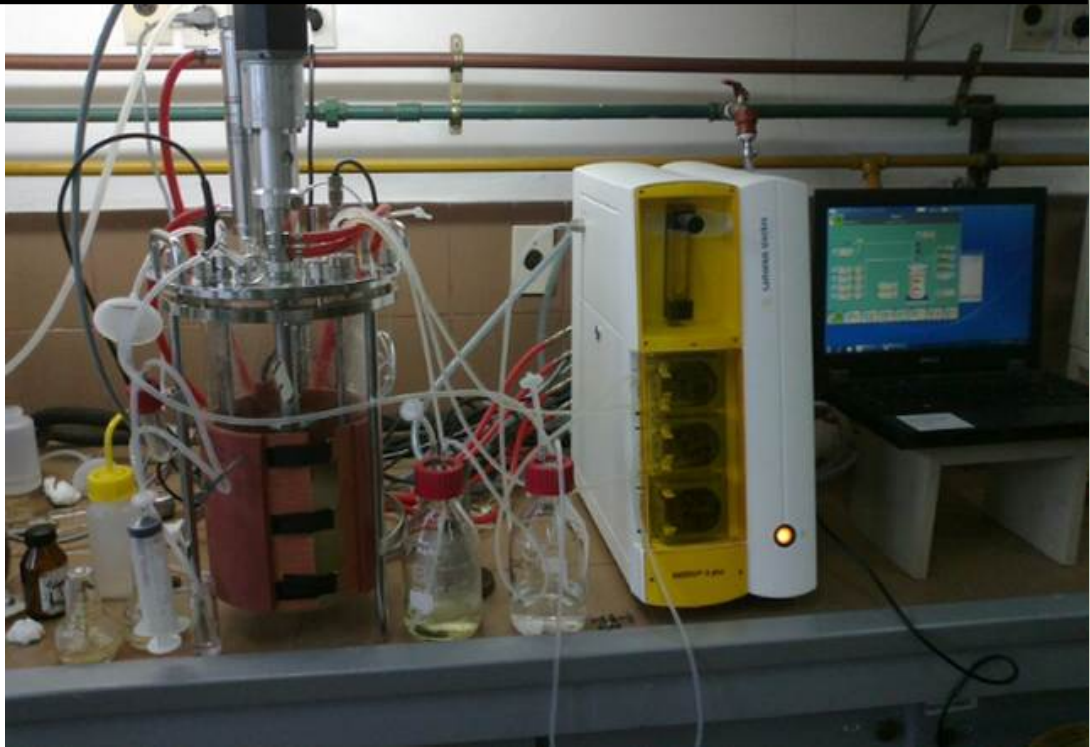


Maestría en Biotecnología – Facultad de Ciencias - Udelar

2013

Producción de Plásticos Biodegradables en Bacterias



Ing. Guadalupe Martínez

Tutora: Dra. Lyliam Loperena

Para Aurelio

AGRADECIMIENTOS

Dra. Lyliam Loperena y el Departamento de Bioingeniería.

ANII por la financiación

Resumen

El futuro agotamiento de los recursos fósiles y los problemas de disposición final de los plásticos petroquímicos, están incrementando el interés en el mercado por los plásticos biodegradables. El mayor inconveniente en la penetración en el mercado de estos productos es su alto costo respecto a los derivados petroquímicos. Entre los plásticos biodegradables, los polihidroxialcanoatos (PHAs) son una familia diversa de poliésteres sintetizados por una amplia gama de microorganismos. Los PHAs son acumulados intracelularmente como respuesta a un desbalance de nutrientes en su ambiente, constituyendo una reserva de fuente de carbono y energía para su sobrevivencia durante periodos de escasez. Una de las áreas de oportunidad para mejorar la economía del proceso global se centra en encontrar fuentes de carbono económicas, provenientes muchas veces de subproductos. El crecimiento de la industria del biodiesel a nivel mundial ha generado una sobreproducción de glicerina, con la consiguiente baja de su precio debido a las impurezas presentes. Dado que el precio actual del glicerol se ha vuelto muy competitivo respecto a los azúcares usados para la producción de químicos y combustibles, la vía de fermentación microbiana es una opción para su aprovechamiento que está siendo re-evaluada. En el presente trabajo se seleccionan microorganismos productores de PHAs y se optimiza el medio de cultivo, utilizando como fuente de carbono glicerol y metanol (modelado como subproducto del biodiesel). La optimización se realiza utilizando un diseño experimental, a distintas escalas comenzando con matraces hasta escala de fermentadores de laboratorio.

De las cepas estudiadas, únicamente dos cepas fueron capaces de acumular PHAs utilizando como fuente de carbono el efluente modelo: *Ralstonia eutropha* DSM 545 y *Metilobacterium extorquens* DSM 1340. Se obtuvieron las formulaciones del medio de cultivo para ambas cepas que optimizan la producción de PHAs mediante la evaluación de diferentes respuestas. Se determinó que *R. eutropha* DSM 545 ofrece mejores características como productora de PHAs que *M. extorquens* DSM 1340, por obtenerse una mayor productividad volumétrica de generación de PHA (0.015 g/L.h en *R. eutropha* DSM 545 y 0.0051 g/L.h en *M. extorquens* DSM 1340). Dado que *R. eutropha* DSM 545 no consume metanol, y éste es inhibitorio de su crecimiento, se evaluó la producción de PHAs en cultivos mixtos de ambas cepas, la productividad volumétrica de producción alcanzada resultó menor (2.5 E-3 g/L.h) a la productividad obtenida en los cultivos con las cepas puras.

Se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos que representan el proceso, a partir de cultivos en modalidad batch, (realizados en bioreactor de laboratorio) de *Ralstonia eutropha* DSM 545, utilizando un medio modelado de glicerol crudo como fuente de carbono para producir PHAs. El crecimiento del microorganismo es descrito por la cinética de Khanna con doble limitación de fuente de carbono y fuente de nitrógeno y con inhibición por metanol. A partir de este modelo se realizaron simulaciones de producción batch y fedbatch, con dos fuentes de carbono: medio modelado de glicerol crudo y glicerol sin metanol. El mejor desempeño se alcanzó en un sistema fedbatch con alimentación continua, llegándose a obtener 0.23 g/Lh de PHAs, utilizando como fuente de carbono glicerol sin metanol. Este modelo podrá ser utilizado como base, para plantear otras estrategias de producción y para realizar una evaluación económica financiera del proceso.

Prefacio

El presente trabajo se encuentra dividido en ocho capítulos. En los primeros tres, se realiza la revisión bibliográfica referente a los plásticos degradables, polihidroxicanoatos, con énfasis en su producción a partir de glicerol subproducto de la generación de biodiesel.

En los capítulos cuatro a siete, se desarrollan los objetivos planteados en el proyecto de tesis de Maestría en Biotecnología:

1. Selección de una cepa productora de PHAs.
2. Optimización del medio de cultivo a escala de matraces.
3. Optimización de las condiciones y modalidