a la capacidad del metabolismo de un microorganismo en específico. (Steinbuchel & Fuchtenbusch, 1998)

3.3.6.2 Producción in vivo

In vivo se refiere que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo. Para la producción de PHAs se pueden utilizar microorganismos y también plantas.

3.3.6.2.1. Producción por cultivo de microorganismos

Para obtener una alta productividad de PHA, se puede utilizar el cultivo discontinuo o continuo. Cuando se ocupan microorganismos que producen PHA en condiciones de limitación de algún nutriente, comúnmente, se emplea un método de cultivo en dos etapas. Se obtiene una concentración deseada de biomasa sin limitación de nutrientes en el primer paso, y en el segundo paso se limita algún nutriente esencial para permitir la síntesis eficiente de PHA. En la segunda etapa, de limitación de nutrientes, la concentración de células residuales, es decir, la concentración de células totales menos la concentración de PHA, permanece casi constante y la masa celular aumenta sólo debido a la acumulación intracelular de PHA.

Para las bacterias que no necesitan un nutriente limitante para producir PHA, es importante una buena estrategia de alimentación de nutrientes, para obtener un alto rendimiento del bioplástico. Las fuentes de nitrógeno complejas como la peptona de pescado, el extracto de levadura o el licor de macerado de maíz, se pueden utilizar para complementar y de esta forma, mejorar el crecimiento celular y la acumulación del biopolímero (Khanna y Srivastava., 2004). Se han realizado una gran cantidad de estudios utilizando cultivos por lotes o Batch, con distintos microorganismos, distintos medios de cultivo y obteniendo por lo tanto también diversos resultados, algunos de estos se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resumen de estudios que informan la producción de PHA por cultivo batch. Fuente: Gholami A et al., 2016.

Cepa	Tipo de PHA	Medio de cultivo	Contenido de PHA (%)	Productividad (g/kg/h)
<i>Bacillus cereus</i> M5	PHB	Melaza de remolacha (5% p/v)	38,5	0,007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PHB	Licor de caña de azúcar + glutamato + sales	70	0,23
<i>C. necator</i>	PHB	Aceite vegetal + sales + trazas de metales	79-81	0,04-0,05
<i>E. coli</i> recombinante	PHB	Xilosa + hidrolizado de soja	73,9	0,073
<i>Azotobacter vinelandii</i>	PHBV	Liquidos de residuos porcinos diluidos + glucosa + sales + trazas de metales	58,3	0,304
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	PHA con monomeros C4-C14	Sebo + sales+ trazas de melaza	15,1	0,003
<i>C. necator</i>	PHB	Residuos sólidos de soja suplementados con melaza	39,1	0,082

3.3.6.2.2 Producción en plantas modificadas genéticamente

Se ha estudiado también la producción de estos polímeros biodegradables a través de rutas metabólicas en plantas modificadas genéticamente. Las células vegetales producen naturalmente polímeros como almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina, que los humanos utilizamos ampliamente en nuestra vida cotidiana. Esta gama de biomateriales se puede ampliar hasta llegar a la producción de polihidroxialcanoatos mediante la adición de genes, que codifican actividades enzimáticas, las cuales convierten un metabolito vegetal endógeno en esta estructura polimérica novedosa para la planta (Kristi et al., 2015). Los niveles más altos de producción de PHB se han logrado históricamente en plastidios, esto probablemente se debe al alto flujo de carbono a través de la acetil-CoA para biosíntesis de ácidos grasos.

3.3.7 Producción y desarrollo actual de los PHAs en la industria

De todos los polihidroxialcanoatos que se conocen en la actualidad, sólo el homopolímero de PHB y los copolímeros P(3HB-co-3HV) y P(3HB-co-3HHx) se han producido a nivel industrial en la actualidad (Dias et al., 2006). A continuación, se presentan algunas de las compañías productoras de PHA, sus ubicaciones y los productos principales, muchos de estos se encuentran aún en etapa de investigación y desarrollo, o en escala piloto (Tabla 3.6)

Tabla 3.6. Empresas que producen polihidroxialcanoatos. Fuente: Koller et al., 2017.

Compañía	País	Materia prima	PHAs	Marca	Escala/ Producción [ton/año]
TianAn	PR China	Azúcar de Maíz	PHBHV	Enmat	100-1.000
Telles	Usa	Azúcar de Maíz	PHBHV y otros	Mirel / Mvera	50.000
Kaneka	Japón	Aceites Vegetales	P(3HB-3HHx)	Kaneka	Piloto
Tianjin Green B & DSM	PR China	Azúcares a base de almidón	P(3HB-co-4HB)	Green Bio	10.000
PHB Industrial	Brasil	Caña de Azúcar	P(3HB) PHBHV	Biocycle	100 ton (capacidad de 5.000)
Biomer	Alemania	Glucosa y almidón de maíz	PHB	Biomer	500-1.000
Bio-on	Italia	Azúcar y subproductos de la azúcar	n.r	Minerv-PHA	10.000 (estimado)
Biomatera	Canadá	Azúcar (sin especificar)	P(3HB-co-3HV)	Biomatera	R&D, Piloto
Metabolix (Monsanto)	Estados Unidos	Carbohidratos	PHBHV	-	n.r
Tepha	Estados Unidos	Azúcar	PH4B, P(3HB-co-4HB), mcl-PHA	Tepha-FLEX	n.r
Tianzhu	China	n.r	P(3HB-co-HHx)	Tianzhu	R&D, Piloto

La producción industrial de PHA contiene 3 etapas principales: el cultivo, donde se produce biomasa y se acumula el bioplástico, la recuperación, en esta etapa se cosechan las células y se extrae el PHA y, finalmente, el procesamiento que contempla la purificación y empaque del producto. En la figura 3.11 se muestra un esquema de este proceso.

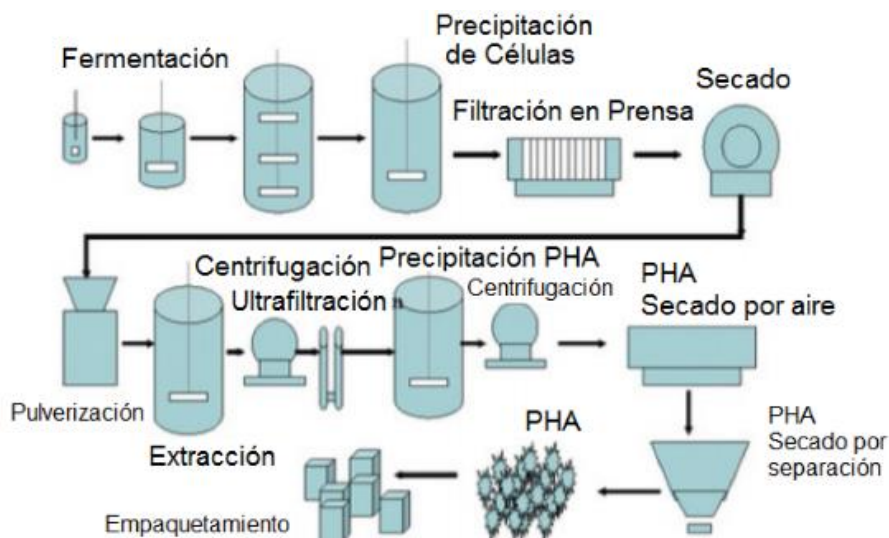


Figura 3.11. Diagrama de flujo de la producción industrial de PHAs. Fuente: Anjum et al., 2016.

Para que la producción industrial sea sostenible, se deben considerar 4 aspectos principalmente: aspectos económicos, éticos, ambientales y de ingeniería. Estos cuatro están estrechamente relacionados, sin embargo, el aspecto económico es primordial, ya que se busca lograr un precio capaz de competir en la industria de los plásticos ya popularizada. Este aspecto se ve influenciado principalmente por el modo de producción aplicado, la materia prima que se utilice como sustrato y el proceso de recuperación y extracción del PHA. La principal desventaja que poseen estos productos en comparación con los plásticos convencionales, es su alto precio de producción. Es por esto, que un punto importante a estudiar y mejorar, es la disminución de los costos de producción de estos polímeros biodegradables, para hacerlos competitivos en el mercado de los plásticos a nivel mundial.

3.4 Polihidroxibutirato (PHB)

3.4.1. Características y generalidades

El PHA más abundante y que se ha estudiado más ampliamente, corresponde al poli 3-hidroxibutirato, conocido más simplemente como PHB o P (3HB) (Figura 3.12). Éste, puede obtenerse dentro de un amplio rango de masas moleculares que fluctúan desde 200 hasta 20.000 KDa. Este polímero es el que mayor uso y potencial tiene entre los bioplásticos conocidos, teniendo un amplio campo de aplicaciones. Esto se debe principalmente a que posee propiedades mecánicas similares a las de los plásticos convencionales, como el polipropileno o el polietileno, aunque es altamente cristalino y rígido, lo que provoca fragilidad y baja elongación al romperse (Khanna y Srivastava., 2004), sin embargo, se puede producir mediante estrategias biotecnológicas que permitan el control de su composición química y por lo tanto también de sus propiedades fisicoquímicas.

P (3HB) es un polímero semicristalino, que se caracteriza por una cristalización polimórfica que puede cristalizar en dos formas, α y β . La forma α , consiste en cristales lamelares, siendo la conformación más común para cristales de P (3HB) (Kabe et al., 2012), por otro lado, la forma β está caracterizada como una conformación de zigzag plana que se ha informado en películas y fibras con alta resistencia a la tracción. Debe enfatizarse que el proceso de cristalización afecta las propiedades térmicas y mecánicas, así como la biodegradabilidad de los biopolímeros (Pan e Inoue., 2009).

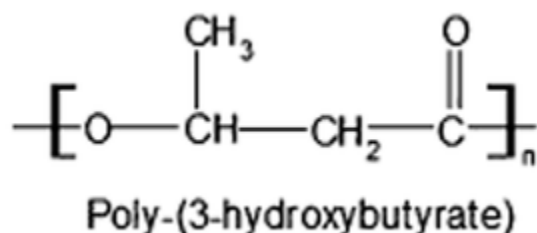


Figura 3.12. Estructura química del P (3HB) Fuente: Castillo et al., 2014.

3.4.2 Propiedades y aplicaciones

Las propiedades termoplásticas y de cristalización de P (3HB) son altamente dependientes de su masa molecular. La masa molecular (MM) del P (3HB) determina el comportamiento elástico del material y su resistencia mecánica (Iwata, 2005). Los poli- (3-hidroxibutiratos) de masas moleculares bajas ($<1 \times 10^3$ kDa), se caracterizan por su fragilidad y una degradación térmica temprana, cerca de su temperatura de fusión (superior a 180°C). Este comportamiento se ha explicado como resultado de su cristalización de forma α ; sin embargo, el aumento de la masa molecular de P (3HB) mejora las propiedades mecánicas de las películas y las fibras, promoviendo la cristalización de la forma β (Kabe et al., 2012). En esta línea, utilizando P (3HB) de ultra alto peso molecular (UHMW; $M_w = 5.3 \times 10^3$ kDa), Iwata

(2005), informó que la resistencia a la tracción del polímero podría ser manipulada de 38 a 1320 MPa. Este último valor (1320 MPa) es mayor que la resistencia a la tracción notificada para polietileno, polipropileno, alcohol polivinílico y ácido poliglicólico, plásticos ampliamente utilizados a nivel industrial.

Debido a sus propiedades similares al polipropileno y polietileno, el principal uso que se le ha dado a este compuesto es de sustituto de estos mismos elementos. Otros ejemplos de aplicaciones son el uso del PHB como soporte para el crecimiento de células epiteliales y como recubrimiento de semillas para mejorar la germinación (González et al., 2013).

Más recientemente, y en base a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, se han propuesto nuevas aplicaciones atractivas para P (3HB) en los campos médico y farmacéutico, donde la composición química y la pureza del producto son críticas (Williams y Martin., 2005). En el campo médico, P (3HB) se ha utilizado en la construcción de órganos artificiales, la administración de fármacos, la reparación de tejidos y en usos nutricionales/terapéuticos (Chen y Wang., 2013).

En todas estas aplicaciones, la masa molecular de P (3HB) es una característica muy importante a considerar, ya que esto determina las propiedades mecánicas del polímero y a su vez, las aplicaciones finales que éste puede tener. Desde un punto de vista biotecnológico, la manipulación de la masa molecular del P (3HB) mediante el uso de nuevas cepas y la manipulación de las condiciones de cultivo, parece ser un método conveniente que podría mejorar considerablemente las propiedades de P (3HB), expandiendo las aplicaciones potenciales de este polímero, especialmente en el campo médico.

3.4.3 Biosíntesis, catabolismo y regulación del PHB

La ruta biosintética para generar P (3HB) (Figura 3.13), comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. La enzima que cataliza esta reacción es la 3-cetotiolasa, codificada por el gen *phbA*. Posteriormente, una acetoacetil-CoA reductasa (gen *phbB*) codifica la acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA usando NADPH. Finalmente, la enzima PHA sintasa (codificada por *phbC*) polimeriza los monómeros 3-hidroxibutiril-CoA a P(3HB), liberando CoA.

En algunas especies, los genes biosintéticos P (3HB) *phbA*, *phbB* y *phbC* están agrupados y se organizan presumiblemente en un operón *phbCAB*; aunque este orden de genes varía de una especie a otra, y los genes también pueden estar desvinculados. Se han clonado y secuenciado más de 60 genes de la PHA sintasa (*phbC* o *phaC*) de las eubacterias, y muchos más han sido revelados en los genomas bacterianos secuenciados (Steinbüchel y Lütke-Eversloh, 2003).

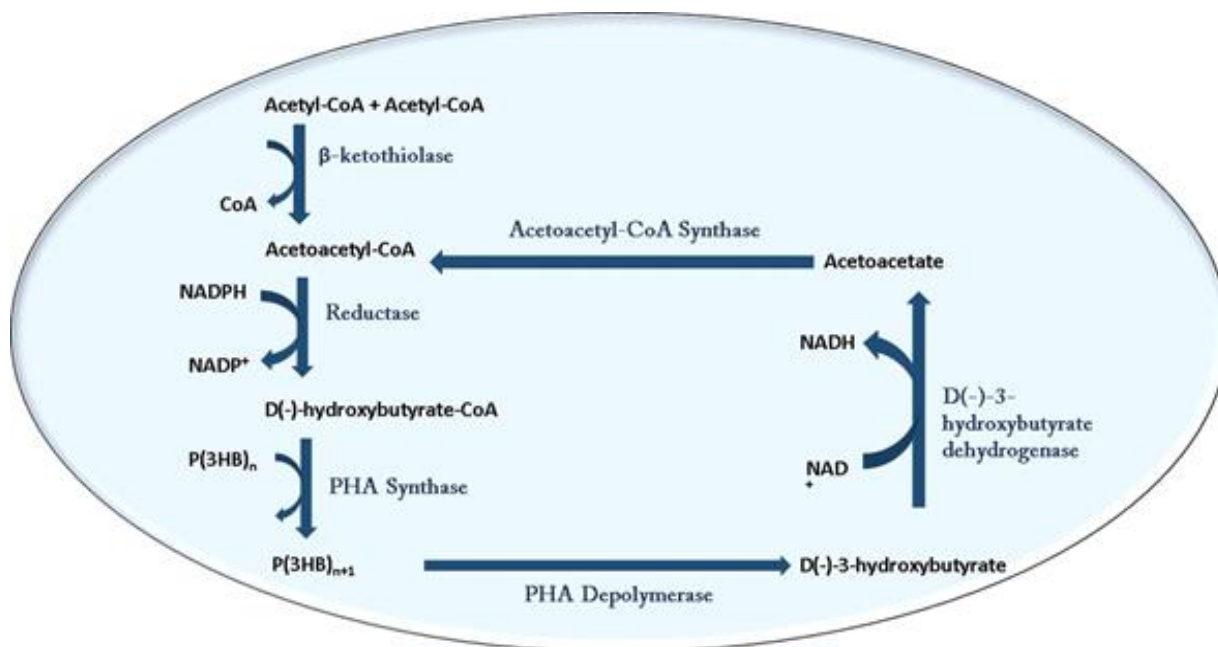


Figura 3.13. Esquema de la ruta biosintética de la producción de PHB y su posterior degradación.
Fuente: Albuquerque y Malafaia., 2017

3.4.4. Microorganismos sintetizadores de PHB

La capacidad de sintetizar y acumular P(3HB) y otros PHA como material de reserva de carbono y energía está muy extendida entre los procariotas. Se ha informado que más de 300 especies, principalmente de bacterias, producen estos polímeros. Sin embargo, no se ha demostrado que todos estos microorganismos acumulen suficiente P(3HB) como para la producción a gran escala. Entre las bacterias que pueden acumular grandes cantidades de PHA se encuentran *C. necator* (anteriormente conocido como *Ralstonia eutropha* o *Alcaligenes eutrophus*), *Azohydromonas lata* (también conocido como *Alcaligenes latus*), *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Paracoccus denitrificans*, *Methylobacterium extorquens*, *Bacillus spp.*, *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* recombinante, que expresan los genes biosintéticos P(3HB) de *C. necator*, *A. lata* o *A. vinelandii*.

La Figura 3.14 muestra las células de *A. vinelandii* con gránulos de P (3HB). A partir de los microorganismos mencionados, las especies más exitosas para la producción a escala piloto o en gran escala son *C. necator*, *A. lata* y *E. coli* recombinante, pudiendo acumular hasta un 80% del polímero a partir de un peso final de células secas de hasta 200, 60 y 150 (g/L) respectivamente (Chen, 2009).

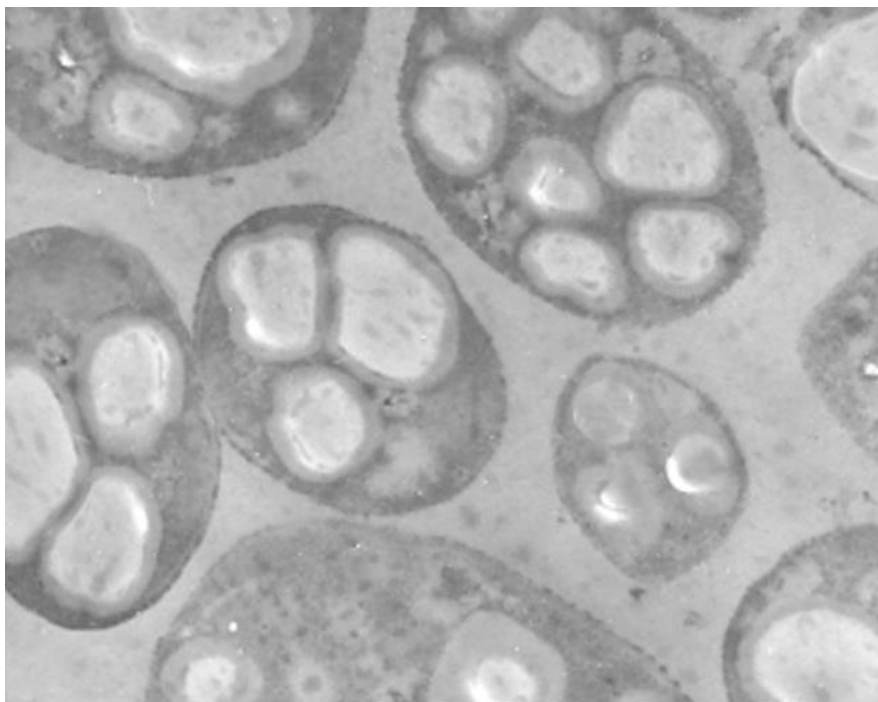


Figura 3.14. Micrografía electrónica de transmisión de una sección delgada de *A. vinelandii* que contiene gránulos de P (3HB) (inclusiones blancas). Fuente: Castillo et al., 2014.

3.5 *Azotobacter vinelandii*, una bacteria productora de PHB

3.5.1 Biología de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii, es una bacteria quimioorganotrófica, utiliza azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Son fijadores de nitrógeno, para esto requieren molibdeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Utilizan nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es de 4,8-8,5 y para crecer cuando fijan nitrógeno, el pH óptimo es de 7,0-7,5 (Espín, 2003).

Esta bacteria ha sido y es objeto de variados estudios, debido principalmente a las siguientes capacidades metabólicas y genéticas que posee:

1. Fija nitrógeno en presencia de oxígeno por tres sistemas diferentes de nitrogenasa.
2. Posee mecanismos de protección de la nitrogenasa.
3. Posee una alta capacidad respiratoria, hasta 10 veces más que la de *Escherichia coli* en condiciones diazotroficas (de fijación de nitrógeno).
4. Produce dos polímeros de uso industrial: Alginato, un polisacárido extracelular, y PHB, un poliéster intracelular.
5. Sufre un proceso de diferenciación morfológica el cual consiste en formar quistes resistentes a la desecación.

3.5.2 Fijación de nitrógeno

La fijación del nitrógeno molecular o reducción de N_2 a NH_4 , se lleva a cabo gracias al complejo enzimático conocido como nitrogenasa, el cual lo tienen sólo algunos procariotas. Éste, está formado por dos proteínas: una que contiene hierro (Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (MoFe). Esta enzima se controla por una serie de factores, los más destacados son el oxígeno y las fuentes de nitrógeno unido químicamente (Postgate, 1982)

La fijación biológica de nitrógeno, ocurre según la siguiente reacción:



El amoníaco producido por esta reacción, se ioniza rápidamente a amonio dentro de la bacteria.

Para cumplir su función, la nitrogenasa requiere no sólo la ausencia o niveles muy bajos de nitrógeno unido, sino también la reducción de equivalentes, así como también la energía proporcionada por la disimilación de una fuente apropiada de carbono orgánico (Büler et al., 1987). Esto último, debido a que la fijación de nitrógeno requiere 8 electrones, es decir un mínimo de 16 ATPs para reducir una molécula de N_2 atmosférico. Además la reducción de esta molécula está siempre acoplada a la reducción de H^+ a H_2 . Bajo condiciones fisiológicas normales el requerimiento de ATP es de 20 a 30 moléculas de MgATP, esto quiere decir que la

fijación de nitrógeno consume una fracción significativa de la poza celular de ATP. Este ATP necesario, lo provee la respiración aeróbica, por lo tanto, la fijación de nitrógeno aeróbica requiere una concentración mínima de O_2 .

Por otro lado, existe una paradoja en el funcionamiento de la enzima nitrogenasa, y es que esta enzima, es inactivada rápida e irreversiblemente por el O_2 . Las proteínas Fe y MoFe poseen una vida media en presencia de aire de 45 segundos y 10 minutos respectivamente (Robson y Postgate., 1980). El efecto deterreo del oxígeno sobre la nitrogenasa, restringe la fijación de nitrógeno en la mayoría de eubacterias a condiciones anaeróbicas o de microaerobiosis. Sin embargo, las bacterias aeróbicas fijadoras de nitrógeno han evolucionado una variedad de estrategias para superar esta limitación biológica paradójica, y proteger la nitrogenasa.

3.5.3 Protección de la nitrogenasa, sistema respiratorio y efectos de la razón carbono/nitrógeno.

Sólo se conocen dos bacterias en la actualidad, capaces de fijar nitrógeno en condiciones de total aerobiosis: *Azotobacter vinelandii* y *Streptomyces thermoautotrophicus*. (Pool y Hill., 1997). En el caso de *Azotobacter*, esta puede fijar nitrógeno en dichas condiciones debido a que posee un sistema bien integrado de protección de su nitrogenasa. Posee una protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos que le permiten crecer diazotroficamente tolerante al O_2 .

- Protección conformacional: Se conoce como protección conformacional, a un complejo de nitrogenasa inactivado pero protegido, el cual se forma debido a un aumento pasajero del oxígeno en *A. vinelandii*, provocando la aparición de dicho mecanismo de inactivación de la nitrogenasa.
- Protección respiratoria: Ocurre que cuando las células se adaptan al ambiente de mayor concentración de oxígeno, se expresa la citocromo oxidasa cytb_d, parcialmente desacoplada con baja afinidad por O_2 , la cual probablemente actúa en conjunto a una NADH deshidrogenasa desacoplada. El flujo de electrones a través de esta cadena desacoplada, es lo que permite que la bacteria tenga tasas de respiración altas y un rápido consumo del oxígeno intracelular, sin agotar las pozas de ATP y NADH.
- Autoprotección: Este proceso está altamente relacionado con el anterior. Cuando la concentración de la nitrogenasa es mucho más alta en comparación con la de O_2 celular, la nitrogenasa reductasa puede reducir O_2 a H_2O_2 y posiblemente a H_2O , reduciendo de esta forma el O_2 en las cercanías de la nitrogenasa. Este proceso, requiere grandes cantidades de equivalentes reductores y ATP, los cuales son provistos por la rama cytb de la cadena respiratoria.

Oelze (2000), afirma que la relación C/N controla tanto el consumo de O_2 celular, como la actividad y formación del sistema respiratorio de *Azotobacter vinelandii*. Este término, hace referencia a la relación con la que el organismo consume sustrato (es decir, la fuente de carbono, equivalentes reductores y ATP) por fuente de nitrógeno compuesto. Esto se debe a que se ha observado que la tasa de consumo de O_2 aumenta significativamente con el aumento

de la relación C/N. Cuando existe una razón C/N muy alta, el consumo de oxígeno se aproxima a la constancia, pero esta última depende de la concentración de oxígeno ambiental.

Se ha observado también que cuando el suministro de oxígeno es muy bajo, el excedente de la fuente de carbono que no es utilizado, puede ser consumido y almacenado como PHB (Buhler, 1987). Todo esto con el objetivo de mantener una relación interna carbono/nitrógeno en un nivel que satisfaga los requisitos de la formación de biomasa. La relación C/N está relacionada por lo tanto con actividades como la respiración celular, la formación de biomasa y del material de almacenamiento PHB.

Por lo tanto, es necesario tener una razón C/N mínima para producir el crecimiento de las bacterias y un C/N máximo para aumentar la respiración y actividad de la célula, donde se puede producir un máximo de PHB.

3.5.4 Función biológica del PHB

La principal función del PHB dentro de la célula, es la de ser un material de reserva de carbono y energía, el cual puede ser utilizado en periodos que exista limitación de nutrientes en el medio, esto, debido a que este polímero almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula.

Otra función que se le atribuye al PHB en *A. vinelandii*, está relacionada con la fijación biológica de nitrógeno, específicamente con la protección de la nitrogenasa. Ya que se propone que el PHB permite la protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono exógena, al proveer a la célula una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, permitiendo mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno, contribuyendo de esta forma a la protección de la nitrogenasa (Segura y Espín, 1998).

También, otro papel del PHB, es el de regulador de equivalentes de reducción intracelulares. Esto, debido a que cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno, como la requerida para la fijación de nitrógeno y existe una concentración alta de carbono, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. Estos metabolitos, en *Azotobacter vinelandii*, inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs (Senior et al., 1973), es en estas condiciones donde se sintetiza el PHB. Por lo tanto, se ha propuesto que la síntesis de este polímero permite regular la concentración de los reductores, ya que almacena electrones durante su síntesis previniendo la generación de una concentración alta de NAD(P)H, permitiendo el funcionamiento de vías metabólicas oxidativas, aun a concentraciones bajas de nitrógeno.

3.5.5 Síntesis de PHB

La síntesis de poli-(3-hidroxibutirato) en esta bacteria está regulada por el sistema fosfotransferasa relacionado con el nitrógeno (PTSNtr), donde la forma no fosforilada de la proteína IANtr regula negativamente la expresión del operón biosintético P (3HB) (Segura y Espín, 1998).

Se informaron tres ejemplos de modificaciones genéticas que favorecen la síntesis de P (3HB) mediante la modificación del metabolismo de la cepa productora en *A. vinelandii*.

- Page y Cornish (1993) descubrieron una cepa (UWD), la cual tiene una mutación en la NADH oxidasa respiratoria y utiliza la síntesis de PHB como sumidero de electrones alternativo para reciclar NAD, esto dio como resultado la capacidad de acumular P(3HB) durante la fase exponencial sin la necesidad de limitación de nutrientes.
- El segundo ejemplo se encuentra en la inactivación de piruvato carboxilasa, la enzima anaplerótica (del ciclo de Krebs) que cataliza la carboxilación de piruvato dependiente de ATP, para generar oxaloacetato que repone el ciclo de TCA (Segura y Espín, 2004). Esta mutación aumentó tres veces la producción específica de P (3HB) ($g_{PHB}/g_{proteína}$), en contraste con la cepa de tipo salvaje *A. vinelandii* UW136, probablemente como resultado de una disminución del flujo de acetil-CoA en el ciclo de TCA, dejándolo disponible para la síntesis P (3HB).
- Por último, también existe la cepa *Azotobacter vinelandii* OP. Esta, posee una mutación natural en el gen *algU*, que codifica para el factor σE , el cual está involucrado en la síntesis de alginato, bloqueando la síntesis de este mismo (Gaona et al, 2004).

Otro sistema que regula la síntesis de P (3HB) en *A. vinelandii* es el sistema regulador postranscripcional RsmZ / YA, donde la proteína RsmA reprime la traducción de los ARNm del operón biosintético *phbBAC* y de *phbR* que codifica su activador transcripcional (Hernández-Eligio et al., 2012) En cada caso, se identificaron los reguladores negativos IANtr y RsmA.

Para tener cepas superproductoras de P (3HB) de *A. vinelandii* OP, el gen que codifica el IANtr (*ptsN*) se inactivó. Esta mutación aumentó un 77% la producción específica de P (3HB), equivalente a 4.1 g_L⁻¹ de PHB (3.5 g_L⁻¹ en el caso del tipo silvestre), con un 36% más de rendimiento de producto basado en el sustrato consumido (Peña et al., 2014). Esta cepa se conoce como OPN.

Posteriormente, se construyó un mutante donde se inactivaron ambos reguladores negativos (IANtr y RsmA) (Figura 3.15), aumentando aún más la capacidad de acumulación de P (3HB) de *A. vinelandii*. Esta estrategia, junto con la implementación de una estrategia de cultivo permitió producir 27 g *L*⁻¹ de P (3HB) (García et al., 2013). Esta cepa tiene el nombre de OPNA.

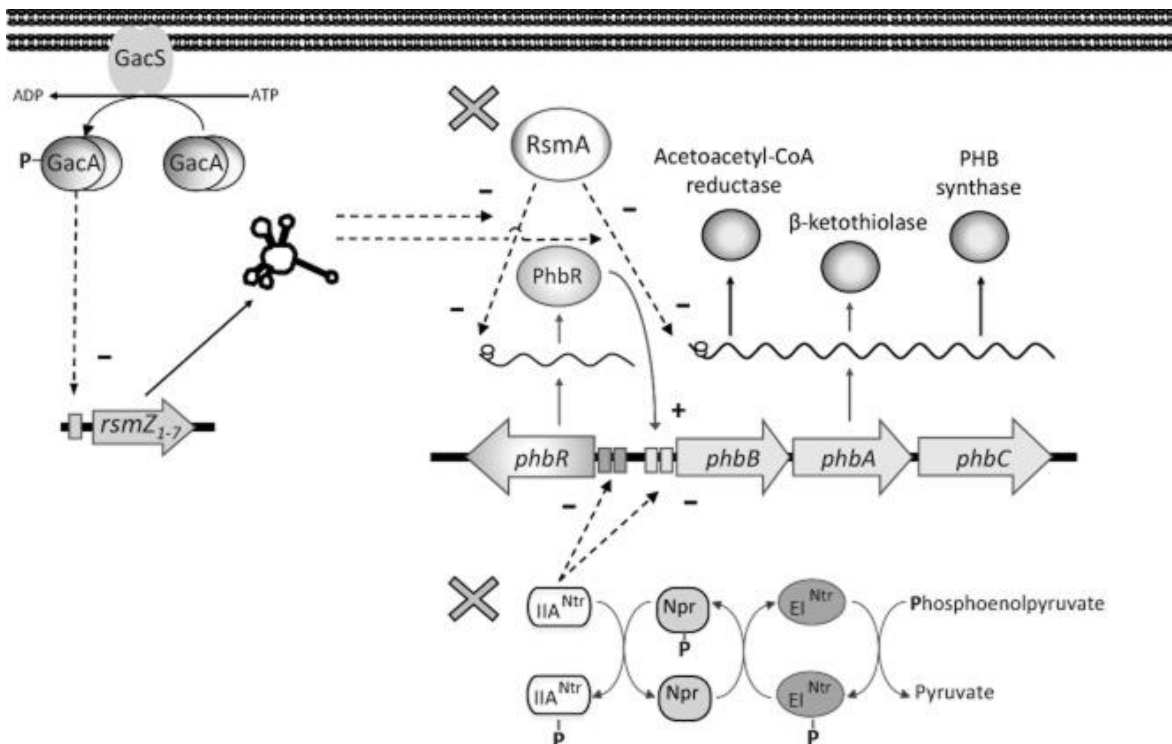


Figura 3.15. Modelo de los sistemas reguladores que controlan la expresión de los genes *phb* en *A. vinelandii*. (+) indica regulación positiva; (-) indica regulación negativa. Los promotores están indicados como rectángulos. Los reguladores inactivados en las cepas. Fuente: Hernández-Eligio et al., 2012

Por otro lado, la regulación a nivel metabólico de este polímero, ya que es un material de almacenamiento, se puede considerar como un ciclo de síntesis y descomposición. En la figura 3.16 se muestra este ciclo, con las respectivas enzimas que actúan en él. Una enzima reguladora clave es la acetil-CoA aciltransferasa, la cual es inhibida por altas concentraciones de coenzima A. En condiciones de limitación de nutrientes pero exceso de carbono, la acumulación de NADH inhibe la citrato sintasa y los niveles de acetil-CoA se elevan hasta el punto en que se supera la inhibición y se hace posible la condensación de estas moléculas y se sintetiza PHB.

La degradación del polímero se controla mediante la oxidación de 3-hidroxibutirato monomérico por la enzima 3-hidroxibutirato deshidrogenasa. Esta enzima está sujeta a la inhibición por producto, por el acetoacetato y NADH. Estos elementos reguladores principales del ciclo se complementan con un segundo nivel de control: los intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico causan la inhibición por retroalimentación de las enzimas. En condiciones de exceso de carbono (energía), los niveles de NADH inhiben tanto la despolimerización de PHB como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Los niveles reducidos resultantes de CoA libre significan que la acetil-CoA aciltransferasa puede catalizar la condensación de acetil CoA a acetoacetyl CoA, y que se puede sintetizar PHB. En deficiencia de energía (carbono), el control se invierte. De este modo, la síntesis y la degradación de los PHB están vinculadas al estado metabólico de la célula y al flujo de carbono a través del metabolismo intermedio.

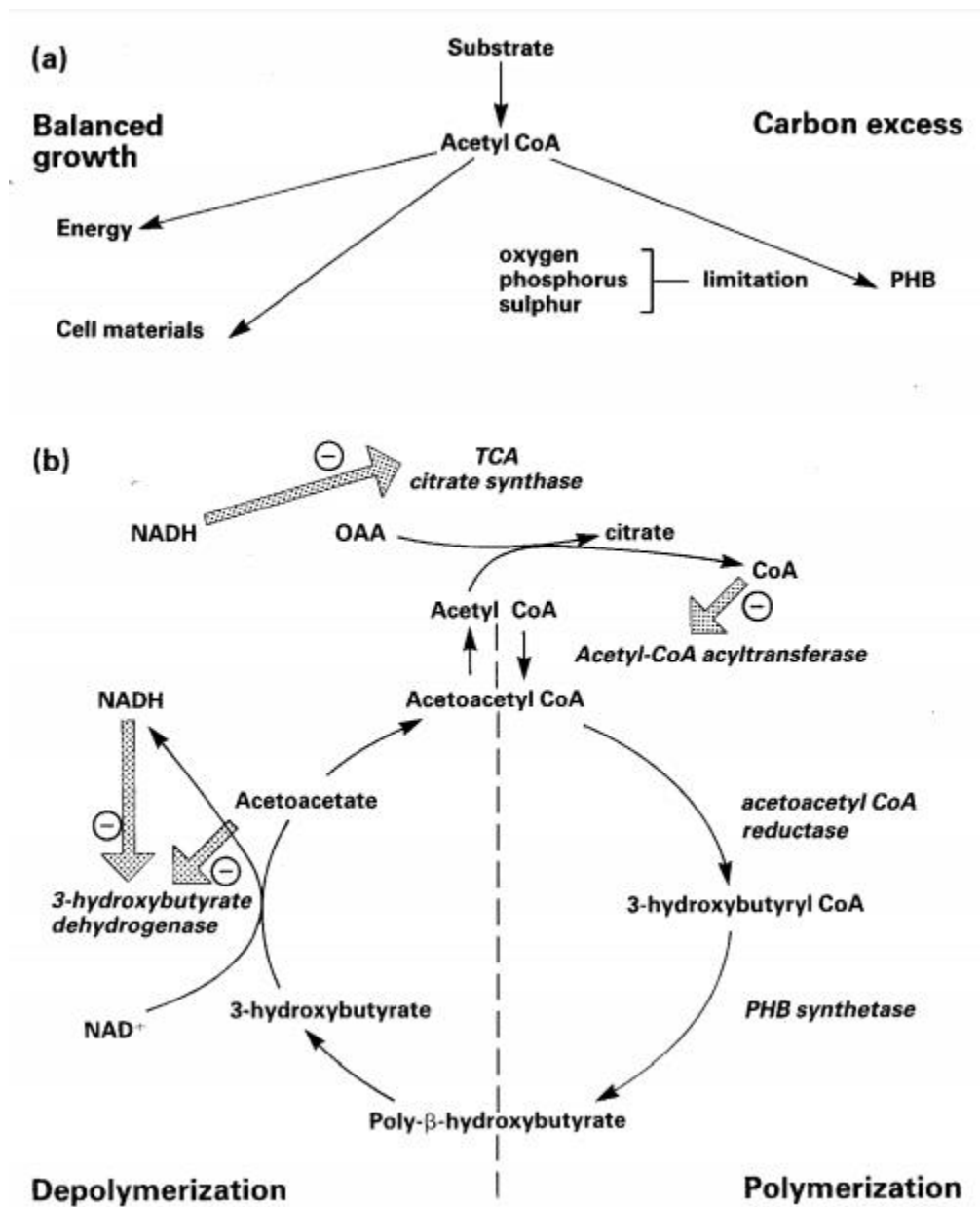


Figura 3.16. (a) Productos de la acetil-CoA en condiciones de crecimiento equilibrado y exceso de carbono. (b) Biosíntesis y descomposición del PHB. Fuente: Byrom, 1987.

3.6 Estudios de producción de PHB

Solo unas pocas especies de bacterias que producen P(3HB) se han utilizado a escala industrial para producir este polímero. Estos incluyen *C. necator*, *A. lata* y *E. coli* recombinante (Khanna y Srivastava., 2004). Sin embargo, se sabe también que bacterias como *A. vinelandii* y *A. chroococcum* pueden acumular un alto contenido de P (3HB), lo que las hace buenas candidatas para usarse en la síntesis de este polímero a gran escala.

La Tabla 3.7 muestra los resultados más recientes informados acerca de la concentración máxima y la productividad de P (3HB) alcanzado, utilizando diferentes microorganismos y sistemas de lote alimentado. A partir de estos estudios, se destacan los casos de producción de P (3HB) que utilizan *Bacillus megaterium*, *C. necator*, *E. coli* recombinante y *Azotobacter*. Por ejemplo, Kulpreecha y colegas (2009) informaron una producción elevada de P (3HB) llegando a los 30,5 [g/L] y una productividad de P (3HB) de 1,27 [g/L h], en un cultivo de lote alimentado de *B. megaterium* BA- 019, utilizando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono.

Tabla 3.7. Resumen de los experimentos realizados más recientemente, que poseen potencial para replicar a gran escala. Fuente: Castillo et al., 2014.

Microorganismo	Estrategia de alimentación	Concen- tración Biomasa [g/L]	Concen- tración PHB [g/L]	Produc- tividad PHB [g/L*h]	Conte- nido de PHB (%)	Referencia
<i>B. megabacterium</i> BA-019	pH-stat	72,6	30,5	1,27	42	Kulpreecha et al, 2009
	Intermitente	90,7	41,6	1,73	46	Kanjanachu mpol et al 2013
<i>C. necátor</i>	Pulsos	75	53	0,92	71	Tanadchang saeng and Yu 2012
	Pulsos	83	67,2	2,5	81	Pradella et al 2012
	Pulsos	82,5	51,2	1,52	62	Cavalheiro et al, 2009
	Exponencial + acoplado a monitoreo de adición de álcali + constante con limitación de N ₂	164	125	2,03	76,2	Mozumder et al 2014
<i>E. coli</i>	pH-stat	119,5	96,2	2,57	80	Ahn et al 2000
<i>A. vinelandii</i>	Exponencial + pulsos	37,2	27,3	0,5	73,3	Garcia et al 2014

3.6.1 Estudios utilizando *Azotobacter vinelandii*

Durante varias décadas, la síntesis de P (3HB) por cepas de *Azotobacter*, ha sido objeto de estudios, ya sea por sistema de lotes, continuos (Senior y Dawes, 1973) o cultivos en lotes alimentados (García et al., 2013). Sin embargo, la información relacionada con los sistemas de cultivo ha sido escasa en los últimos años. Por otro lado, por lo que se sabe, ninguno de estos procesos ha sido adoptado para la producción industrial de P (3HB).

Peña, Ramirez y Compañeros (2012), evaluaron la producción y el peso molecular del polihidroxibutirato sintetizado por diversas cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. Se utilizaron las cepas OP, OPN, OPA y OPNA, a nivel de matraces, en condiciones de baja aireación y con acetato de amonio como fuente de nitrógeno. La mutante OPN mostró una mayor acumulación de PHB (80,6%) y una mayor productividad (0,04 g/L/h) que la cepa parental OP (37,7 % acumulación y 0,029 g/L/h de productividad). También, el PM del bioplástico generado por la cepa OPN fue 45% mayor al observado por la mutante OP. Además, aunque no se esperaba, en este estudio, la cepa OPNA no acumuló PHB, se cree que tiene que ver con una relación negativa entre el acetato de amonio y el metabolismo de la cepa.

3.6.1.1 Variando las condiciones nutricionales de cultivo

Willian J Page y Knosp (1992), realizaron estudios de producción de PHB con la cepa de *A. vinelandii* UWD, utilizando como fuentes de carbono, azúcares, tales como: glucosa, melaza de caña, jarabe de maíz y extracto de malta, en cultivos donde se les añadió fuentes complejas de nitrógeno. En este estudio, se obtuvo una mejora significativa en el rendimiento de producción de PHB con todas las fuentes de nitrógeno complejas probadas. Los mayores efectos se obtuvieron con 0,05-0,2% de peptona de pescado (FP), proteosa peptona n°3 y extracto de levadura. Este estudio fue realizado debido a que, en años anteriores, en otros estudios con esta misma cepa de bacteria, se llegó a la conclusión de que los muchos compuestos presentes en los medios de cultivo utilizados para la producción de PHB en *Azotobacter vinelandii*, parecía más probable que los compuestos nitrogenados orgánicos pudieran ser responsables del efecto promotor del rendimiento de PHB (Page 1990).

Más recientemente, se ha informado una estrategia mixta de cultivo, la cual está basada en cultivos de lotes alimentados exponencialmente junto con pulsos de nutrientes de sacarosa y extracto de levadura, para lograr una concentración superior de PHB por *Azotobacter vinelandii* OPNA. En este experimento, se alcanzó una concentración máxima de P (3HB) de 27,5 g/L a las 60 horas de cultivo utilizando la cepa OPNA. Anteriormente, en este mismo estudio se monitoreó el crecimiento tanto de la cepa OPNA como de su cepa parental OP, en matraces agitados que contenían un medio de sacarosa enriquecido con peptona y extracto de levadura. Aquí se obtuvo un mejor desempeño de la cepa OPNA (mayor crecimiento de biomasa, producción de PHB y velocidad de crecimiento específico), es por esto que se estudiaron distintas estrategias de cultivo con esta cepa en particular. (García et al., 2013)

Así mismo, utilizando la cepa *Azotobacter vinelandii* OPNA, se analizó la incidencia que tiene sobre el crecimiento del cultivo y la producción de PHB, la razón Carbono/Nitrógeno. Se utilizaron 3 razones C/N distintas, de 10, 18 y 60. Como resultados se obtuvo que la razón C/N 60 afectó el crecimiento del cultivo, como reflejo de la limitación de nitrógeno, con las otras dos razones no hubo mayores diferencias de crecimiento y ambas fueron mayores que la anterior nombrada. También, se obtuvo un mayor MMM del PHB cuando se trabajó con una C/N de 18, y el menor fue cuando se trabajó con C/N 10 (Barreto et al., 2015).

Castillo y compañeros, también estudiaron la influencia de la relación C/N en cepas *Azotobacter vinelandii* OPNA, utilizando distintas estrategias de alimentación en cultivos de tipo lote. En este estudio se encontró que la cepa OPNA puede acumular hasta un 80% de su peso en PHB y más, en función de la relación C/N inicial, logrando un mayor peso molecular a una mayor relación C/N (18), independientemente de la estrategia de cultivo utilizada (lote, un pulso de alimentación o dos pulsos de alimentación. Sin embargo, utilizando la estrategia de dos pulsos de alimentación en un cultivo tipo lote, se obtuvo la producción más alta de PHB, con una concentración de $27,6 [g L^{-1}]$ y una productividad volumétrica de $0,56 [g L^{-1} h^{-1}]$ con una razón C/N inicial de 18. (Castillo et al., 2017)

3.6.1.2 Variando las condiciones operacionales de cultivo

Castillo y compañeros (2013), estudiaron la influencia de la aireación del cultivo de la cepa salvaje *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046, en matraces agitados. Se tienen dos condiciones: de alta y de baja aireación. La alta aireación obtuvo una velocidad específica de crecimiento de casi el doble que la condición de baja aireación ($0,17$ v/s $0,08 (h^{-1})$). Sin embargo, fue en la condición de baja aireación donde se generó mayor biomasa y se obtuvo una mayor producción de polímeros, tanto PHB como Alginato. Es más, en la condición de alta aireación no se produjo nada de PHB, esto se debe básicamente a que las bacterias se encontraban fijando nitrógeno, lo cual a una condición de alta aireación produce como consecuencia un mayor gasto energético para proteger la nitrogenasa del efecto negativo del oxígeno (Castillo et al., 2013).

Utilizando mutantes OPN y OP, Peña y colegas (2014) analizaron la influencia de la condición de aireación en el peso molecular de PHB producido. Acá, se observó un MM máximo de $2,02 \times 10^3$ kDa para el P (3HB) de la mutante OPN en condiciones de baja aireación a las 60 h de cultivo, con un porcentaje de acumulación del 67%. Estas condiciones se replicaron con la cepa parental OP, sin embargo, se obtuvo un polímero con la mitad del peso molecular (MM de $1,01$ kDa) y un 62% de acumulación. Al aumentar la aireación de los cultivos, aumentó también la velocidad específica de crecimiento y la producción específica de PHB en gramos de PHB sobre gramos de proteína, en ambas cepas, sin embargo, el peso molecular se vio afectado negativamente por esta variable. (Peña et al., 2014).

Díaz-Barrera y colegas (2016), trabajaron con dos cepas de *Azotobacter vinelandii*, y analizaron su comportamiento a diferentes tasas de agitación. Fue utilizada la cepa tipo salvaje de *A. vinelandii* y la cepa OP mutante. Se observó que la cepa OP mostraba una menor

OTR (tasa de transferencia de oxígeno), lo que quiere decir que posee una menor necesidad de oxígeno para su crecimiento. Por otro lado, disminuyendo la OTR se observó un máximo de PHB acumulado del 79% en peso seco en los cultivos con la cepa salvaje, mientras que la mayor productividad de PHB ($0,18 [g L^{-1}h^{-1}]$) se obtuvo en cultivos de la mutante OP a 600 [rpm].

3.6.2 Con otros microorganismos

3.6.2.1 Variando las condiciones nutricionales de cultivo

Utilizando *B. Megatherium* BA-019, Kanjanachumpol y compañeros (2013), observaron que un aumento adicional de la concentración de azúcar total inicial más allá de 60 g/L no promovió el crecimiento de biomasa ni la producción de PHB. Además, condujo a una mayor fase de latencia. En este mismo estudio, se encontró que la mayor concentración de biomasa por peso seco y de PHB se obtenía cuando la relación de carbono/nitrógeno (C/N) era más baja. La más baja probada fue de 12,5:1, con ésta, se obtuvo la mayor concentración de PHB, con una alta producción de peso seco, 90,7 [g/L] de biomasa con un 45,84% (p/p) de contenido de P (3HB) y una productividad de 1,73 [g/L h], mientras que el azúcar total y la urea permanecieron bajas en el caldo de cultivo. El usar razones C/N más altas, dio como resultado una producción de biomasa similar pero una producción de PHB más baja. Esto aparentemente se debió a que la fuente de nitrógeno en exceso, condujo el flujo de carbono en la solución de alimentación, a la biosíntesis de peso seco en lugar del almacenamiento de PHB que usualmente ocurre en el exceso de flujo de carbono (Kanjanachumpol et al., 2013).

Utilizando también la bacteria *Methylobacterium* sp ZP24, se realizaron cultivos de lotes alimentados usando condiciones limitantes de oxígeno disuelto, con suero de queso procesado como fuente de carbono y suplementado con sulfato de amonio, se logró obtener una concentración total de 4,5 g/L de P (3HB). (Nath et al., 2008)

Wang y Yu (2001) informaron que la masa molecular media (MMM) de PHB, producida por *C. necátor*, podría ser alterada por la composición del medio, bajo condiciones químicamente definidas y usando ácido acético como fuente de carbono. Estos autores, evaluaron la relación C/N en el MMM. La mayor MMM del polímero ($8,2 \times 10^2$ kDa) se obtuvo a una relación C/N de 4, la menor estudiada, con un porcentaje del 50% de acumulación.

Los mismos autores, evaluaron en un reactor de 2 litros, el efecto de la relación C/N inicial y la relación en peso de carbono/fosfatos (C/P) en el MM del PHB. En este estudio, se informó que el polímero alcanzó valores más altos de MMM ($2,5 \times 10^3$ kDa) para una relación C/N de 20 y un MM de $2,0 \times 10^3$ kDa cuando la relación C/P era 8; sin embargo, bajo tales condiciones de crecimiento, la acumulación de P (3HB) fue inferior al 30%. Además, estos autores observaron que el MM disminuyó hasta 20 y 3 veces hasta que las relaciones C/N o C/P disminuyeron a 6 y 0,8, respectivamente (Penloglou y colegas., 2012b)

3.7 Sustratos utilizados en la producción de PHB

La composición de los PHA producidos por diferentes cepas bacterianas, varía según el tipo de fuente de carbono que éstas tengan disponibles. Dicha propiedad, se debe a las características fisiológicas y bioquímicas del microorganismo para la síntesis bioquímica, así como también a las condiciones de producción adoptadas. (Volova 2004).

Estos bioplásticos, aunque poseen claras ventajas sobre los plásticos producidos a partir de la industria petroquímica, no poseen un precio competitivo en la actualidad con respecto a los plásticos convencionales. Teniendo estos valores de costo, 5 o 10 veces más altos que los que poseen los ya popularizados en la población. Este, es el principal inconveniente para la producción a gran escala de este producto (Khanna y Srivastana., 2004). Los principales factores que afectan el costo de producción del PHB y de los PHA en general, incluyen el tipo de fuente de carbono o materia prima, el costo del cultivo, la productividad del proceso, los rendimientos de las fuentes de carbono seleccionadas y el procesamiento posterior, la recuperación del polímero. De estos factores, el más influyente, con un 50% de incidencia, corresponde al costo de obtención de la materia prima (Klim, 2000). Es por esto que es de gran interés a nivel mundial, la investigación de formas de reducir este costo. Esto se hace sobre todo prefiriendo la utilización de sustratos de bajo costo, como residuos o materiales de desecho como fuentes de carbono.

Se pueden utilizar una gran cantidad de sustratos para la producción de PHB. Toda la biomasa existente que contenga carbono y que sea renovable, está disponible para ser utilizada como materia prima de este proceso. Además, muchos desechos y subproductos de industrias agrícolas y lácteas, como la melaza, el suero de queso, los aceites vegetales y la fábrica de papel, se han considerado como posibles sustratos de carbono para la producción de PHB (Nath et al., 2008).

Los valores de rendimiento para biomasa celular y PHB pueden determinarse por experimento o por cálculo derivado de las rutas metabólicas correspondientes. Esto da una estimación del costo del sustrato por tonelada de PHB producido (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Precios de sustratos, rendimientos de PHB y costos de sustratos para la producción de PHB. Fuente: Byrom, 1987.

Sustrato	Precio aproximado [lb ton ⁻¹]	Rendimientos de la fuente de carbono en PHB [ton _{PHB} /ton _s]	Costo sustrato por tonelada producida de PHB [lb ton ⁻¹]
Metanol	90	0,18	504
Sacarosa	200	0,33	600
Glucosa (mercado mundial)	200	0,33	600
Glucosa (EEC)	360	0,33	1080
Etanol	440	0,5	880
Ácido acético	370	0,33	1220

Sin embargo, el costo básico del sustrato no es la única consideración que se debe sopesar para elegir una combinación sustrato-microorganismo. De la tabla 3.7, pareciera ser que el metanol es el más atractivo, pero la cantidad de PHB acumulada por los metilótrofos fue sólo moderada. Lo que significa que se debe procesar más biomasa por tonelada de producto, además, existieron grandes dificultades en la extracción del polímero y el peso molecular fue bajo, restringiendo de esta forma su aplicación como materia prima (Byrom ,1987).

El uso de glucosa como material de alimentación de cultivo no es para nada económico (King, 1982). El etanol da buenos rendimientos, pero es más caro que los carbohidratos, al igual que ácido acético. La Tabla 3.9 resume las diferentes fuentes de carbono utilizadas para la producción de P (3HB). Afortunadamente, la mayoría de los productores de P (3HB) pueden metabolizar una amplia gama de materias primas.

Tabla 3.9. Comparación de la producción volumétrica de P (3HB), el contenido y los rendimientos utilizando diferentes fuentes de carbono (n.i: no informado) Fuente: Castillo et al., 2014

Micro Organismo	Fuente de carbono	Cantidad de fuente de carbono utilizada (g)	Concen tración Biomasa (g/L)	Concen tración PHB (g/L)	Contenido de PHB (%)	Rendimi ento de PHB $\frac{g_{PHB}}{g_{sustrato}}$	Referencia
<i>A. Lata</i>	Sacarosa	72,9	10,78	5,25	48	n.i	Zafar et al., 2012a
<i>C. necátor</i>	Glucosa	523	164	125	76,2	0,22	Mozumder et al., 2014
	Residuos de glicerol	n.i	104,7	65,6	62,7	0,52	Mozumder et al., 2014
	Residuos de glicerol	170,8	76,2	38,1	50	0,34	Cavalheiro et al., 2009
	Glicerol puro	249	82,5	51,2	62	0,36	Cavalheiro et al., 2009
<i>A.Chorococc um H23</i>	Alpechin /Acetato	30/0,03	7,36	6,10	82,9	n.i	Pozo et al., 2002
	Almidón	200	54	25	46	n.i	Kim, 2000
<i>E. coli recombinant e GCSC 6576</i>	Suero	340	31	25	80	n.i	Klim, 2000

En esta investigación, se utilizó orujo de uva como fuente de carbono para la producción de PHB en la cepa *Azotobacter vinelandii* OP. Este compuesto, corresponde a un residuo de la industria vitivinícola, una industria altamente desarrollada en nuestro país. El hecho de ocupar un residuo, disminuye drásticamente los costos de obtención de la materia prima además de ayudar en la gestión de aprovechamiento de los desechos, revalorizando un compuesto y generando valor agregado para la industria del vino. El hecho de utilizar y

hacerse cargo de los residuos generados en dicha industria, aporta con la preservación de los ecosistemas y el medio ambiente en general. Esta opción, corresponde a un gran aporte en la investigación de nuevas formas más económicas para producir este bioplástico, que generado de manera industrial, puede ser utilizado como un sustituto de los plásticos convencionales que son los mayores contaminantes ambientales de nuestra época.

3.7.1 Orujo de uva como sustrato

Las uvas, son una de las frutas más cultivadas en todo el mundo, un tercio de la producción total de este producto es utilizado en la vinificación. Según datos presentados por la Organización Internacional de la Uva y el Vino (OIV) en junio del 2017, la superficie vitícola mundial estaría sobre los 7,5 millones de hectáreas, considerando la superficie de uvas destinadas a vinificación, uva de mesa y uvas pasas (Figura 3.17). En el proceso de producción del vino, ya sea tinto o blanco, se generan grandes cantidades de desechos sólidos orgánicos. Entre estos se encuentra el orujo de uva (restos de uva prensada), lías (precipitados durante el cultivo y maduración) y vinazas (aguas de lavado), los cuales requieren de una correcta administración como desechos, ya que aunque estos residuos no tienen un carácter extremadamente peligroso, pueden provocar impactos ambientales si su gestión no es correcta, como un aumento de la DBO, presencia de sólidos en suspensión y sales disueltas, eutrofización, variación del pH, etc. La gestión de estos residuos es difícil debido principalmente a que son generados en grandes cantidades y en periodos de tiempo cortos. (Castells, 2012)

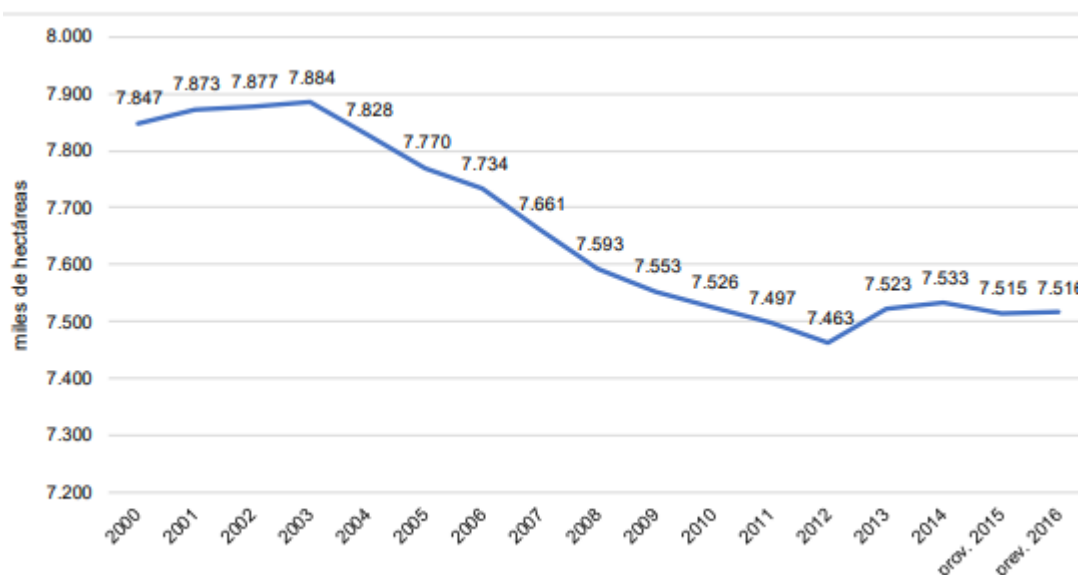


Figura 3.17. Superficie vitícola mundial en miles de hectáreas. Fuente: Oficina de estudios y políticas agrarias (2018) elaborado con información de la OIV.

El orujo de uva, representa aproximadamente el 10-30% de la masa de uvas trituradas, y corresponde a pulpa, hollejos, pepitas y escobajo, los cuales contienen azúcares no

fermentados, alcohol, polifenoles, taninos, pigmentos y otros productos valiosos. (Muhlack et al., 2017). Existe una diferencia fundamental en el orujo de uva generado por vinos blancos y vinos tintos, debido a que el proceso de elaboración de estos es distinto. En el caso de los vinos blancos, la fermentación del mosto se realiza tras la separación de los orujos. Por el contrario, en la preparación de vinos tinto, el orujo se obtiene después de la fermentación y el prensado. Este hecho es de gran interés, ya que el orujo de vino blanco no fermentado, contiene una mayor cantidad de azúcares residuales, que pueden ser utilizadas para la producción de PHB a partir del cultivo con bacterias.

La concentración de azúcares residuales y alcohol en el orujo, varía mucho según la fuente de la fruta, los procesos, las prácticas y logística involucrada durante la trituration de la uva y la vinificación. También variará la calidad y cantidad de orujo de uva producido en función del tamaño de la bodega y los métodos utilizados durante la vinificación. Las diferentes escalas de operación, la naturaleza variable de las uvas y el equipo utilizado para el prensado, contribuyen a la variedad de datos sobre la generación de orujo de uva por tonelada de fruta triturada. En el caso de los azúcares residuales, un informe técnico (Hixson et al., 2014) reveló que el orujo blanco fresco tenía hasta un 38% (basado en el peso seco, DW) de glucosa y fructosa.

Dentro de la variedad de vinos blancos que se pueden producir, se destaca la cepa Chardonnay, hecha con uvas del mismo nombre. Esta es la variedad más consumida por los norteamericanos y la cepa blanca con mayor cantidad de hectáreas plantadas en el mundo. Esta variedad como casi todas las tradicionales proviene de Francia, específicamente del pueblo de Chardonnay ubicado en Borgoña. Sin embargo, actualmente está presente en todos los países productores de vinos; siendo la cepa blanca más esparcida por el mundo, destacando por su adaptabilidad a diferentes suelos, climas y manejo agrícola. Combinada con Pinot Noir y Pinot Meunier, el Chardonnay es la uva madre para hacer el elegante Champagne en Francia y también la inspiración para los vinos espumosos del mundo. (Barber, 2016)

3.7.1.1 Industria del vino en Chile

A nivel mundial, Chile es reconocido por la calidad y la alta producción de sus vinos. Según el catastro vitivinícola del servicio agrícola y ganadero (SAG) del año 2015, se visualiza un crecimiento constante de la superficie vitícola nacional, presentando una tasa anual de crecimiento del 2% en el periodo comprendido entre los años 2000 y 2015. La mayor superficie vitícola nacional se encuentra en las regiones del Maule (53.839 hectáreas) y del Libertador Bernardo O'Higgins (46.414 hectáreas), acumulando el 70,6% de la superficie total. Le siguen las regiones del Bío Bío y Metropolitana, con superficies cercanas al 10% y Valparaíso con 7% de la superficie (Oficina de estudios y políticas agrarias, 2018)

Del total de superficie nacional utilizado para la industria vitivinícola, la cantidad destinada a las principales cepas se muestra a continuación (Figura 3.18):

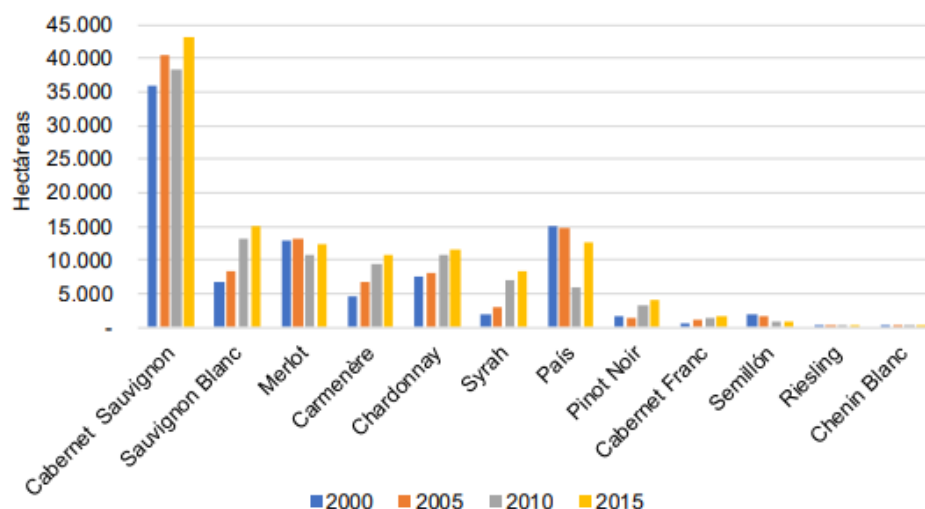


Figura 3.18. Evolución de la superficie nacional de vides viníferas por cepa en hectáreas: Fuente Oficina de estudios y políticas agrarias (2018) elaborado con información del SAG.

El año 2017, según el SAG, se produjo un total de 949 millones de litros de vino. De estos, 74,3 millones de litros corresponden a la cepa Chardonnay, utilizada para esta investigación. Por otro lado, el año 2008, fue detectada por primera vez una plaga originaria de europa, llamada polilla racimo de la vid o Lobesia botrana. Actualmente esta plaga se encuentra presente desde la región de Atacama hasta la región de lo Lagos (Instituto de investigaciones agropecuarias, 2017). Con el fin de proteger y mejorar la condición fito y zoo sanitaria de los recursos silvoagropecuarios del país, fue necesario tomar medidas sobre esta plaga. Medidas de control que incluyen la destrucción de la fruta remanente y en el caso de la industria vitivinícola, de los subproductos del proceso tales como el orujo de uva sin procesar. Esta destrucción, se entiende como quemar, enterrar u otra forma aprobada por el servicio agrícola ganadero (División protección agrícola SAG, 2008).

3.7.2 Resultados de la producción de PHB, en *Azotobacter vinelandii* OP utilizando orujo de uva como sustrato

Recientemente, Avendaño (2018) realizó un estudio sobre la producción de PHB en *Azotobacter vinelandii* OP, utilizando orujo de uva como sustrato. En este trabajo, se estudió la producción de dicho bio-plástico utilizando fuentes convencionales (sacarosa), mosto y orujo de uva, en matraces y en un reactor de 3 [litros]. Aquí, se encontró que el utilizar orujo de uva (subproducto del proceso del vino) o mosto (jugo de uva que se convierte en vino), llevaba a obtener resultados similares utilizando matraces de 250 [ml]. Además, la utilización de estos medios complejos, mostró un aumento de la velocidad específica de crecimiento del cultivo (Tabla 3.10). Por otro lado, se observó también, que el aumento de la escala de experimentación utilizada, usando mosto, disminuyó el crecimiento bacteriano, la concentración de PHB obtenida y su acumulación en la célula. (Tabla 3.11)

Tabla 3.10. Resultados obtenidos en la experimentación a nivel de matraces con *Azotobacter vinelandii* OP, a diferentes fuentes de carbono. Fuente: Avendaño, 2018

Fuente de carbono	Concentración biomasa [$g\ L^{-1}$]	Velocidad específica de crecimiento [h^{-1}]	Concentración de PHB [$g\ L^{-1}$]	Rendimiento del PHB [$g_{PHB}/g_{sustrato}$]	Acumulación PHB [%]
Sacarosa	5,5	0,063	4,2	0,21	86
Sacarosa + Extracto de levadura	6,0	0,080	4,6	0,24	82
Mosto	7,6	0,108	4,7	0,18	85
Orujo de uva	7,6	0,087	4,8	0,21	75

Tabla 3.11. Comparación de dos escalas en la producción de PHB con *Azotobacter vinelandii* OP utilizando mosto como fuente de carbono. Fuente: Avendaño, 2018

Escala	Concentración biomasa [$g\ L^{-1}$]	Concentración de PHB [$g\ L^{-1}$]	Acumulación PHB [%]
Matraces	7,6	4,7	85
Reactor	3,9	2,3	59

4. Materiales y Métodos

A continuación se presenta la metodología utilizada durante esta investigación. En primer lugar se presenta el microorganismo utilizado, su activación y conservación. Posteriormente se exponen los medios de cultivo utilizados, tanto como para los inóculos y para la fermentación en sí misma. Se muestra la preparación del inóculo, y el biorreactor utilizado junto con las condiciones de operación usadas y las variables que se midieron y cuantificaron.

4.1 Microorganismo utilizado

La bacteria utilizada en esta investigación es la cepa *Azotobacter Vinelandii* OP, cepa ATCC 13705, la cual es incapaz de sintetizar alginato, produciendo por lo tanto sólo PHB. Este microorganismo fue facilitado por la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

4.1.1 Conservación

La cepa fue crio-conservada en una solución de glicerol al 30% *v/v*. Para realizar esto, fue necesario utilizar tubos crioviales estériles de 2 [ml]. En primer lugar se hace crecer la cepa en un medio de cultivo líquido durante 16 a 20 horas. Transcurrido este tiempo, se toma una alícuota del cultivo de 700 [μ L] y se le añaden 300 [μ L] de glicerol. Esta mezcla se almacena a -80°C para ser conservadas a lo largo del tiempo, para esto se utilizó un congelador marca Haier biomedical TCL disponible en el laboratorio de Microbiología de la UTFSM Casa Central. Y para almacenar bacterias de su uso más inmediato, se utilizó un congelador Consul CVV27 a -20°C disponible en el laboratorio de Bioprocesos de la UTFSM Casa Central donde fue realizada la mayor parte de esta experimentación.

4.1.2 Activación

Para activar el microorganismo, se realizaron cultivos mensuales de la cepa contenida en los criogénicos en placas Petri que contenían medio Burk (sacarosa y otras sales), extracto de levadura y agar. Estas placas fueron cultivadas con 300 [μ L] del criogénico a 30°C por 72 horas, en una incubadora Stuart Cientec SI5000 (Figura 4.1), para posteriormente ser mantenidas en un refrigerador a 4°C .

4.2 Medios utilizados

Se utilizaron tres medios durante esta experimentación. El medio sintético o burk, el medio sintético con fuente de nitrógeno externa y el medio obtenido a partir del orujo de uva. A continuación, se detallan sus composiciones.

4.2.1 Medio sintético o Burk

El medio Burk o medio sintético fue utilizado para la preparación de los inóculos líquidos, contiene la siguiente composición observada en la Tabla 4.1. Este medio es un medio líquido, y para esta configuración, la fuente de nitrógeno es directamente el contenido que existe en el aire.

Tabla 4.1. Composición y concentraciones del medio de cultivo sintético. Fuente: Díaz-Barrera et al., 2016

Componente	Concentración [$g\ L^{-1}$]
Sacarosa	20
K_2HPO_4	0,66
KH_2PO_4	0,16
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,056
$NaCl$	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,0029
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,027

Se realizaron tres soluciones distintas con estos componentes, debido a que deben esterilizarse por separado, para evitar la precipitación de los componentes. Estas soluciones se realizaron con agua destilada y se autoclavaron por 20 minutos en un Autoclave marca AMILAB modelo mx-80. Su composición se detalla a continuación:

1. Sacarosa + K_2HPO_4 + KH_2PO_4
2. Solución de sulfato de calcio: $CaSO_4 \cdot 2H_2O$
3. Solución de sales inorgánicas: $NaCl$ + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

4.2.2 Medio sintético o Burk con fuente de nitrógeno

Este medio de cultivo es el mismo nombrado en el apartado anterior, pero fue utilizado para el cultivo de la bacteria en placas petri, previo al cultivo en los inóculos líquidos, por lo tanto, debe ser sólido, y debe contener una fuente de nitrógeno. Para su preparación se utiliza la misma base del medio de cultivo sintético nombrado anteriormente (Tabla 4.1), pero se agregan además 3 [$g\ L^{-1}$] de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 18 [$g\ L^{-1}$] de agar para solidificar.

4.2.3 Medio complejo de orujo de uva

Este, es el medio utilizado para el cultivo del microorganismo. Para la preparación de este medio de cultivo, se utilizó el orujo de uva de la cepa Chardonnay facilitada por una viña ubicada en el Valle de Casa Blanca en la quinta región de Chile (Figura 4.1), la cual fue sometida a un tratamiento antes de ser utilizada para la experimentación (Figura 4.2).



Figura 4.1. Orujo de uva de la cepa Chardonnay utilizadas para la experimentación. Fuente: Elaboración propia

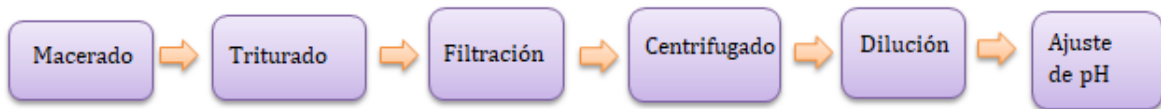


Figura 4.2. Proceso de elaboración del medio de cultivo de orujo de uva para la experimentación. Fuente: Elaboración propia

- **Macerado:** Se adicionó agua destilada en razón 1:1 para diluir el azúcar del orujo y facilitar el triturado.
- **Triturado:** La mezcla anterior, fue triturada con una licuadora marca Ursus Trotter S.A. modelo: Urmin-8210.
- **Filtración:** Se filtra la mezcla en un principio con un colador de malla y posteriormente con una gasa estéril, con el fin de separar residuos sólidos como piel y semillas.
- **Centrifugado:** Para complementar y afinar el procedimiento anterior, se centrifuga por 15 minutos a 5000 $[rpm]$ para separar la borra y obtener un líquido clarificado, utilizando una centrifuga marca Thermo Scientific modelo SL 16R.
- **Dilución:** Se ajustó la cantidad aproximada de azúcares disueltos en el líquido generado en el punto anterior, agregando agua destilada con el fin de disminuir los grados brix de la solución, utilizando un refractómetro digital (Hanna Instruments, modelo HI 96811) hasta llegar a un valor de 5.0 a 5.3 ° brix.
- **Ajuste de pH:** Se realizó un ajuste de pH previo a la esterilización del medio final utilizado en el cultivo de la bacteria, para generar el ambiente más propicio para que el microorganismo pueda crecer y reproducirse.

4.3. Preparación del inóculo

Para todos los cultivos realizados, se utilizó el mismo procedimiento para generar el inóculo necesario. Para esto, primero se utilizan las placas petri con el medio sintético con fuente de nitrógeno, expuesto en el punto 4.1.2. Se realiza una siembra por extensión con 300 [μL] del cultivo criogenizado, y se incuba a 30°C por 72 horas en la incubadora (Stuart, modelo SI600 Large). Estas placas con el microorganismo deseado, se utilizan para crear el inóculo necesario para los cultivos. Para esto, se realizó una siembra desde las placas a matraces Erlenmeyer de 500 [mL] con 100 [mL] del medio sintético líquido, nombrado en el punto 4.1.2. Estos, se cultivaron en un agitador incubador orbital (MRC, modelo TOU-120-2) a 30°C y 200 [rpm]. Después de 18 horas, se midió la turbidez para comprobar el crecimiento celular de la población, utilizando una curva de calibración hecha previamente, expuesta en el anexo 9.1.1 se debe comprobar que el crecimiento de la población sea mayor a 1 [g/L] para poder inocular. El esquema general se muestra en la figura 4.3.

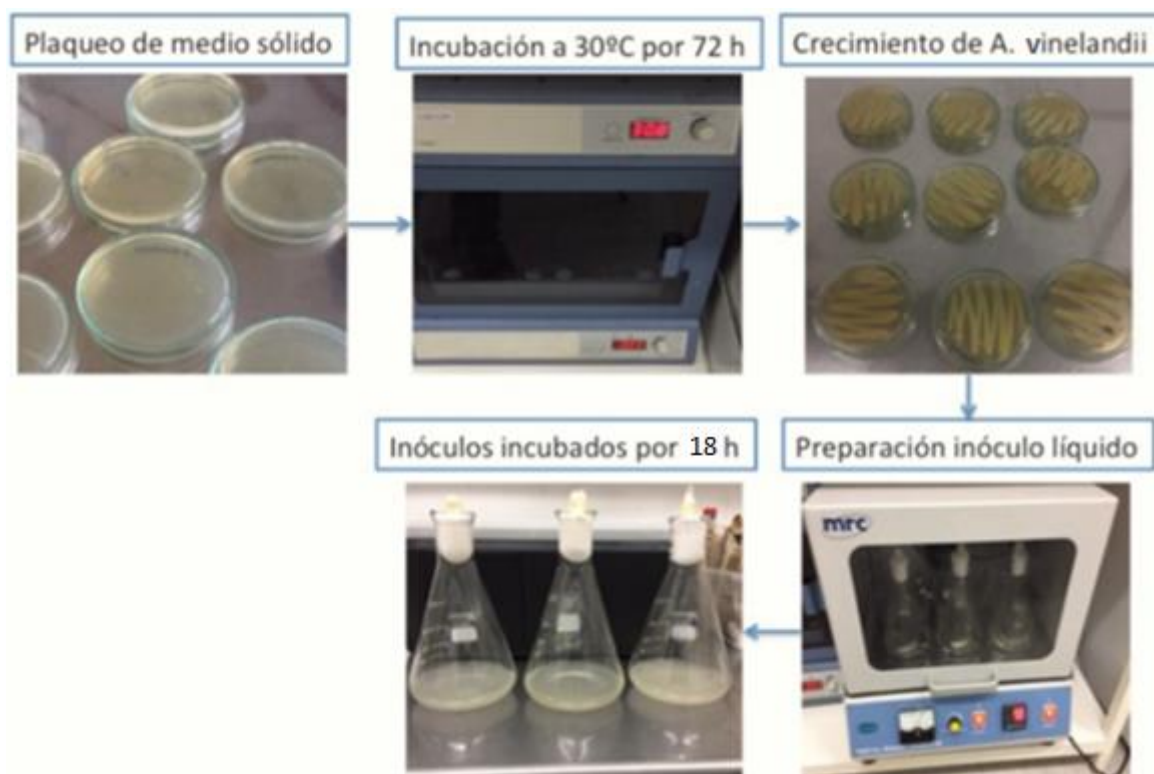


Figura 4.3. Esquema fotográfico del procedimiento para preparar los inóculo. Fuente: Avendaño, 2018. Con modificaciones

4.4. Cultivo de bacterias

Los cultivos para el estudio de la producción de PHB se realizaron en cultivos tipo lote. En primer lugar, como estudio preliminar se utilizaron matraces de 250 [ml] con 50 [ml] de volumen de trabajo, para comprobar que *Azotobacter vinelandii* OP puede producir PHB utilizando orujo de uva como sustrato. Posteriormente, se realizaron cultivos en un reactor de 4 [L], a diferentes razones iniciales Carbono/Nitrógeno. Todo esto, fue realizado en el laboratorio de biorreactores de la UTFSM Casa Central. Las condiciones de operación utilizadas en los cultivo se detallan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Condiciones de operación para las dos escalas de cultivo utilizadas. Fuente: Elaboración propia.

Parámetro	Matraces	Reactor
Temperatura [°C]	30	30
pH	[5,7 – 7,0] Sin control	[5,5 – 7,7]
Agitación [rpm]	200	300
Flujo de aire [$L\ min^{-1}$]	-	1,18
Tiempo de cultivo [h]	72	72

4.4.1 Cultivo en matraces

Los cultivos en matraces, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 [ml], usando un volumen de trabajo de 50 [ml] de medio complejo de orujo de uva. Se utilizaron 10 matraces, donde cada matraz representaba un punto de toma de muestra. Estos puntos se establecieron cada 8 horas durante las 72 horas que duraba la experimentación. Utilizando las condiciones nombradas en la Tabla 4.2, se monitoreo el avance del cultivo, caracterizando cada muestra retirada

4.4.2 Cultivos en reactor

Los cultivos tipo lote en reactor, fueron realizados en el biorreactor “Biotron” con capacidad de 4 litros, que cuenta con dos turbinas Rushton para el mezclado del cultivo. Se utilizó un volumen de trabajo de 2,7 litros, se inoculó el 10% de dicho volumen con el inóculo generado. Con un agitador marca Dragon Lab modelo OS20-S se mantuvo una velocidad de agitación de 300 [rpm]. El reactor, se mantuvo sumergido en un baño termorregulado marca Thermo Fischer scientific modelo SC100, mantenido a 29°C, para asegurarse de obtener 30°C dentro del reactor. Además, se adicionó un flujo constante de aire de 1,18 [$L\ min^{-1}$] (0,44 vvm), utilizando una bomba de aire marca Uniclife modelo UL40, se midió dicho caudal de aire con un rotámetro digital marca Cole Parmer. Se muestras de 22 [ml] 3 veces al día, para cuantificar el avance del cultivo. En cada una de esta toma de muestra, se midió el pH del cultivo con un pH-ímetro Hanna instruments edge, se controló manualmente este parámetro, adicionando $NaOH$ 2 [M], para que el pH no bajara de 5. Se realizaron 3 cultivos, a distintas razones Carbono/Nitrógeno, todos en duplicado. A continuación, se presenta una fotografía del montaje utilizado, en la figura 4.4.

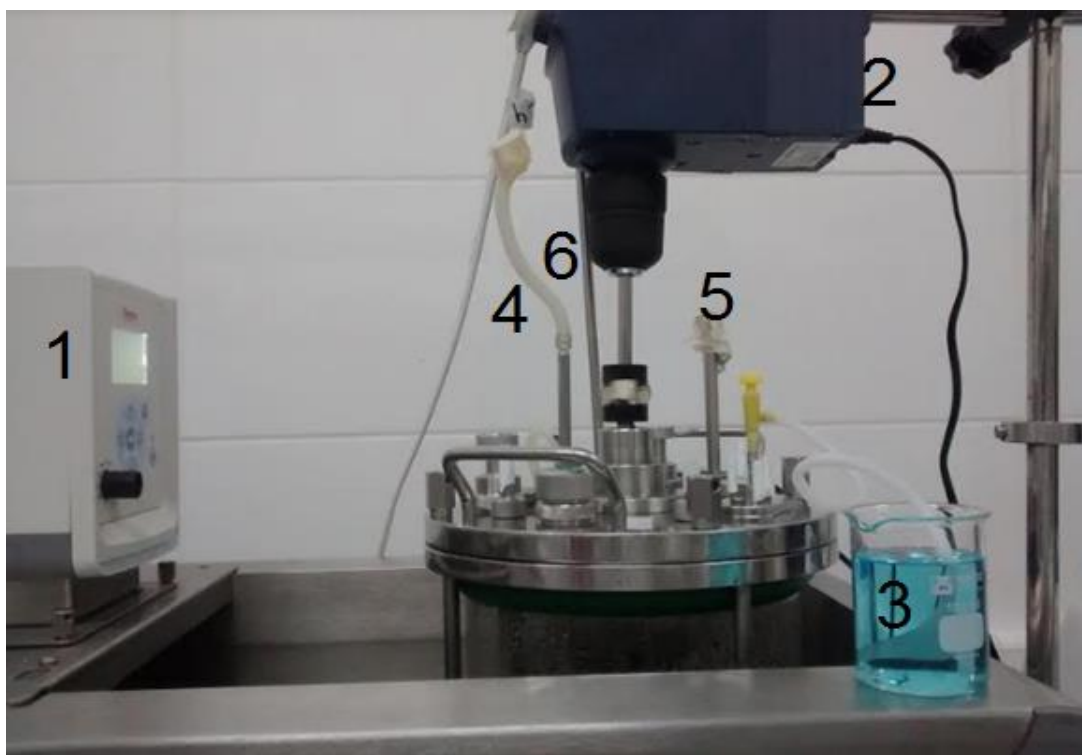


Figura 4.4. Montaje del biorreactor donde se realizaron los cultivos. Fuente: Elaboración propia.

Dónde:

- 1: Controlador del baño termorregulado en el cual se encuentra sumergido el reactor
- 2: Agitador acoplado a sistema de turbinas rushtone dentro del reactor
- 3: Sulfato de cobre al cual va dirigida la salida de aire del reactor
- 4: Salida para la toma de muestras durante el cultivo
- 5: Entrada del aire desde la bomba hacia el cultivo del experimento
- 6: Sensor de temperatura para medir esta misma dentro del reactor

4.5 Diseño de experimentos

Se realizaron cultivos de la bacteria *Azotobacter vinelandii* OP, en matraces de 250 [ml] y en un biorreactor de 4 [L], utilizando orujo de uva como sustrato, a 3 distintas razones carbono/nitrógeno, 190, 9 y 7. Se midió la concentración de carbono según la cantidad de azúcares reductores contenidas en el medio, utilizando el método DNS especificado en el anexo 9.2.2. Y se midió la cantidad de nitrógeno cuantificando la concentración de amonio existente en el medio de cultivo, utilizando el método de fenolhipoclorito expuesto en el anexo 9.2.5. Excepto para los cultivos de razón C/N 190, estos, utilizaron como medio de cultivo sólo orujo de uva, diluido hasta lograr una concentración de 40 g/L. En este caso, se utilizó otro método, del nitrógeno asimilable, para medir la cantidad de nitrógeno existente, mostrado en el anexo 9.2.3. El resumen de los experimentos realizados se expone en la figura 4.5 a continuación:

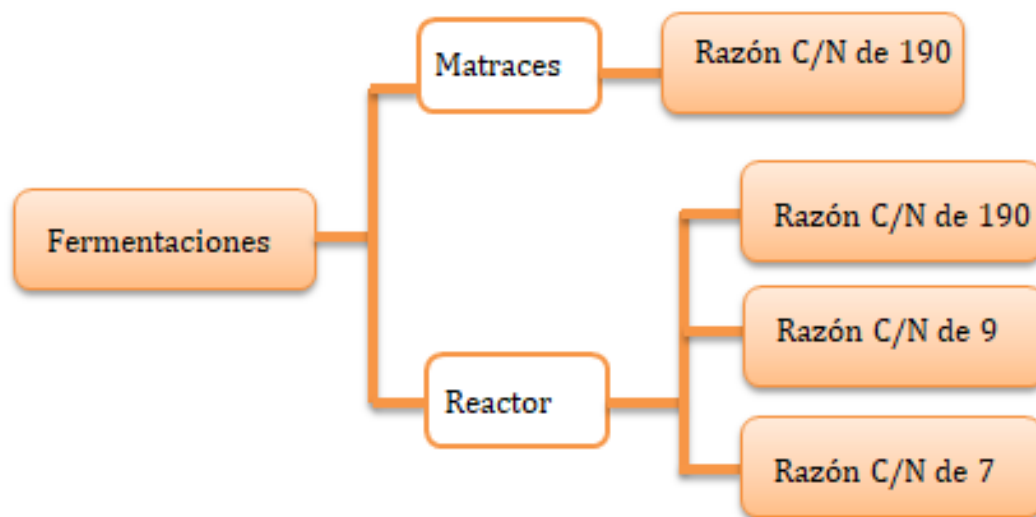


Figura 4.5. Diseño de experimentos a distintas razones C/N. Fuente: Elaboración propia.

Agregando sulfato de amonio de $400 [g L^{-1}]$, se logró variar la razón C/N del orujo de uva hasta llegar a los valores de 9 y 7. Se obtuvieron los siguientes valores de carbono y nitrógeno en gramos (Tabla 4.3):

Tabla 4.3. Razones C/N estudiadas con sus respectivas cantidades en gramos, en el medio de cultivo. Fuente: Elaboración propia

Razón C/N	Carbono [g]	Nitrógeno [g]
190	43,1	0,227
9	48,5	5,3
7	48,5	6,3

Con el fin de estudiar la influencia de esta razón sobre el crecimiento de la bacteria, y también, la influencia que ésta tiene en la producción de PHB, se obtuvieron curvas de crecimiento microbiano, de producción de PHB, y el rendimiento de estos dos parámetros. Además, se estudió también la evolución del consumo de la fuente de carbono, del amonio, la variación del pH y la acumulación de PHB dentro de la bacteria.

4.6 Cuantificación y métodos analíticos

Cada vez que se retira una muestra durante cada cultivo, fue posible cuantificar las siguientes variables:

- Biomasa celular
- Azúcares reductores
- pH
- PHB

El procedimiento de las técnicas, los equipos e instrumentos y reactivos utilizados se detalla a continuación:

4.6.1 Biomasa celular

La concentración de biomasa celular, se cuantificó por gravimetría. De las muestras retiradas, 1 [ml] fue diluido convenientemente y se midió su absorbancia, con un espectrofotómetro (Modelo Optizen pop) (Figura 4.8) este valor, fue extrapolado a una curva de calibración realizada previamente (especificada en el anexo 9.1.1) y con esto se obtuvo un valor aproximado del contenido de biomasa celular del cultivo en ese preciso instante de medición.

Por otro lado, se tomaron 20 [ml] de muestra del cultivo, a los cuales se le agregaron 2 [ml] de $NaCl$ 1 [M] y 2 [ml] de Na_4EDTA 0,1 [M] y fueron llevados a centrifugar en una centrifuga de marca Hermle (Figura 4.9) 3 veces a 10.000 rpm por 10 minutos (procedimiento especificado en el anexo 9.2.1). De esta centrifugación, el sobrenadante fue retirado y almacenado para otros análisis que se explicarán más adelante y el pellet sólido obtenido se llevó a una estufa a 80°C (Figura 4.11) por 24 horas hasta llegar a un peso constante, que fue medido en una balanza analítica (Figura 4.10)

4.6.2 Azúcares reductores (sustrato)

Para la cuantificación del sustrato durante el avance del cultivo, se utilizó el método de medición DNS. En cada toma de muestras, una vez centrifugadas estas mismas, el sobrenadante, fue congelado para posteriormente ser utilizado para determinar la cantidad de azúcares residuales (no fermentados) que éste contenía. Para esto, se diluyó convenientemente la muestra, y se aplicó el procedimiento especificado en el anexo 8.2.2, que consiste básicamente en la medición de los azúcares reductores libres, por la reducción con ácido dinitrosalicílico (DNS) con ayuda de hidróxido de sodio, en un baño a ebullición y un posterior baño frío. Se cuantificó este valor utilizando el mismo espectrofotómetro nombrado en el punto anterior (Figura 4.8). Posteriormente, los resultados se extrapolaron a una curva de calibración previamente hecha y expuesta en el anexo 9.1.2.

Además, antes del cultivo, se midieron los azúcares reductores contenidos en el medio complejo de orujo de uva utilizando un refractómetro digital, marca Hanna, modelo HI 9681 (Figura 4.12), instrumento óptico que mide el índice de refracción, para obtener el contenido de azúcar en soluciones acuosas, expresado en la unidad de °Brix.

4.6.3 Amonio

Se midió la evolución del amonio durante el tiempo, en los cultivos realizados de razones C/N 25 y 21, que corresponde a aquellos en que se agregó una fuente externa de nitrógeno. Este método no pudo ser aplicado para los experimentos de razón C/N 106, porque en estos, la cantidad de amonio existente era menor a la que puede ser captada por el método utilizado. Para esto, se utilizó el método de fenilhipoclorito. La reacción que ocurre es la transformación del amonio a cloramina, mediante la acción del hipoclorito. Luego, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno p-hidroxifenil imino bonzoquinona. Además, para la realización de este se utilizan dos soluciones, el procedimiento de este método, se encuentra detallado en el anexo 9.2.3. Los valores obtenidos durante el cultivo fueron extrapolados en la curva de calibración expuesta en el anexo 9.1.3.

4.6.4 pH

Se monitoreó el pH de los cultivos en cada una de las tomas de muestras. Para esto, se utilizó un pH-ímetro marca Hanna instruments (Figura 4.13). Si era necesario, se agregó *NaOH* en una solución 2 [M], para controlar el rango de pH del cultivo, y de esta manera evitar que el pH bajara demasiado y afectara negativamente a las células.

4.6.5 Oxígeno disuelto

En la ejecución del cultivo realizado en los matraces, con un medio de orujo de uva a una razón C/N de 190, también se midió el oxígeno disuelto medido en porcentaje de O₂ saturado. Esto, utilizando sensores de oxígeno puntuales ubicados dentro del matraz, en contacto con el cultivo en estudio. Por otro lado, se utilizó un medidor de oxígeno de fibra óptica llamado FireStingO₂ marca pyroscience (Figura 4.14), el cual unido al sensor, es capaz de medir el oxígeno disuelto en el medio. Este sistema, se calibra con el matraz vacío, con los parámetros conocidos del aire atmosférico, en el anexo 9.4 se explicita el modo de uso.

4.6.6 Concentración de PHB

La cuantificación de PHB se realizó mediante hidrólisis ácida de las células del cultivo para obtener ácido crotónico, por tratamiento con ácido sulfúrico de 5 [mM], seguido de una detección UV a 215 [nm]. Se midió en cada una de las muestras tomada durante el cultivo, siguiendo el procedimiento expuesto en el anexo 9.2.4. Excepto en el cultivo de matraces, donde sólo se midieron sólo 3 puntos del cultivo para saber si se había generado PHB. Para este procedimiento se utilizó un Thermo-Shaker marca Bioscan modelo TS-100 (Figura 4.15) para una posterior medición por HPLC (Aminex HPX-87H marca Jasco) acoplado a un detector UV (Serie 200, marca Jasco). Los valores obtenidos se interpolaron a la curva de calibración de ácido crotónico que se encuentra en el anexo 9.1.4. Todo este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Cultivos Celulares I de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV.

4.6.7 Recuperación y extracción de PHB

Al término del último cultivo realizado, que es donde se obtuvo una mayor cantidad de bioplástico, se realizó una centrifugación del caldo de cultivo obtenido, en una centrifuga marca Thermo Scientific modelo SL 16R (Figura 4.16). Se hicieron 3 lavados con agua destilada, el sólido húmedo obtenido se almacenó en un refrigerador a -25°C para su posterior tratamiento. Por la acción del hipoclorito, se disuelven los residuos celulares separandolos del PHB obtenido. Posteriormente, debido a la característica hidrofóbica del PHB, se utiliza cloroformo como solvente orgánico para que éste migre inmediatamente a dicha fase. El procedimiento del método se encuentra especificado en el anexo 9.5. Éste método, fue entregado por investigadores del Laboratorio de cultivos celulares II de la escuela de ingeniería Bioquímica de la PUCV, y se basa en los estudios realizados por Hahn S. et al., (1993).

4.7 Equipos utilizados



Figura 4.6. Shaker orbital utilizado para el cultivo de la cepa en placas y en matraces. Fuente: Elaboración propia



Figura 4.7. Autoclave marca AMILAB modelo mx-80 utilizado para esterilizar material y medios de cultivo. Fuente: Elaboración propia.



Figura 4.8. Espectrofotómetro modelo optizen pop. Fuente: Elaboración propia



Figura 4.9. Centrifuga HERMLE modelo Z323K utilizada para procesar las muestras del cultivo. Fuente: Elaboración propia.



Figura 4.10. Balanza electrónica modelo HX-T. Fuente: Elaboración propia



Figura 4.12. Estufa MEMERT utilizada para secar muestras de biomasa del cultivo a 80°C. Fuente: Elaboración propia



Figura 4.14. pH-ímetro marca HANNA modelo edge utilizado para monitorear el pH del cultivo. Fuente: Elaboración propia



Figura 4.16. Thermo-Shaker marca Bioscan modelo TS-100. Fuente: Elaboración propia



Figura 4.13. Refractómetro digital Hanna Instruments, modelo HI 9681. Fuente: Elaboración propia.



Figura 4.15. Equipo de medición óptica de oxígeno disuelto. Fuente: Elaboración propia

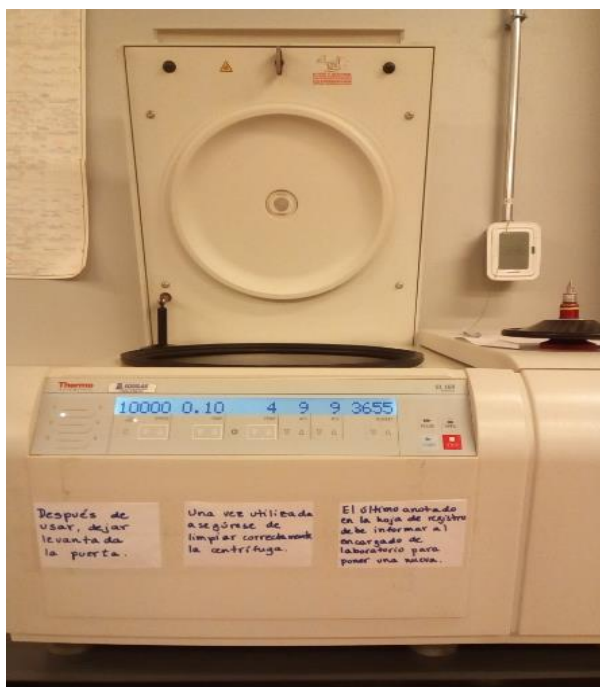


Figura 4.17. Centrifuga Thermo Scientific modelo SL 16R. Fuente: Elaboración propia

4.8 Cálculo de parámetros de cultivo

4.8.1 Rendimiento de biomasa

El rendimiento de la biomasa en la fuente de carbono fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_o}{S_o - S_t} \left[\frac{g_{biomasa}}{g_{fuente\ de\ carbono}} \right] \quad (2)$$

Dónde:

X_o : Concentración inicial de biomasa [$g\ L^{-1}$]
 $X_{m\acute{a}x}$: Concentración máxima obtenida de biomasa [$g\ L^{-1}$]
 S_o : Concentración inicial de la fuente de carbono [$g\ L^{-1}$]
 S_t : Concentración de la fuente de carbono cuando la concentración de biomasa fue máxima [$g\ L^{-1}$]

4.8.2 Rendimiento de PHB

El rendimiento del PHB en la fuente de carbono fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$Y_{PHB/s} = \frac{[PHB]_{m\acute{a}x} - [PHB]_o}{S_o - S_t} \left[\frac{g_{PHB}}{g_{fuente\ de\ carbono}} \right] \quad (3)$$

Dónde:

$[PHB]_{m\acute{a}x}$: Concentración máxima de PHB alcanzada en el cultivo [$g\ L^{-1}$]
 $[PHB]_o$: Concentración inicial de PHB en el cultivo [$g\ L^{-1}$]
 S_o : Concentración inicial de la fuente de carbono [$g\ L^{-1}$]
 S_t : Concentración de la fuente de carbono cuando la concentración de PHB fue máxima [$g\ L^{-1}$]

4.8.3 Velocidad específica de crecimiento

Para el cálculo de la velocidad específica se utilizó el Modelo Logístico, ya que, utilizando este modelo, se presentó un mayor ajuste ($R^2 \approx 0,9$). Este tipo de crecimiento (logístico) se presenta cuando la tasa de la velocidad específica disminuye a medida que la población alcanza su límite máximo, y se representa de la siguiente forma:

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot X(t) \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right) \quad (5)$$

La solución explícita de la ecuación diferencial (5) está dada por la siguiente expresión conocida como modelo logístico:

$$X = \frac{X_{m\acute{a}x}}{1 + B \cdot e^{-\mu_{m\acute{a}x} \cdot t}} \quad (6)$$

Dónde:

B: es cualquier número real positivo que depende de la condición inicial X (0)
 $X_{m\acute{a}x}$: es el valor del crecimiento máximo de la población
 $\mu_{m\acute{a}x}$: es la velocidad específica de crecimiento máximo

Utilizando la ecuación (6), es posible calcular una concentración de biomasa teórica, basada en dicho modelo. Estos valores, en conjunto con los datos reales de biomasa obtenidos en cada cultivo realizado, y utilizando el método de los mínimos cuadrados, hacen posible encontrar el valor de la velocidad específica de crecimiento, que permite que los datos teóricos se acerquen lo más posibles a los reales, minimizando el cuadrado de la diferencia entre estos dos, variando el valor de la velocidad específica de crecimiento.

4.8.4 Acumulación del PHB dentro de la célula

Para conocer la acumulación de PHB que existe dentro de las células en cada punto de análisis, se hace una relación entre la concentración de ácido crotónico producido y medido por el método de HPLC y la concentración de biomasa total hidrolizada por acción del ácido sulfúrico. Utilizando el método mencionado en el anexo 8.2.4 se puede conocer la cantidad de ácido crotónico producido por la hidrólisis con ácido sulfúrico, y utilizando la curva de calibración del anexo 8.1.4. La concentración de masa hidrolizada corresponde a la masa entre 2,5 y 3,5 [mg] que se pesan para tratar al inicio del procedimiento, dividido por el volumen utilizado de ácido sulfúrico que siempre corresponde a 1 [ml].

$$\%Acumulaci\acute{o}n_{PHB} = \frac{C_{\acute{a}cido\ crot\acute{o}nico}[mg/L]}{C_{masa\ hidrolizada}[mg/L]} \cdot 100 \% \quad (7)$$

5 Resultados y Discusión

5.1 Estudios preliminares

En primer lugar, se realizó el crecimiento de la bacteria en matraces, a una razón C/N de 190, de aquí se obtuvo el siguiente seguimiento de biomasa y sustrato (fuente de carbono):

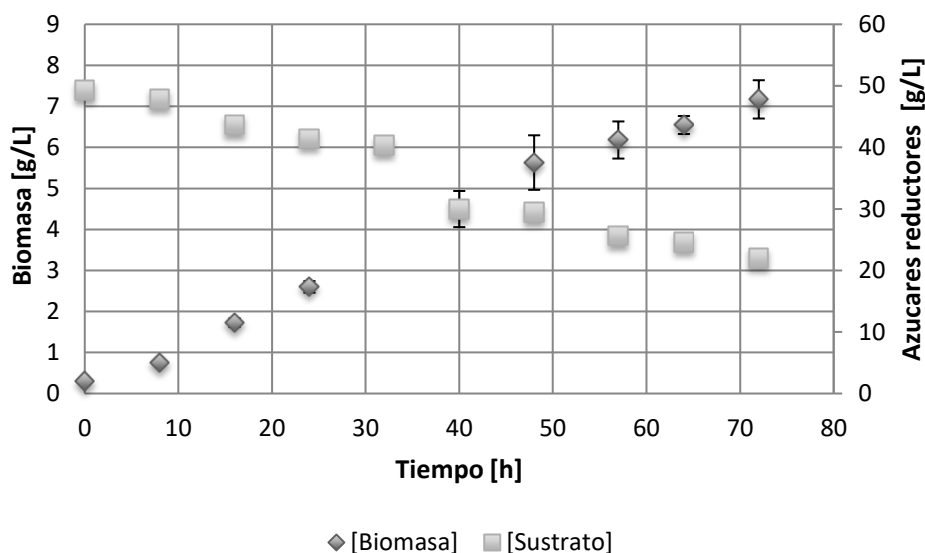


Figura 5.1. Evolución del cultivo de *Azotobacter vinelandii* OP en matraces, a 200 [rpm] y 30°C. Fuente: Elaboración propia.

En este caso, con 50 ml de volumen de trabajo, se alcanzó una producción máxima de 7,2 [$g L^{-1}$], al fin del tiempo de cultivo. Además, a las 57 horas de transcurrido el cultivo, se detiene un poco el crecimiento de la población. Al finalizar el cultivo, se consumió la fuente de carbono hasta llegar a los 21 [$g L^{-1}$], lo que equivale al 57% del total de sustrato suministrado. Sin embargo se hubiera podido dejar más tiempo, hasta llegar a observar una fase estacionaria más definida.

Además, se tomaron 3 muestras del cultivo para analizar la cantidad de PHB que contenían, de éstas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 5.1. Producción de PHB en cultivos de matraces C/N 190. Fuente: Elaboración propia.

Tiempo de cultivo [h]	Concentración PHB [$g L^{-1}$]	Acumulación PHB %
16	0,9	31
40	1,5	32
64	2,3	49

Con estos valores, se puede afirmar que a medida que transcurre el tiempo del cultivo, fue creciendo la población celular (Figura 5.1), y al mismo tiempo también fue aumentando la

concentración de PHB presente dentro del biorreactor. Entre las 16 y 40 horas, aumentó desde 0,9 a 1,5 [$g\ L^{-1}$]. También, se observa un aumento de la acumulación del PHB dentro de la célula, a medida que pasa el tiempo de cultivo, hasta un máximo de 49%.

En función de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento, se calcularon los siguientes rendimientos para la biomasa generada y para el PHB producido, junto con la velocidad específica de crecimiento, adecuada al modelo logístico (Tabla 5.2)

Tabla 5.2. Parámetros de cultivos en matraces C/N 190. Fuente: Elaboración propia

Variable	Valor	Unidades
$Y_{x/s}$	0,24	$[g_{biomasa}/g_{sustrato}]$
$Y_{PHB/s}$	0,08	$[g_{PHB}/g_{sustrato}]$
$\mu_{m\acute{a}x}$	0,098	$[h^{-1}]$

Sin embargo, el valor de rendimiento del PHB no es muy representativo, debido a que sólo se relaciona a 3 mediciones de muestras, pero basta para conocer una tendencia sobre cómo se comporta la bacteria en estas condiciones.

Por lo tanto, estos resultados corroboran que el orujo de uva puede ser utilizado como fuente de carbono para la producción de PHB, utilizando la cepa *Azotobacter vinelandii* OP. Se obtuvieron resultados cercanos a los obtenidos por Avendaño (2018), que trabajó con esta misma bacteria, en estas mismas condiciones. El valor de la velocidad específica se acerca al obtenido por otros autores que utilizaron cultivos con medios sintéticos adicionados con extracto de levadura, en matraces agitados de 500 [ml], donde se obtuvo un valor de 0,095 [h^{-1}] (Peña et al 2014). Este valor se obtuvo con un R^2 asociado de 0,988.

Se midió, además, el pH durante el cultivo, obteniendo la siguiente tendencia:

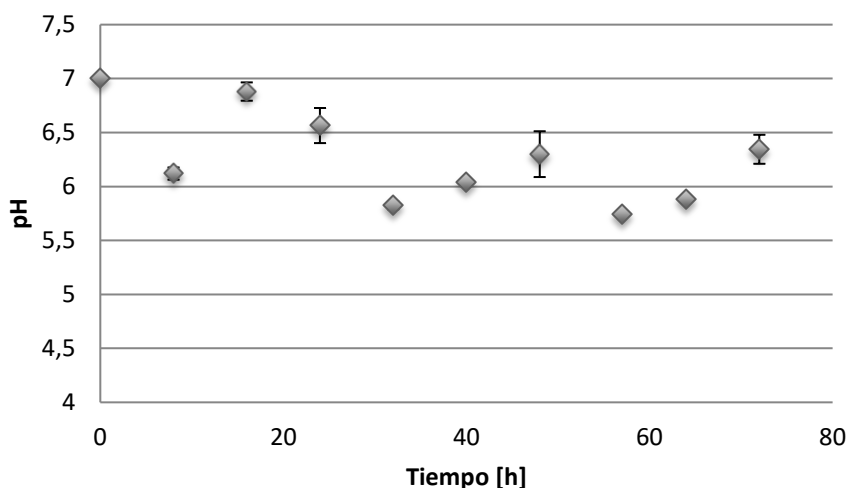


Figura 5.2. Evolución del pH para el cultivo en matraces con una C/N de 190, 200 rpm y 30°C. Fuente: Elaboración propia.

Aunque el valor del pH varió a lo largo del tiempo de la experimentación, la bacteria pudo crecer sin complicaciones. Sin embargo, es posible que haya afectado en la producción de PHB, ya que la acumulación medida dentro de la bacteria, es más baja que la obtenida por Avendaño (2018), donde en las mismas condiciones pero usando mosto en vez de orujo de uva, obtuvo un máximo de 85% de acumulación de PHB dentro de las células.

También, durante este cultivo, fue medido el oxígeno disuelto, obteniendo los siguientes valores (Figura 5.3):

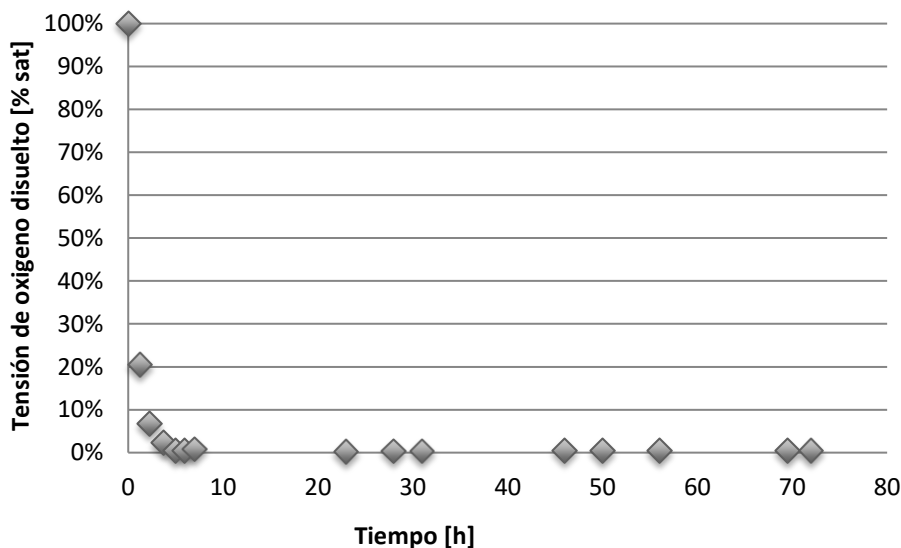


Figura 5.3. . Evolución de la tensión de oxígeno disuelto en el cultivo en matraces, a 200 [rpm] y 30°C. Fuente: Elaboración propia.

Azotobacter vinelandii es una bacteria con una alta tasa de respiración celular (Buhler et al 1987), por lo tanto es de esperar que el oxígeno disuelto en el cultivo sea cercano a cero la mayor parte del tiempo, o al menos cuando el microorganismo se encuentre creciendo y reproduciéndose. Se observa que, a las pocas horas de iniciar el cultivo, el porcentaje de oxígeno disuelto cae a un valor cercano a cero (0,6% aproximadamente) este valor se conoce como TOD (tensión de oxígeno disuelto), de igual manera, estos valores se condicen con los resultados de biomasa obtenidos en la Figura 5.1, donde se observa que la fase de latencia es prácticamente nula y de inmediato comienza el crecimiento celular de la población. Estos valores se corroboran con los resultados obtenidos por Diaz-Barrera et al., (2016), en cultivos de la cepa salvaje *Azotobacter vinelandii* OP a 300 rpm, donde la TOD se mantuvo cercana a cero durante 65 horas del cultivo. Esta variable, influye en el metabolismo de la bacteria jugando un factor clave en la producción de PHB (Peña et al 2000). A $TOD < 1\%$ se favorece la acumulación de PHB; mientras que a valores mayores al 10% la bacteria utiliza la fuente de carbono para crecer principalmente.

5.2 Cultivos en biorreactor

5.2.1 Evolución de la biomasa

A continuación, se muestra el crecimiento celular obtenido durante los tres experimentos realizados en el reactor, a diferentes razones carbono/nitrógeno.

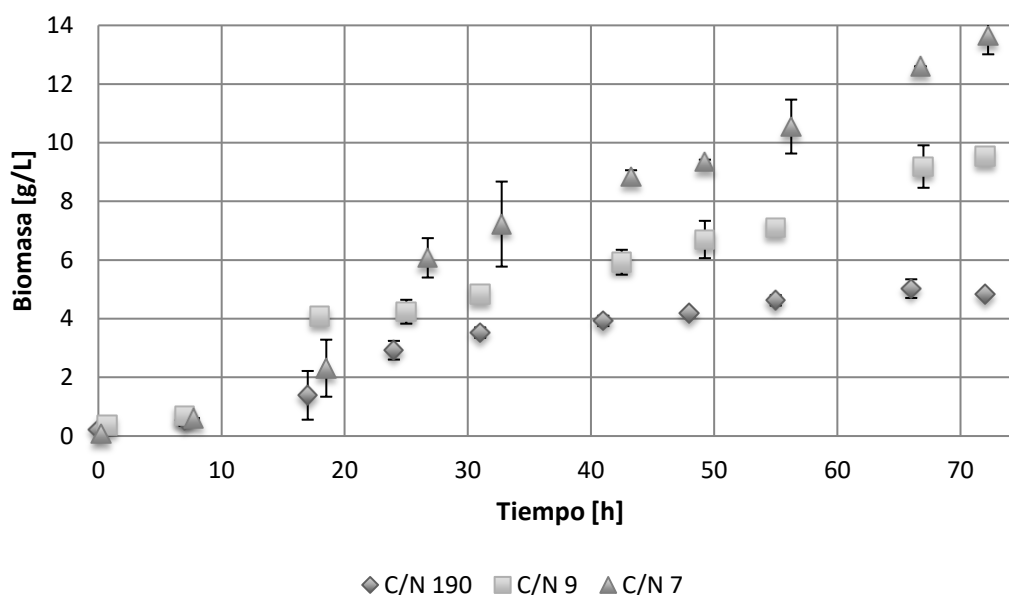


Figura 5.4. Evolución del crecimiento celular durante los experimentos realizados a distintas razones C/N, a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.

Se observa que en el caso del cultivo de razón C/N 190, se alcanza una fase estacionaria donde se mantiene una población casi constante de 4 [g/L], hay que recordar que es en este experimento donde no existe una fuente externa de nitrógeno agregada, sólo se utiliza el medio complejo de orujo de uva.

Por el contrario, en los experimentos donde se agregó una fuente externa de nitrógeno, logrando llegar a obtener razones C/N de 9 y 7, la población celular parece seguir en crecimiento hasta el término del tiempo de cultivo utilizado (72 horas), a diferencia del cultivo de razón C/N 190. Como los tres casos en estudio poseen la misma cantidad de carbono a consumir, el cambio radica fundamentalmente en la presencia de nitrógeno asimilable dentro del medio de cultivo. La presencia de este compuesto en los cultivos, aumentó el crecimiento de la población celular, en el caso de la razón C/N 9, se aumentó dos veces la biomasa obtenida al término de la fermentación, comparada con la obtenida en el cultivo de razón C/N 190. Y al disminuir hasta la razón C/N 7, se obtuvo tres veces la biomasa obtenida en el caso de C/N 190.

Este hecho, se debe principalmente a que la bacteria es un microorganismo fijador de nitrógeno atmosférico, transforma el nitrógeno del aire en amonio, para su uso dentro de las

actividades metabólicas internas de la célula. Por lo tanto, al proporcionar el nitrógeno en forma de amonio dentro del medio de cultivo, como lo fue para los cultivos de razones C/N 9 y 7, la bacteria se evita un gasto energético innecesario de fijar el nitrógeno atmosférico, pudiendo consumir el que ya tiene disponible, y ocupando su energía en reproducirse, aumentar la población y al mismo tiempo también, producir mayor cantidad de polihidroxibutirato (figura 5.7), que es lo que se busca (Soto-Urzúa 2001).

Los valores obtenidos se pueden comparar con otros estudios realizados anteriormente, por Avendaño (2018), donde se obtuvieron resultados similares al utilizar orujo de uva sin fuente de nitrógeno en un reactor de 3 [L]. En el caso del cultivo realizado en el reactor de 4 [L] sólo con orujo de uva, de razón C/N 190, se obtuvieron $4,7 [g L^{-1}]$ de biomasa al final del cultivo, y en el caso de Avendaño (2018), donde se utilizó la misma razón C/N, se obtuvo un máximo de $3,9 [g L^{-1}]$. En esta investigación, se obtienen mayores crecimientos bacterianos agregando sulfato de amonio al medio complejo de orujo de uva. Se obtuvieron valores máximos de 9,5 y 13,7 [g/L] a razones C/N de 9 y 7 respectivamente.

5.2.2 Evolución del consumo de azúcares reductores

En la figura 5.5 se muestra la evolución del consumo de azúcares reductores por las bacterias durante los cultivos realizados a distintas razones carbono/nitrógeno.

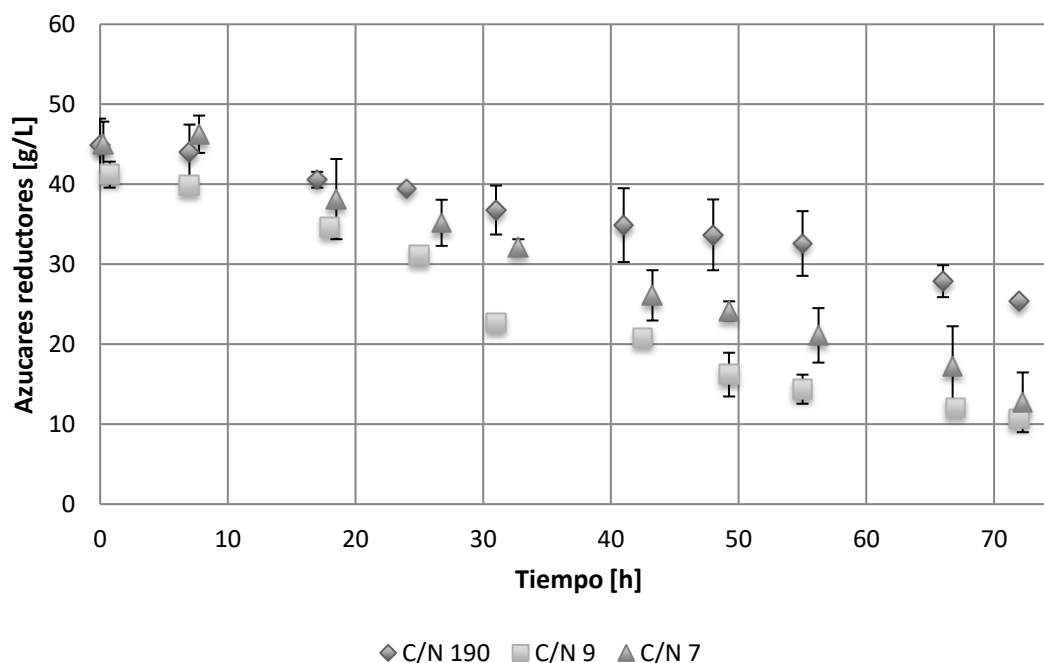


Figura 5.5. Evolución del consumo de la fuente de carbono en los cultivos realizados a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm.
Fuente: Elaboración propia.

Se observa que, se consumió una mayor cantidad de fuente de carbono, en los experimentos de razones C/N 9 y 7, donde se agregó sulfato de amonio. Fue en estos mismos donde se produjo mayor cantidad de biomasa también. Por lo tanto, se puede afirmar que el hecho de disminuir la razón C/N, afecta positivamente el crecimiento de la población celular, al mismo tiempo que mejora también el consumo de la fuente de carbono. Llegando a consumir un total de 32 [g/L] en ambos experimentos (C/N 9 y 7), a diferencia de un consumo de sólo 20 [g/L] en el experimento de C/N 190.

5.2.3 Evolución del consumo de Amonio

Se pudo monitorear el consumo de amonio de los experimentos de razones C/N 9 y 7, que fueron a los cuales se les agregó sulfato de amonio al medio de cultivo. Las cantidades agregadas a ambos cultivos fueron parecidas, y también lo fue su evolución en el tiempo de cultivo. Los datos obtenidos se observan a continuación en la Figura 5.6.

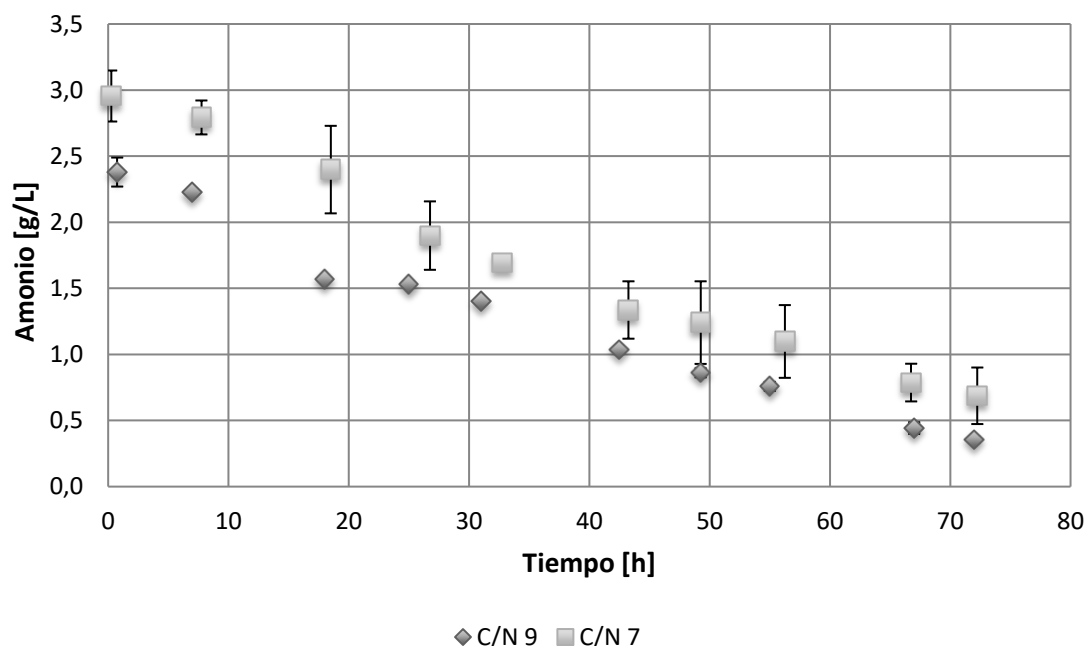


Figura 5.6. Evolución del consumo de amonio en cultivos realizados a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.

Para obtener la razón C/N 7, fue necesario agregar 20 [ml] de sulfato de amonio, logrando obtener un valor de concentración inicial de amonio dentro del cultivo de 3 [$g L^{-1}$]. Finalizadas las 72 horas del cultivo, se consumieron 2,3 [$g L^{-1}$], consumiendo un total del 77% del amonio disponible. Para el caso de la razón C/N 9, se agregaron 15 [ml] de la solución de sulfato de amonio, para lograr una concentración inicial de amonio de 2,4 [$g L^{-1}$]. En este caso, se consumieron 2,0 [$g L^{-1}$], consumiendo el 85% del total de amonio suministrado. Nunca se llega a consumir por completo, por lo tanto no existe una limitación de crecimiento debido a este nutriente.

El nitrógeno, como se menciona anteriormente, es fundamental en el crecimiento de la bacteria *Azotobacter vinelandii*, sobre todo debido a su característica de microorganismo diazotrofo. Se observa que la bacteria consumió una menor cantidad de este elemento cuando la concentración inicial de este mismo fue mayor. En esa misma ocasión existió un aumento de la biomasa producida.

5.2.4 Evolución de la producción de PHB

Para los cultivos realizados en el reactor, se midió la cantidad de PHB contenida en cada una de las tomas de muestras realizadas durante el cultivo. Se pudo conocer la concentración de este compuesto y su evolución dentro del reactor (Figura 5.7), así como también el porcentaje de acumulación que presentó dentro de las células a lo largo de la experimentación (Figura 5.8). Se obtuvieron los siguientes valores en los cultivos realizados a distintas razones C/N.

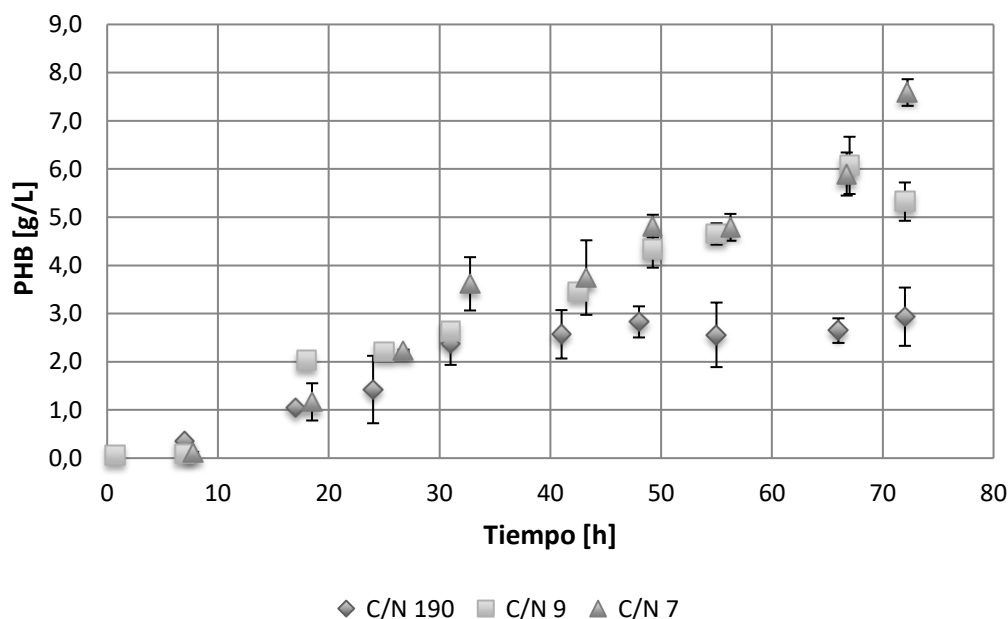


Figura 5.7. Evolución de la producción de PHB en cultivos a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de PHB obtenida en los experimentos, se observa un aumento en la producción de este biopolímero cuando se agregó una fuente de nitrógeno al medio de cultivo (experimento C/N de 9 y experimento C/N de 7). En el cultivo de razón C/N 190, donde no hubo adición de amonio, se obtuvo una concentración máxima de PHB de 2,9 [g/L] y en luego, en el experimento de C/N 9, se llegó a una concentración máxima de 6,08 [g/L], lo que significa un aumento del doble de PHB producido, al reducir la razón C/N desde 190 a 9. Posteriormente, al disminuir la razón C/N hasta 7, se obtuvo un valor máximo de concentración de PHB de 7,06 [g/L], lo que significa un aumento de la cuarta parte con respecto al cultivo realizado a C/N 9. Sin embargo, vale la pena recordar que en ésta última experiencia, se produjo una mayor cantidad de biomasa celular dentro del fermentador, específicamente se produjo 44% más de biomasa (Figura 5.4), un valor superior al aumento

de cantidad de PHB producido, lo que quiere decir que se obtuvo una menor acumulación de PHB dentro de las células en la experimentación de C/N 7 (Figura 5.8). Es por esto que se analiza dicha variable, obteniendo los siguientes valores para los tres casos en estudios, a diferentes razones C/N.

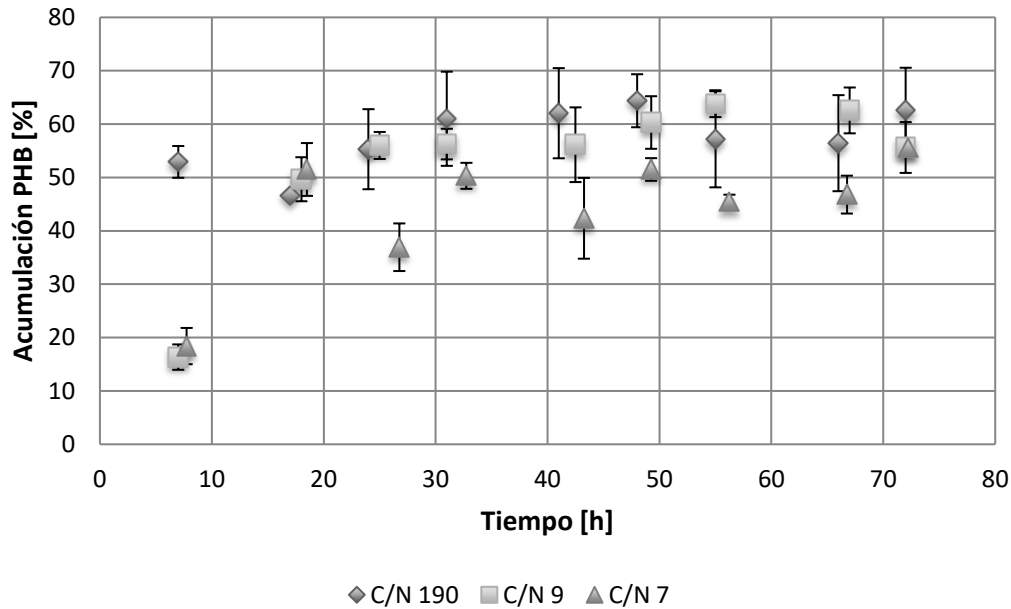


Figura 5.8. Acumulación del PHB en los cultivos a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente: Elaboración propia.

La acumulación de PHB dentro de la célula, se mantuvo similar para los casos de razones C/N 190 y 9, razones bastante diferentes. Este parámetro se vio disminuido a simple vista en el caso de la razón C/N 7. Para corroborar si existió una disminución real en dicha ocasión, se realizó un análisis estadístico utilizando intervalos de confianza para cada razón C/N estudiada, para saber si estos eran estadísticamente iguales, utilizando un 95% de certeza, según la siguiente ecuación:

$$I de C = \bar{x} \pm 1,96 \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

Dónde:

$\bar{x}$: Es el promedio de los valores de acumulación de PHB obtenidos en cada experimento

1,96: Es el coeficiente de confianza, calculado con la tabla de valores z, para un nivel de confianza del 95%

σ : Es la error estándar de las muestras

n : Es el tamaño muestral, es decir, la cantidad de muestras utilizadas menos 1.

Se obtuvieron los siguientes intervalos de confianza para cada experimento, con las siguientes cotas superior e inferior (Tabla 5.3):

Tabla 5.3. 3 Intervalos de confianza para los valores de acumulación de PHB dentro de la célula. Fuente: Elaboración propia.

Razón C/N	Intervalo de confianza	Cotas inferior y superior
190	57,6 $\pm$ 1,36	[56,2% – 59%]
9	53 $\pm$ 3,49	[49,5% – 56,5%]
7	44,3 $\pm$ 2,72	[41,6% – 47%]

En el experimento de razón Carbono/Nitrógeno 190, se obtuvo una acumulación máxima del 63% y en el experimento de C/N 9, se obtuvo un 72%. Por lo tanto aquí se vio favorecida la acumulación del biopolímero con la disminución del valor C/N, en 9 unidades. Sin embargo, el promedio de los valores obtenidos es menor para el caso de C/N 9, pero sus intervalos de confianza se intersectan, lo que indica que el valor real promedio de acumulación de PHB dentro de las células, se encuentra con un 95% de certeza dentro de los intervalos de confianza expuesto en la tabla 5.3 y son estadísticamente iguales.

En la experimentación de razón C/N 7, tanto el valor máximo medido como el promedio de las muestras disminuyeron, obteniendo un máximo de acumulación de 55%, valor que se acerca al obtenido en la experimentación con matraces, y un promedio de 44,3%. Para este caso además, el intervalo de confianza obtenido se intersecta con el obtenido en el cultivo de razón C/N 9. Lo que indica que con un 95% de certeza, que los valores de acumulación de PHB para los cultivos con razón C/N 9, son estadísticamente iguales a los obtenidos con razón C/N 7.

El hecho de suministrar el amonio disuelto en el medio de cultivo de la bacteria, hace que la bacteria no gaste su energía y ATP en fijar nitrógeno atmosférico para sus funciones internas (Soto-Urzúa 2001). Es por esto que en los experimentos donde se les suministró amonio disuelto al medio de cultivo de las bacterias, se ve favorecido el crecimiento bacteriano y también la producción de PHB (Figuras 5.4 y 5.7). Sin embargo, la acumulación se vio afectada negativamente con el aumento de la concentración de amonio en el medio, y la consecuente disminución de la razón C/N.

Para el caso del cultivo con C/N 7, se relaciona el hecho de la disminución de acumulación dentro de la célula al control de pH, ya que como se observará más adelante, este parámetro en éste experimento, fue el que mayores complicaciones presentó, para mantenerse en valores adecuados para el crecimiento de la bacteria. Es por esto, que se cree que el microorganismo tuvo que utilizar parte de su energía en establecer el equilibrio de protones dentro y fuera de la célula, debido a que la síntesis del PHB tiene una estrecha relación con el control de protones dentro de la célula, se cree que este hecho podría incidir en la baja acumulación de este bioplástico dentro de la célula. Sin embargo, también es posible que el sólo hecho de disminuir la razón C/N externa del cultivo hasta 7, impida a la célula acumular más PHB de lo que podría hacerlo.

5.2.5 Parámetros de cultivo

Se calcularon los siguientes parámetros de cultivo, para poder analizar de mejor forma el comportamiento de la bacteria en cada uno de los casos estudiados de razones C/N (Tabla 5.4)

Tabla 5.4. Parámetros de cultivo obtenidos en los experimentos realizados. Fuente: elaboración propia.

Razón C/N	$Y_{x/s}$ [$g_{biomasa}$ / $gsustrato$]	$Y_{PHB/s}$ [g_{PHB} / $gsustrato$]	$\mu_{m\acute{a}x}$ [h^{-1}]	Acumulación máxima de PHB [%]
C/N 190	$0,233 \pm 0,008$	$0,171 \pm 0,037$	0,126	64
C/N 9	$0,296 \pm 0,019$	$0,188 \pm 0,031$	0,094	72
C/N 7	$0,423 \pm 0,068$	$0,236 \pm 0,035$	0,144	55

Con respecto a la comparación entre los experimentos realizados a igual C/N (190, orujo de uva sin fuente de nitrógeno) pero a distintas escalas (50 [ml] en matraces (Tabla 5.2) y 2,7 [L] en biorreactor (Tabla 5.4)), se puede desprender que existe una mantención en el valor del rendimiento de la biomasa y la velocidad específica de crecimiento. Por otro lado, se vio favorecido el rendimiento del PHB y su acumulación, al variar la configuración utilizada del cultivo desde los matraces de 50 [ml] al reactor de 2,7 [L]. Sin embargo, este dato no puede ser corroborado del todo, ya que sólo se midieron 3 muestras del cultivo realizado en matraces, es posible que haya existido una mayor cantidad de PHB producido pero es poco probable, ya que se eligieron dichas muestras esperando abordar el mayor espectro de actividad de la célula dentro del tiempo de cultivo. También, el hecho que se haya visto favorecida la producción de PHB en el reactor con respecto a los matraces, puede deberse al control de pH realizado durante la experimentación en el biorreactor, cosa que no se hizo en los matraces.

De los datos obtenidos en la Tabla 5.4, de cultivos realizados en el reactor a distintas razones C/N, vale la pena destacar que a medida que disminuye la razón Carbono/Nitrógeno, aumenta el rendimiento de la biomasa con respecto a la fuente de carbono. Sobre todo, es destacable observar que al disminuir de C/N 9 a C/N 7, el rendimiento de la biomasa aumenta más que de disminuir el C/N de 190 a 9, en el primer caso (de C/N 9 a 7) el rendimiento aumenta un 42%, y en el segundo caso nombrado (de C/N 190 a 9), el rendimiento de la biomasa aumenta sólo un 27%.

El rendimiento de la fuente de carbono en PHB se comporta de manera similar, éste, se ve incrementado al disminuir la razón carbono nitrógeno de 190 a 9, en un 10%, no obstante, este incremento es sólo aparente, debido a los errores asociados a cada valor, el valor de rendimiento de PHB para el caso de la razón C/N 190, está contenido dentro del valor obtenido de rendimiento de PHB en el cultivo de C/N 9. Posteriormente, al disminuir la razón C/N de 9 a 7, se observa un aumento del 26% en el rendimiento de PHB, nuevamente, existe un mayor aumento de la variable en estudio con respecto a un menor cambio en la razón C/N.

Por otro lado, la acumulación máxima presentada durante el cultivo se vio favorecida cuando hubo una disminución de razón C/N de 190 a 9, aumentando en 12 unidades porcentuales. Ésta variable es la única que no se vio favorecida por la disminución de la razón C/N de 9 a 7, en este caso, hubo una disminución del 17% de PHB acumulado dentro de la bacteria.

Se obtuvieron los siguientes valores de coeficiente de determinación (R^2) en la obtención de la velocidad específica de crecimiento: 0,971; 0,904 y 0,899 en los cultivos de razones C/N 190, 9 y 7 respectivamente. Por lo tanto se observa una buena adecuación de los datos al modelo logístico utilizado para el cálculo de este parámetro. Los valores obtenidos de este parámetro, se condicen con los expuestos por autores anteriores que hayan trabajado con esta bacteria y cepa específica, específicamente se encontraron valores de velocidad específica de crecimiento de 0,12 y 0,11 [h^{-1}] (Díaz-Barrera et al 2016) y de 0,095 [h^{-1}] (Peña et al 2014)

En general, el hecho de agregar nitrógeno combinado en forma de amonio al medio de cultivo, inhibe la actividad de la nitrogenasa, evitando de esta manera la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, y el gran gasto energético para la célula que este proceso conlleva. Además, se ha comprobado que la relación carbono-nitrógeno controla procesos internos como el consumo de O_2 celular y la actividad y formación del sistema respiratorio de la *Azotobacter vinelandii*, con el propósito de controlar la relación C/N interna de la célula, a un nivel que satisfaga los requerimientos de formación de biomasa (Oelze, 2000).

5.2.6 Variación del pH

Se monitoreo también el pH a lo largo del tiempo de todos los cultivos estudiados, los datos obtenidos se muestran a continuación en la figura 5.9.

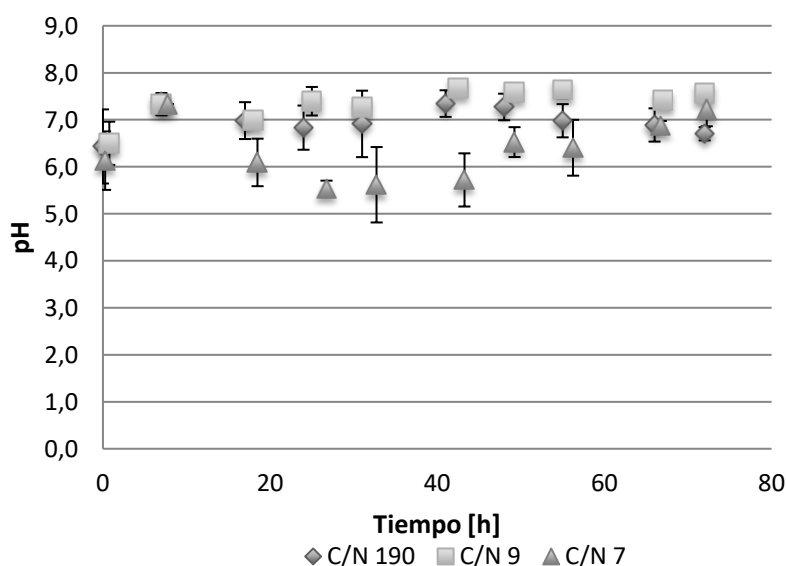


Figura 5.9. Evolución del pH durante los tres experimentos realizados a 300 rpm, 30°C y 0,44 vvm. Fuente. Elaboración propia.

El pH de un cultivo microbiano, afecta la actividad enzimática y por lo tanto la velocidad de crecimiento microbiano dentro del biorreactor. Estas bacterias en entornos naturales se suelen encontrar en suelos de pH neutros y alcalinos. El rango de pH necesario por *Azotobacter vinelandii* para crecer corresponde a 4,8-8,5 (Espín, 2003). Se observa que en todos los experimentos realizados el pH medido durante los cultivos se encuentra dentro de este rango. Por lo tanto, y como se observa en la figura 5.4, el crecimiento de las bacterias no se vio afectada por la variación del pH dentro de medio de cultivo.

Sin embargo, existen muchas variaciones en los valores obtenidos de este parámetro, debido principalmente a que no fue controlado de manera automática, sólo de forma manual se agregó hidróxido de sodio 2 [M] para evitar que el pH bajara lo suficiente para afectar el cultivo. Se observó una tendencia a la baja del pH, pero pudo ser mantenido dentro del rango necesario, pero para poder observar la real influencia de este parámetro en el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* OP y su producción de PHB en cultivos complejos como orujo de uva y a distintas razones C/N, es necesario realizar un control automático que mantenga un valor de pH constante y observar cómo se comporta la bacteria y de esta forma encontrar las condiciones óptimas que permitan maximizar la producción de PHB.

5.2.7 Influencia de la razón C/N en los cultivos

En los cultivos realizados a razones C/N iniciales de 9 y 7, se pudo conocer como variaba este parámetro a lo largo del tiempo (Figura 5.10 y 5.11).

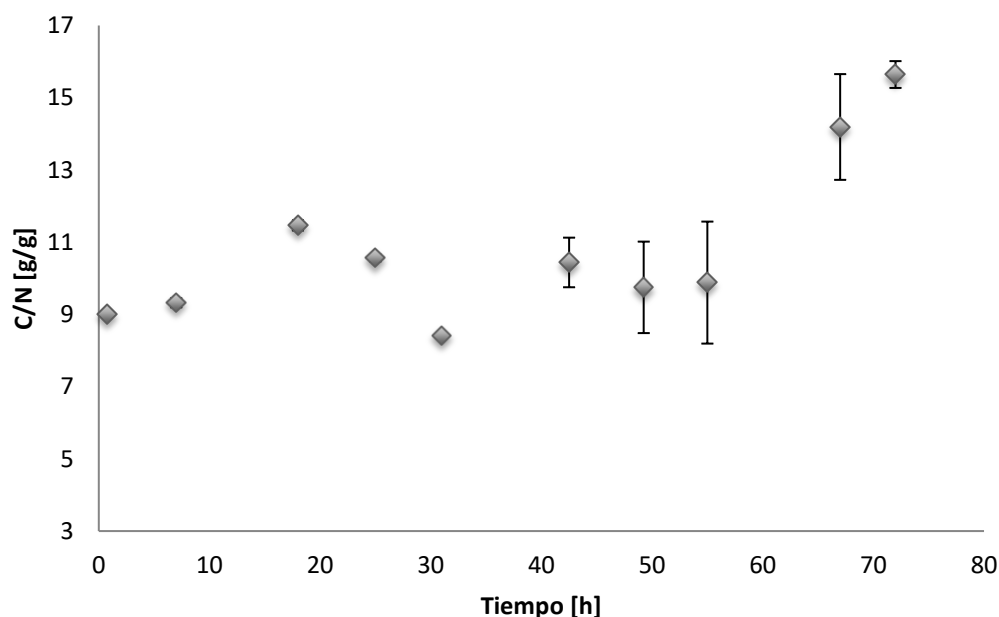


Figura 5.10. Variación de la razón C/N a lo largo del tiempo en el cultivo de C/N inicial 9. Fuente: Elaboración propia

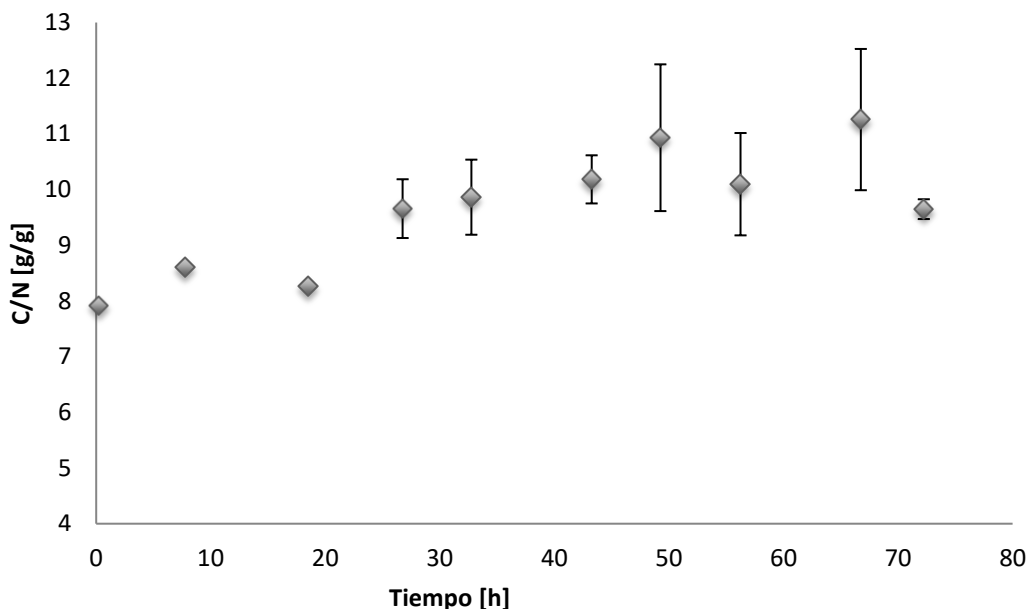


Figura 5.11. Variación de la razón C/N a lo largo del tiempo en el cultivo de C/N inicial 7. Fuente: Elaboración propia

Se observa que en ambos casos, la razón C/N fluctúa bastante a lo largo de tiempo y tiende a aumentar paulatinamente. En el primer caso, de razón C/N inicial 9, se obtuvo un valor promedio a lo largo del tiempo de C/N: 10,86, y en el segundo caso, cuando se trabajó a una C/N inicial de 7, se obtuvo un valor promedio a lo largo del tiempo de C/N: 9,64. Por lo tanto, se puede afirmar que existe una tendencia natural de ambos cultivos a mantener una razón C/N de 10 aproximadamente. Esto se puede deber a que, como se ha propuesto en otras ocasiones, la población bacteriana intenta equilibrar el consumo de la fuente de carbono y de nitrógeno de tal manera, que la razón interna de Carbono/Nitrógeno que posean las células, permita generar más biomasa, al mismo tiempo que produce PHB (Oelze, 2000). Es por esto que es posible encontrar una razón C/N que optimice la producción de PHB de estos cultivos, conociendo la evolución de los procesos fisiológicos relacionados con este hecho, tales como la evolución de la tasa de transferencia de oxígeno, el porcentaje de oxígeno saturado, la producción de PHB, su acumulación y el crecimiento de la biomasa.

En general, en este trabajo investigativo, se encontró que una disminución de la razón C/N inicial del medio de cultivo, afectó positivamente a la formación de biomasa y a la producción de PHB, logrando los mejores resultados cuando se utilizó la razón inicial C/N de 7, obteniendo los resultados que se exponen la tabla 5.5 a continuación, junto con la comparación de estos mismos, con diversos estudios de producción de PHB, a distintas razones C/N y utilizando diversas fuentes de carbono y nitrógeno:

Tabla 5.5. Comparación de rendimientos obtenidos con otros trabajos de producción de PHB

Cepa utilizada	Medio de cultivo	Razón C/N [g_C/g_N]	$Y_{x/s}$ [$g_{biomasa}/g_{sustrato}$]	$Y_{PHB/s}$ [$g_{PHB}/g_{sustrato}$]	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	Orujo de uva + sulfato de amonio	7	$0,423 \pm 0,07$	$0,236 \pm 0,06$	Resultados de este trabajo
<i>Azotobacter Vinelandii</i> OPNA	Sacarosa + extracto de levadura	16	$0,49 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,05$	Castillo et al., 2017
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	Sacarosa + extracto de levadura	48	$0,51 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,033$	Diaz-Barrera et al., 2016
<i>Ralstonia Eutropha</i>	Sacarosa + extracto de levadura + peptona (medio PY)	30	0,11	0,19	Wang y Yu., 2001
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Melaza de caña de azúcar + urea	10	$0,83 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	Kanjanachumpol et al., 2013

Se observa que los resultados obtenidos en esta investigación, se encuentran dentro los rangos obtenidos por otros autores, en distintos estudios de producción de PHB, por diversas cepas de bacterias sintetizadoras, a distintas razones C/N y con diferentes sustratos. Por supuesto, dependiendo del microorganismo usado y de las condiciones nutricionales y operacionales de los cultivos realizados, varía también la influencia de la razón C/N sobre la producción de biomasa y PHB.

Según los resultados obtenidos del presente trabajo, la razón C/N sí afecta a la producción de PHB y la producción de biomasa, pero se deben continuar realizando estudios que esclarezcan la influencia directa que este tiene, en el metabolismo de *Azotobacter vinelandii* OP. En este estudio, se obtuvo a grandes rasgos, que una disminución de la razón C/N inicial, contribuye a la generación de biomasa sobre todo, y también a la producción de PHB.

5.2.8 Recuperación y extracción de PHB de experimento final

Debido a que se obtuvo una mayor población celular en el experimento donde se utilizó la razón C/N de 7, luego del término del último cultivo con esta razón, se realizó la recuperación y extracción del PHB, para observar el producto final que se puede obtener después del cultivo de las bacterias. De acuerdo al procedimiento expuesto en el anexo 9.5, se obtuvo luego de la digestión con hipoclorito de sodio y los lavados con agua destilada y acetona el siguiente compuesto, de un aspecto quebradizo y blanco (Figura 5.12).

Posteriormente, por acción del cloroformo, y una vez evaporado este mismo, se obtuvo el siguiente film de plástico biodegradable (Figura 5.13)

Este film se obtuvo con sólo 150 [mg] del compuesto presentado en la figura 5.12. Es del porte de la misma placa Petri y se observa a simple vista con las mismas características de un plástico utilizado normalmente en la vida cotidiana.

Con esta extracción se logra visualizar de manera tangible el producto que se genera mediante el cultivo de la bacteria *Azotobacter vinelandii* OP, a través del consumo de orujo de uva, a una razón C/N de 7.



Figura 5.12. Recuperación del PHB del cultivo final. Fuente: Elaboración propia



Figura 5.13. Film de PHB extraído del caldo de cultivo final. Fuente: Elaboración propia.

6 Conclusiones

Se logró evaluar y cuantificar la producción de PHB, en *Azotobacter Vinelandii* OP, una bacteria con una mutación natural que bloquea la síntesis de alginato, produciendo sólo PHB como polímero celular. Utilizando orujo de uva como fuente de carbono, contribuyendo a disminuir los costos de producción de este sustituto del plástico convencional, el único 100% biodegradable (Khanna y Srivastana., 2004). Y utilizando tres distintas razones Carbono/Nitrógeno, 190, 9 y 7, se logró analizar la influencia de este parámetro en los resultados de producción de biomasa y PHB en los cultivos realizados en un biorreactor con 2,7 litros de volumen de trabajo, a 300 rpm, 30 °C, un volumen de aire por volumen de medio de 0,44 vvm y con control manual del pH.

De acuerdo a los estudios preliminares realizados, se permite concluir que es posible obtener PHB como producto de cultivos de la bacteria, utilizando una fuente de carbono no convencional. Esto se ve corroborado con la obtención de un rendimiento de la fuente de carbono en biomasa de $Y_{x/s} = 0,24 [g_{biomasa}/g_{sustrato}]$ y un rendimiento de la fuente de carbono en PHB de $Y_{PHB/s} = 0,08 [g_{PHB}/g_{sustrato}]$.

En el biorreactor, se encontró que la razón C/N 7, fue la que mejores resultados entregó, a nivel de rendimiento de biomasa y de producción de PHB, obteniendo una mayor producción del biopolímero, medido en el rendimiento de la fuente de carbono en PHB ($Y_{PHB/s} = 0,236 [g_{PHB}/g_{sustrato}]$, y un mayor crecimiento celular, reflejado en un mayor rendimiento de la fuente de carbono en biomasa ($Y_{x/s} = 0,423 [g_{biomasa}/g_{sustrato}]$). Sólo la acumulación de PHB se vio afectada negativamente con la máxima disminución de la razón C/N, pero estadísticamente los valores de este parámetro fueron iguales a los obtenidos en el cultivo de razón C/N 9, que fue donde se alcanzó la mayor acumulación máxima de PHB (72%).

Por lo tanto, una vez concluida esta investigación, se puede concluir que existe una relación inversamente proporcional entre la razón inicial C/N del medio de cultivo, y el crecimiento de la población celular junto con la producción de material de reserva energía PHB, en *Azotobacter Vinelandii* OP.

7 Recomendaciones

Se recomienda trabajar con la configuración de razón C/N 7, utilizando orujo de uva como sustrato, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y la bacteria *Azotobacter vinelandii* OP (mejor configuración obtenida de este trabajo). Pero, con un control automático de pH. Para poder conocer el comportamiento ideal que podría tener este microorganismo en la producción de PHB, evitando de esta forma que el crecimiento de la bacteria se vea afectado por esta variable, con el fin de conocer mejoras y optimizaciones en el proceso de producción de este bioplástico, para que en el futuro, se pueda producir de manera industrial y competitiva en el mercado actual de los plásticos.

Además, se recomienda al momento de realizar cualquier experimentación como la expuesta en este trabajo, que se disponga de un rotámetro para poder medir el caudal de aire que se ingresa al medio de cultivo, de manera fidedigna, ya que este parámetro es de especial importancia para el análisis de datos y resultados de los cultivos realizados.

Si fuera posible medir la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, también se contribuiría aún más a esclarecer el comportamiento metabólico de la bacteria, en función de la razón C/N del medio de cultivo.

También, ya que ninguna de las experiencias realizadas y expuestas en este trabajo, llegó a una fase estacionaria clara, se recomienda aumentar el tiempo del cultivo, hasta llegar al punto de equilibrio de la población celular y el sustrato en el medio de cultivo.

Finalmente, una variable muy importante en la calidad y funcionalidad del PHB obtenido, es la masa molecular, por lo que también se recomienda que en investigaciones como esta, se pueda medir esta variable, ya que la razón Carbono/Nitrógeno afecta también directamente en la variación del MM, y su valor altera las propiedades que puede tener este bioplástico.

8 Bibliografía

Aamer Ali Shah, Fariha Hasan, Abdul Hameed, Safia Ahmed, (2008) *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. *Biotechnology Advances* 26:246–265.

Ahn, W., Park, J., y Lee, S. (2000) *Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant Escherichia coli with a highly concentrated whey solution*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3624–3627.

Albuquerque P y Malafaia C (2017). *Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates*. *International journal of Biological Macromolecules* 107 615-625.

Álvarez L. (2016). *Bioplásticos: Obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos*. Trabajo de fin de grado. Universidad de Sevilla. Facultad de farmacia.

Anakabe J, Arrillaga A, Leartiker, Artibai L. (2011). *Bioplásticos para aplicaciones duraderas*. 10/05/2012, de Interempresas Sitio web: <http://www.interempresas.net/>

Andrady A.L. (2015) *Persistence of Plastic Litter in the Oceans*. In: Bergmann M., Gutow L., Klages M. (eds) *Marine Anthropogenic Litter*. Springer, Cham 88.

Andrady, A. L. (2011). *Microplastics in the marine environment*. *Mar. Pollut. Bull.*, 62 (8): 1596-1605.

Anjum A, Zuber M, Zia K.M , Noreen A, Anjum M.N, Tabasum S. (2016). *Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 89, pp. 161-174

Asiplas. (2016). *Asiplas Industriales de Plástico*. Obtenido de <http://www.asipla.cl/que-es-el-plastico/>.

Avendaño S. (2018). *Producción de PHB en Azotobacter vinelandii utilizando orujo de uva como potencial fuente de carbono* (Memoria de pregrado). UTFSM, Valparaíso.

Barber V. (2016) *Chardonnay. Extendida mundialmente. Características y Cultivo*. Vitivinicultura Sitio web: <http://www.vitivinicultura.net/>

Barreto J, Castillo T, Segura D, Peña C (2015) *Influencia de la relación C/N sobre el peso molecular del polihidroxibutirato (PHB) sintetizado por la cepa OPNA de Azotobacter vinelandii*. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V. (2014). *Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging*. *Express Polym. Lett*, 8, pp. 791-808

- Buhler, T., Monter, U., Sann, R., Kuhla, J., Dingler, C. and Oelze, J. (1987)** *Control of respiration and growth yield in ammonium-assimilating cultures of Azotobacter vinelandii.* Arch. Microbiol. 148, 242-246.
- Byrom D.(1987).** *Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics.* Trends Biotechnol., 5, pp. 246-250.
- Castells X (2012)** *Residuos de la industria vitivinícola. En Tratamiento y valorización energética de residuos* (128-129). Madrid: Diaz de santos S.A.
- Castillo T, Heinzle E, Peifer S, Konstantin S, Peña C. (2013).** *Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in Azotobacter vinelandii.* Process Biochemistry 48: 995-1003
- Castillo T, Peña C, Garcia A, Millán M y Segura D. (2014).** *Biotechnological strategies to improve production of microbial poly3hydroxybutyrate: a review of recent research work.* Microb Biotechnol 7(4):278-293.
- Castillo T, Flores C, Segura D, Espín G, Sanguino J, Cabrera E, Barreto J, Díaz-Barrera A y Peña C. (2017).** *Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by Azotobacter vinelandii in batch and fed-batch cultures.* J Chem Technol Biotechnol 92: 1809 – 1816.
- Catedra ecoembes del medio ambiente (2013).** *Proyecto de Análisis de Bioplásticos.*10-12.
- Cavalheiro, J.M.B.T., De Almeida, M., Grandfils, C., y Da Fonseca, M. (2009)** *Poly (3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necato using waste glycerol.* Process Biochem 44: 509–515.
- Chen, G. (2009)** *A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry.* Chem Soc Rev 38:2434–2446
- Chen G, Patel M. (2012).** *Plastics derived from biodegradable sources: present and future: a technical and environmental review.* Chem. Rev., 112, pp. 2082-2099-
- Chen, G., y Wang, Y. (2013).** *Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates.* Chin J Polym Sci 31: 719–736.
- Derraik, J. (2002),** *The Pollution of the Marine Environment by Plastic Debris: A Review.* Marine Pollution Bulletin, 44, 842–85.
- Dias J, Lemos P, Serafim L, Oliveira C, Eiroa M, Albuquerque M, Ramos A, Oliveira R, Reis M. (2006)** *Recent advances in Polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product.* Macromolecular Bioscience , 6, 885-906.

Díaz-Barrera A, Andler R, Martínez I, Peña C. (2016). *Poly-3-hydroxybutyrate production by Azotobacter vinelandii strains in batch cultures at different oxygen transfer rates.* J Chem Technol Biotechnol 91: 1063 – 1071.

División protección agrícola SAG (2008). *Plan de contingencia polilla del racimo de la vid (Lobesia botrana).* Recuperado de www.sag.gob.cl

Espín G. (2007). *Plásticos y contaminación ambiental.* La unión de Morelos, 30.

Espín G. (2003). *Microbios.* Capítulo 6. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. N., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G. y Soberón-Chavez, G., (2004). *Characterization of the Azotobacter vinelandii algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production.* FEMS Microbiol Lett, 238:199–206.

García B, Olivera ER, Miñambres B, Fernández-Valverde M, Cañedo LM, Prieto MA, García JL, Martínez M, Luengo JM. (1999). *Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source.* J. Biol. Chem., 274 (1999), pp. 29228-29241.

García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., y Pena, C. (2014) *High production of poly-βhydroxybutyrate (PHB) by an Azotobacter vinelandii mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process.* Biochem Eng J 82: 117–123.

Gholami A, Mohjam M, Rasoul-Amini S, Younes G. (2016). *Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: Opportunities and challenges.* Minerva Biotecnologica 28(1):59-74.

Goldstein MC, Titmus AJ, Ford M. (2013). *Scales of spatial heterogeneity of plastic marine debris in the northeast pacific ocean.* Plosone 8 (11): e80020.

González Y, Meza JC, González O y Córdova J. (2013) *Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano.* Revista Internacional de Contaminación Ambiental 29: 77-115.

Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Chang HN (1994) *Optimization of the recovery of microbial poly (3-hydroxybutyrate) using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform.* Biotechnol Bioeng , 44, pp. 256 – 261.

Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Lee KM, Chang HN (1993) *The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform.* Biotechnology techniques Volume 7 no.3 pp. 209-212.

Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L., y Espín, G. (2012) *RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in Azotobacter vinelandii*. Microbiology 158: 1953–1963.

Hixson J, Wilkes E, Smith P, Forsyth K. (2014) *Understanding the composition of grape marc and its potential as a livestock feed supplement*. AWRI Tech. Rev 213, 11–15.

Hosler D, Burkett S, Tarkanian MJ. (1999). *Prehistoric Polymers: Rubber Processing in Ancient Mesoamerica*. Science 284 (5422): 1988-19.

Instituto de investigaciones agropecuarias (2017). *Entomologia-Plagas en frutales: Polilla del racimo de la vid*. Recuperado de www.inia.cl

Iwata T.(2005) *Strong fibers and films of microbial polyesters*. Macromol Biosci 5: 689–701.

Jambeck J, Geyer R, Wilcox C, Siegler T, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Lavender K. (2015) *Plastic waste inputs from land into the ocean*. Science, 347 pp. 768-771.

Kabe T, Tsuge T, Kasuya K, Takemura A, Hikima T, Takata M, Iwata T. (2012) *Physical and structural effects of adding ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3- hydroxybutyrate] to wild type poly[(R)-3-hydroxybutyrate]*. Macromolecules 45: 1858–1865.

Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V., y Thongchul, N. (2013) *Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of Bacillus megaterium BA-019*. Bioproc Biosyst Eng 36: 1463–1474.

Khanna S, Srivastava SK. (2004). *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*. Process Biochem., 40, pp. 607-619.

Kim, B.S. (2000) *Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates*. Enzyme Microb Technol 27: 774–777.

King PP.(1982) *Biotechnology, an industrial view*. J Chem Technol Biotechnol 32: 2-8

Klim. (2000) *Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates*. Enzyme Microb. Technol., 27, pp. 774-777

Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M., Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. New Biotechnology, 37, 24-38.

Kristi D, Vijay S, Stevens M. (2015). *Production of novel biopolymers in plants: recent technological advances and future prospects*. Current opinion in biotechnology. 32:68-75).

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., and Thongchul, N. (2009) *Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate*

of *Bacillus megaterium*. J Biosci Bioeng 107: 240– 249.

Lee S, Chang H. (1995) *Production of poly (hydroxyalkanoic acid)*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 52, pp. 27-58.

Lee, K., Tanabe, S. & Koh, C. (2001). *Contamination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from Kyeonggi Bay and nearby areas, Korea*. Mar. Pollut. Bull., 42: 273-279.

Madison L y Huisman G (1999). *Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic*. Microbiol mol biol rev 63(1): 21-53

Mozumder, M.S.I., De Wever, H., Volcke, E.I.P., y Garcia-Gonzalez, L. (2014) *A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production*. Process Biochem 155: 272–280.

Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S, Desai AJ (2008) *Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of Methylobacterium sp. ZP24*. Bioresource Technol 99:5749–5755

Oelze J (2000), *Respiratory protection of nitrogenase in Azotobacter species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence?* FEMS Microbiol Rev 24:321–333 (2000).

Oficina de estudios y políticas agrarias (2018). *Una mirada al mercado vitivinícola nacional e internacional*. Recuperado de: <http://www.odepa.gob.cl>

Page W. J (1990) *Production of poly- β -hydroxybutyrate by Azotobacter vinelandii UWD in beet molasses culture at high aeration*. In: Dawes EA (ed) *Novel biodegradable microbial polymers*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 423-424.

Page W. J. (1992) *Production of poly- β -hydroxybutyrate by Azotobacter vinelandii UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources*, Appl Microbiol Biotechnol 38:117-121

Pan P. e Inoue Y. (2009) *Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters*. Prog Polym Sci 34: 605–640

Penloglou, G., Kretza, E., Chatzidoukas, C., Parouti, S., and Kiparissides, C. (2012b) *On the control of molecular weight distribution of polyhydroxybutyrate in Azohydromonas lata*. Biochem Eng J 62: 39–47.

Peña, C. T.-R. (2000). *Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of Azotobacter vinelandii*. . Enzyme microbial technology , 27 (1), 390-398

Peña C, Castillo T, Núñez C, Segura D. (2011). *Bioprocess Design: Fermentation Strategies for*

Improving the Production of Alginate and Poly- β -Hydroxyalkanoates (PHAs) by Azotobacter vinelandii. Universidad Nacional Autónoma de México.

Peña C, López S, García A, Espín G, Romo-Uribe A, Segura D. (2014). *Biosynthesis of poly- β hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of Azotobacter vinelandii (OPN)*. Ann Microbiol 64: 39–47.

Perdomo M. y Gilberto A. (2002). *Plásticos y medio ambiente*. Revista Iberoamericana polímeros, 3(2), 1-4.

Philip S, Keshavarz T, Roy I (2007). *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. Chem. Technol. Biotechnol. 82. 233–247.

PlasticsEurope. (2015) *“Plastics - theFacts 2015. An analysis of European plastics production, demand and waste data”*

Pool R. K, and Hill S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. Biosci. Rep. 17:303-317.

Postgate J. (1982) *Biological nitrogen fixation: fundamentals*. Phil Trans R Soc Lond B. 296, 375-385.

Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B., and González-Lopez, J. (2002) *Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by Azotobacter chroococcum H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source*. J Biotechnol 97: 125–131.

Pradella, J.G.C., Ienczak, J., Romero, C., and Taciro, M. (2012) *Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using Cupriavidus necator*. Biotechnol Lett 34: 1003–1007.

Rehm B. (2009) *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Robson R. L y Postgate J. (1980). *Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation*. Annu. Rev. Microbiol. 34:183-207.

Rochman C, Hoh E, Kurobe T, Teh S.J. (2013). *Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress*. Scient. Rep., 3: 3263

Segura, D. and Espín G. (1998). *Mutational inactivation of a gene homologous to Escherichia coli ptsP affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 180:4790-4798.)

Segura, D., and Espín, G. (2004) *Inactivation of pycA, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-β-hydroxybutyrate accumulation in Azotobacter vinelandii on solid medium.* Appl Microbiol Biotechnol 65: 414–418.

Senior, P., and Dawes, E. (1973) *The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in Azotobacter beijerinckii.* Biochem J 134: 225–238.

Soto-Urzúa L y Baca B. (2001). *Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno.* Revista Latinoamericana de Microbiología 43:37-49.

Steinbüchel A, Fächtenbush B (1998). *Bacterial and other biological systems for polyester production.* Trends Biotechnol. 16(10): 419-27.

Steinbüchel A. y Lütke-Eversloh T. (2003). *Novel precursor substrates for polythioesters (PTE) and limits of PTE biosynthesis in Ralstonia eutropha.* FEMS microbial Lett. 221(2):191-6.

Tanadchangsang, N., and Yu, J. (2012) *Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester.* Biotechnol Bioeng 109: 2808–2818.

UNEP (United Nations Environmental Programme), (2016). *Marine plastic debris and microplastics – Global lessons and research to inspire action and guide policy change.* United Nations Environment Programme, Nairobi.

Volova T.G. (2004) *Polyhydroxyalkanoates- Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Applications.* Nova Publishers, New York

Wang, J., and Yu, J. (2001) *Kinetic analysis on formation of Poly(3-hydroxybutyrate) by Ralstonia eutropha under chemically defined conditions.* J Ind Microbiol Biotechnol 26: 121–126.

Williams S, Martin D, Doi Y, Steinbüchel A. (2005). *Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy.* In biopolymers online, A. Steinbüchel (Ed)

Zafar, M., Kumar, S., and Dhiman, A. (2012a) *Optimization of poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) production process by using Azohydromonas lata MTCC 2311 by using genetic algorithm on artificial neural network on response surface methodology.* Biocatal Agric Biotechnol 1: 70–79.

9. Anexos

9.1 Curvas de calibración

9.1.1 Curva de calibrado de biomasa

La curva de calibrado de biomasa se construye de la siguiente manera:

- Se realiza un cultivo de *A. vinelandii* en matraces Erlenmeyer de 500 [ml] a 200 [rpm] y 30 °C asegurando obtener células en etapa de crecimiento (aprox. 16- 20 [h]).
- Se toman 20 [ml] del caldo de cultivo (por duplicado) y se le adicionan 2 [mL] de EDTA 0,1 [M] y 2 [ml] de NaCl 1 [M].
- Se centrifuga a 10.000 [rpm] por 10 [min] (repitiéndose 3 veces).
- El pellet obtenido luego de los 3 lavados se deposita en capachos de aluminio previamente secados a 80 °C hasta peso constante y pesado.
- Por diferencia del peso del capacho antes de colocar la muestra y luego de secar la muestra a 80 °C hasta peso constante, y considerando el volumen de 20 [ml], se obtiene la concentración celular.
- Paralelamente se toman 10 [ml] del caldo de cultivo del matraz y se hicieron diluciones entre 2 y 50 veces, asegurándose que la absorbancia esté entre 0,1 y 0,8. Se mide absorbancia de estas diluciones a 540 [nm] usando como blanco agua destilada. De esta manera, se obtuvo la siguiente curva de calibración para ser utilizada:

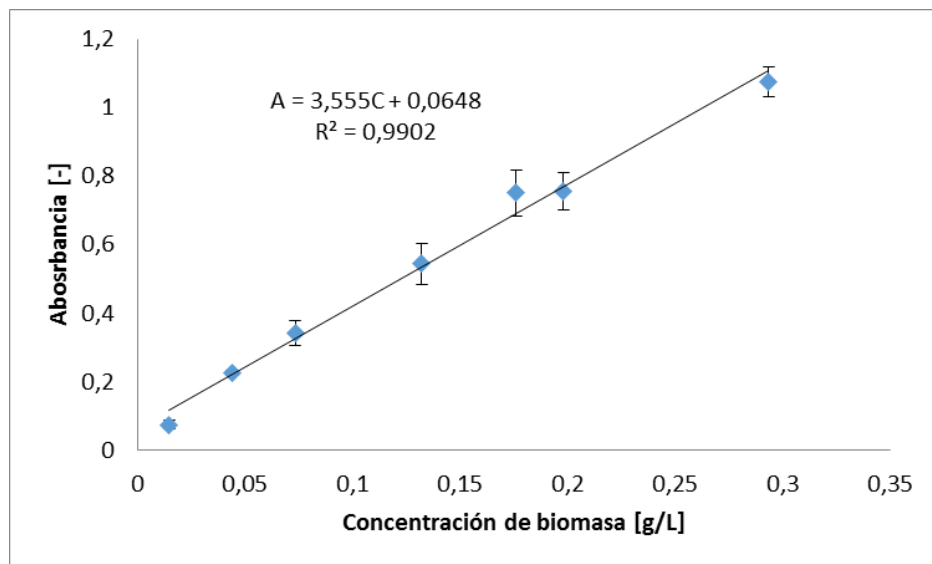


Figura 9.1. Curva de calibración para conocer la biomasa durante el cultivo. Fuente: Elaboración propia.

9.1.2 Curva de calibrado de glucosa

Para generar esta curva de calibración se necesita de un espectrofotómetro, glucosa, reactivo DNS, agua destilada, tubos falcon de 15 [ml], matraces aforados de 50 [ml] y 1000 [ml] y se siguen los siguientes pasos:

- Se pesan 1,8016 [g]. de glucosa y se disuelve en agua destilada hasta completar 1 [L]. de volumen, generando así una solución de 0,01 [M].
- Se toman alícuotas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 [ml], se traspasan a matraz de aforo de 50 [ml] y se adiciona agua destilada hasta completar este volumen, generando soluciones de 0,001; 0,002; 0,003; 0,004; 0,005; 0,006; 0,007; 0,008 y 0,009 [M].
- Se toma 1 [ml] de cada una de las soluciones de calibración y de agua destilada (blanco de reactivo) en duplicado y se lleva a cabo el método DNS.
- Los valores obtenidos, presentan un error porcentual de 2,25, y su tendencia se ve representada a continuación:

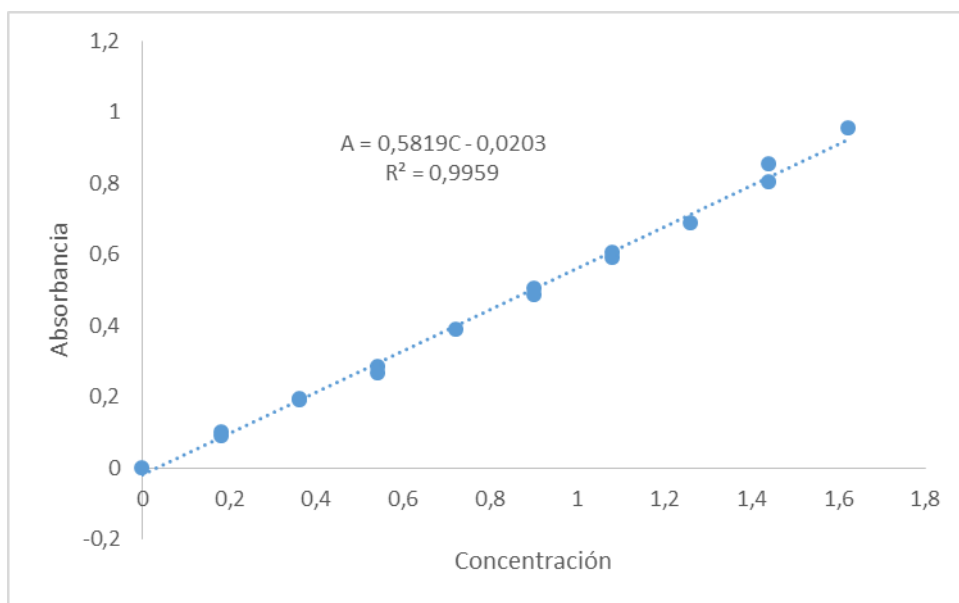


Figura 9.2. Curva de calibración de glucosa. Fuente: Elaboración propia.

9.1.3 Curva de calibrado amonio

- Se preparan 100 [ml] de solución estándar de sulfato de amonio de concentración 1 [g/L] con agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
 - Se hacen diluciones de la solución estándar entre 0,008 y 0,19 [g/L].
 - Se toman 25 [μL] de cada dilución anterior y se colocan en tubos de 15 [ml], además de un tubo con 25 [μL] solo con agua desionizada tipo II (agua Milli Q) que sirve de blanco.
 - Luego se mezcla con 1 [ml] de la solución A y agita en un vortex, posteriormente se adiciona 1 [ml] de solución B y agita nuevamente.
 - Se envuelven los tubos en papel de aluminio para protegerlos de la luz y luego se disponen en un baño de agua a 25°C por 30 minutos.
 - Se mide absorbancia de cada tubo a 650 [nm] usando como blanco la solución con solo agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
- Se obtuvo la siguiente curva con un error porcentual asociado del 2,02% (Figura 8.3).

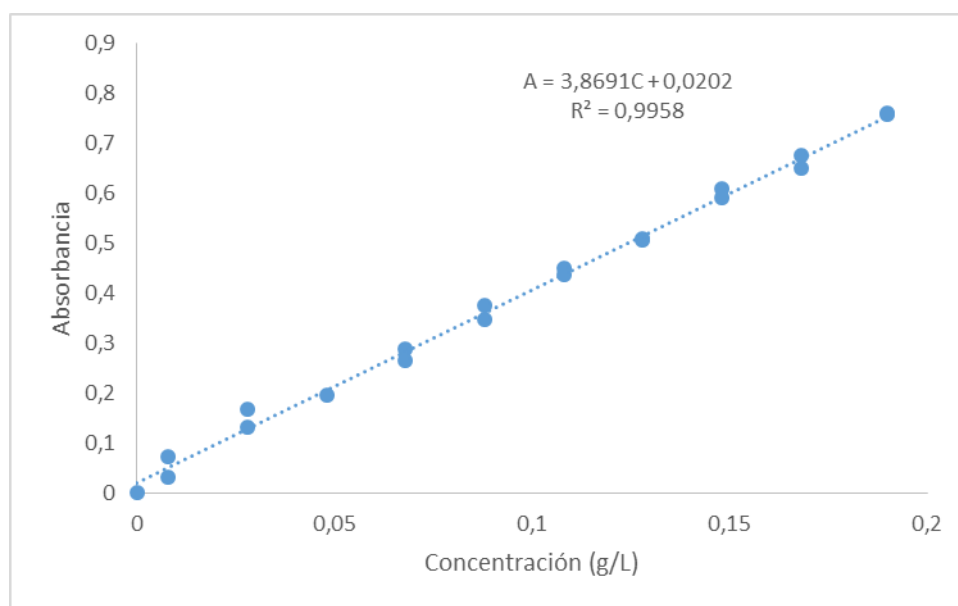


Figura 9.3. Curva de calibración amonio para conocer su evolución durante el cultivo. Fuente: elaboración propia

9.1.4 Curva de calibrado PHB

En primer lugar, se preparó una muestra estándar de ácido crónico de concentración de 218 mg/L, la cual se diluyó en concentraciones de 2, 20, 60, 100, 140 y 180 [mg/L], para elaborar la curva de calibrado mostrada en la Figura 51. Las diluciones de realizaron con agua mili Q. Cada muestra debe ser filtrada con un filtro de tamaño de poro de 0,22 [μm] antes de ser inyectada al sistema de medición.

Se analizan las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer. Se utiliza una longitud de onda de 215 [nm], con ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvil, un volumen de inyección de 20 [μL], a una temperatura de trabajo de 35 °C y un flujo de 0,6 L min^{-1}

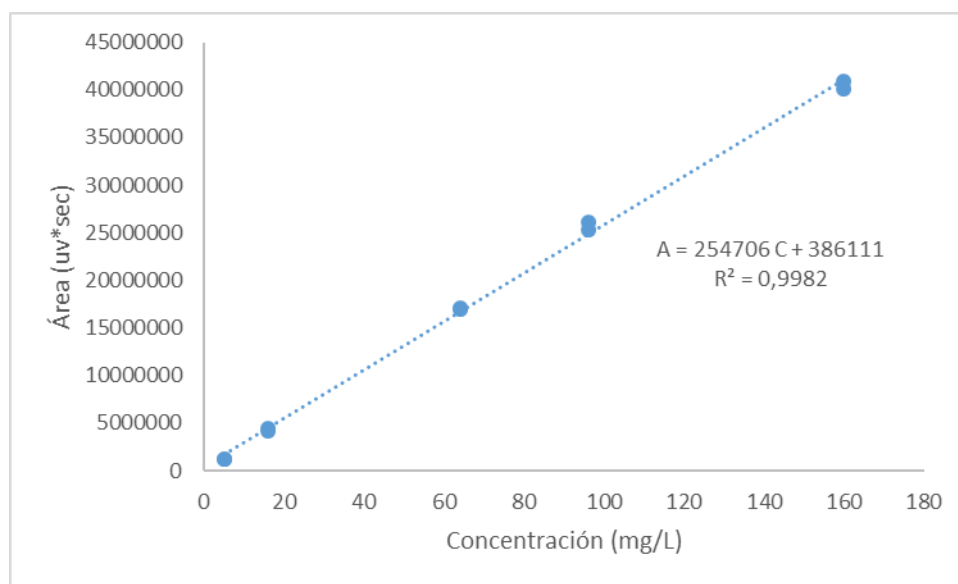


Figura 9.4. Curva de calibración de ácido crónico para conocer la cantidad de PHB contenido en las muestras durante el cultivo. Fuente: Elaboración propia.

9.2 Métodos analíticos cuantitativos

9.2.1 Determinación del crecimiento microbiano por espectrofotometría y peso seco

9.2.1.1 Por espectrofotometría:

Materiales y equipos: Agua destilada, espectrofotómetro y matraces aforados.

Procedimiento:

- Se toma un volumen menor o igual a 1 [ml] de caldo de cultivo y se diluye entre 2 y 10 veces con agua destilada.
- Se mide absorbancia a 540 [nm] usando como blanco agua destilada.
- El valor obtenido de absorbancia se extrapola en la curva de calibrado de biomasa.

9.2.1.2 Por peso seco:

Materiales y equipos: Tubos falcón de 30 [ml], EDTA 0,1 [M], NaCl 1 [M], capachos de aluminio, centrifuga, estufa y balanza analítica

Procedimiento:

- Se toman 10 [ml] de caldo de cultivo y se le agrega 1 [ml] de EDTA 0.1 [M] y 1 [ml] de NaCl 1 [M].
- Se centrifuga a 10000 [rpm] por 10 [min].
- Se lava el pellet de biomasa repitiendo los pasos anteriores 3 veces.
- El pellet obtenido se deposita en capachos de aluminio previamente secados a 80 °C hasta peso constante y pesado.
- Por diferencia del peso del capacho antes de colocar la muestra y luego de secar la muestra a 80°C hasta peso constante y considerando el volumen de 10 [ml], se obtiene la concentración celular.

9.2.2 Determinación de la cantidad de azúcares reductores

Materiales y equipos

Espectrofotómetro, reactivo DNS, NaOH al 10% m/v, agua destilada, tubos falcon de 15 ml, gotario, matraces aforados de 10, 50 ml y 1000 ml.

Procedimiento

- Se transfiere 1 [ml] de muestra diluida convenientemente a tubos falcon de 15 [ml], se adicionan 3 gotas de NaOH al 10% m/v y 1 [ml] de reactivo DNS.
- Se homogeneiza la solución y se deja a ebullición durante 5 minutos.
- Una vez transcurrido el tiempo anterior, se retiran los tubos falcon del agua caliente y se enfría en baño con hielo durante 5 minutos.

- Se traspasa la solución resultante a un matraz aforado de 10 ml y se completa con agua destilada hasta este volumen.
- Se deja reposar durante 15 minutos y se lee la absorbancia de cada muestra, a una longitud de onda de 540 [nm], frente a un blanco con agua.

9.2.3 Determinación de la cantidad de amonio por el método de fenolhipoclorito

Materiales y equipos: Se utilizan dos soluciones que se denotan con la letra A y B, las cuales se preparan de la siguiente forma:

Procedimiento:

Solución A:

- Se pesan 2,5 g de fenol bajo campana y se disuelven en 100 [ml] de agua desionizada tipo II (agua Milli Q) en un vaso precipitado de 250 [ml].
- Se pesan 0,0127 [g] de nitroferriicianuro de sodio y se agregan a la solución anterior agitando para asegurar la homogeneidad de la solución.
- Se traspasa la solución a un matraz de aforo de 250 [ml] y se afora con agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
- La solución se almacena a 4 °C en una botella ámbar envuelto en papel aluminio. Esta solución no dura más de 1 mes.

Solución B:

- Se pesan 1,25 [g] de hidróxido de sodio y disuelven en 100 [ml] de agua desionizada tipo II (agua Milli Q) en un vaso precipitado de 250 [ml].
- Se miden 3,46 [ml] de cloro comercial y se agregan a la solución anterior agitando para asegurar la homogeneidad de la solución.
- Se traspasa la solución a un matraz de aforo de 250 [ml] y se afora con agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
- La solución se almacena en una botella ámbar envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente. Esta solución se descompone fácilmente.

Medición de amonio:

- Se toman 25 [μL] de sobrenadante convenientemente diluido con agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
- Se realiza un blanco con agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
- Luego se mezcla con 1 [ml] de la solución A y agita en un vortex.
- Se adiciona 1 [ml] de solución B y agita nuevamente en un vortex.
- Se envuelven los tubos en papel de aluminio para protegerlos de la luz y se disponen en un baño de agua a 25 °C por 30 minutos.
- Se mide la absorbancia de cada tubo a 635 [nm] usando como blanco la solución con solo agua desionizada tipo II (agua Milli Q).
- Los valores obtenidos de absorbancia se extrapolaron en la curva de calibrado de amonio.

9.2.4 Determinación de la cantidad de PHB por hidrolisis ácida

Materiales y equipos: Ácido crotonico, Ácido sulfúrico, tubos eppendorf de 1,5 [ml], balanza analítica, Shaker orbital, filtros de jeringa de PDVF con un tamaño de poro de 0,22 [µm], HPLC acoplado a un detector UV.

Procedimiento:

- Para esto se pesaron entre 2,5 y 3,5 [mg] de biomasa seca en los tubos eppendorf y se le adicionó 1 [ml] de ácido sulfúrico concentrado (marca Winkler).
- La mezcla se incubó a 90 °C y 700 rpm durante 1 h, en un Thermo-Shaker marca biosan modelo TS-100.
- Las muestras se dejan enfriar y se diluyen diez veces con agua Mili Q.
- Se filtran las muestras utilizando los filtros de jeringa
- Se analizan las muestras ya filtradas por un sistema HPLC con una columna Aminex HPX-87H marca Bio-rad, acoplado a un detector UV Serie 200, marca Perkin Elmer. Se utiliza una longitud de onda de 215 [nm], con ácido sulfúrico 0,005 [M] como fase móvil, un volumen de inyección de 20 [µL], a una temperatura de trabajo de 35 °C y un flujo de 0,6 [L min⁻¹].
- Los valores obtenidos se interpolan a la curva de calibrado de ácido crotonico.

9.2.5 Determinación de la cantidad de nitrógeno asimilable con potenciómetro

Materiales y equipos: Vaso de muestreo, bureta respectiva, conectada a las soluciones estandarizadas, Probeta 100 [ml] con agua destilada

Procedimiento:

- Se enciende el titulador automático, Titroline easy, y se calibra con los buffer 7-10. Al calibrar se debe tener la precaución de lavar y secar el electrodo, cada vez que se cambie.
- Para medir se debe tomar una muestra de 3 [ml] y se adiciona agua destilada hasta los 60 [ml], aproximadamente.
- Para poder medir se introduce el electrodo en el vaso con la muestra y se agita el vaso con ayuda de un imán. Se debe ajustar el pH a 8.
- Una vez que se llegue a pH 8, se adiciona formalina 37% (ajustada a pH 8) y se vuelve a titular hasta pH 8.
- Termina la titulación cuando la solución llega a pH 8.
- Se limpia el equipo con agua destilada, dejando nuevamente el pH-ímetro en la solución estándar
- El nitrógeno asimilable se calcula según:

$$\text{Nitrógeno asimilable} \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{V_{NaOH}[ml] \cdot C_{NaOH}[N] \cdot 14 \left[\frac{g}{mol} \right] \cdot 1.000 \left[\frac{mg}{g} \right]}{V_{muestra}[ml]} \quad (9)$$

9.3 Preparación reactivo DNS

La solución de DNS se prepara pesando 1,6 [g] de hidróxido de sodio, 30 [g] de tartrato de sodio y 1 [g] de reactivo DNS de la siguiente manera:

- En un vaso precipitado de 200 [ml] se adicionan 50 [ml] de agua destilada en donde se disuelve el hidróxido de sodio y el tartrato de sodio.
- La solución se calienta con agitación en una manta calefactora y se le agrega lentamente el reactivo DNS, una vez disuelto se pone a temperatura ambiente y se deja enfriar.
- La solución se afora a 100 [ml] y con agua destilada.
- Se almacena el reactivo DNS protegido en una botella ámbar envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente.

9.4 Modo de uso de sensores de oxígeno

- Primero se debe pegar el sensor y el adaptador de la sonda en el matraz o reactor donde será utilizado, con SPGLUE.
- Se debe conectar la sonda al equipo Firesting y al computados por medio de la entrada USB.
- Se abre el programa que está midiendo inmediatamente y se para la medición.
- Se ajustan las opciones de Settings, tales como la unidad en que se medirá el oxígeno, la fase, el código del sensor (que está en el envase de fábrica) y el largo de la fibra, que en este caso corresponde a 1 metro.
- Luego se calibra en la opción Calibrate con el matraz o reactor sin medio. Lo más simple es calibrar en Custom mode, se activa la opción wáter DO ya que posteriormente se medirá oxígeno disuelto en un líquido, se setean las condiciones y se calibra con la opción Set Air.
- Se termina con el botón Finish.
- Para empezar mediciones se selecciona la opción Log to file para guardar los datos y posteriormente en Mesasurement se inicia la medición.

9.5 Recuperación y extracción del PHB

Para la recuperación del biopolímero a partir de la biomasa húmeda del último cultivo se realizaron los siguientes pasos:

- En primer lugar se realizaron tres lavados con agua destilada en la centrifuga de la figura 4.16.
- Posteriormente se realizó una digestión con hipoclorito de sodio al 30 % v/v .
- Se utilizaron 50 [ml] de dicha solución de $NaClO$ por cada gramo de biomasa que se quiera tratar. Conociendo el valor de la concentración final de biomasa obtenida, y el volumen que se tratará en este procedimiento, se agregó la cantidad suficiente de hipoclorito de sodio y se dejó digerir bajo campana por 1 hora.
- Transcurrido dicho tiempo, se separó por centrifugación el PHB existente junto con los residuos celulares, del líquido sobrenadante lavando con agua destilada 3 veces.
- Posteriormente se realizaron 3 lavados más, pero esta vez con acetona, en una relación de 10 ml de este compuesto, por cada gramo de biomasa del cultivo que se encuentra en tratamiento.
- Luego, se deja el producto en una estufa secadora a 60°C por 18 horas mínimo.
- Finalmente, se puede realizar la extracción del PHB utilizando cloroformo. Por cada 150 [mg] de masa a tratar, se utilizan 10 [ml] de cloroformo, se disuelve, con ayuda de calor si es necesario.
- Una vez disuelto, se dispone sobre una placa petri y se deja secar, para obtener un film de plástico biodegradable, luego de evaporado el cloroformo.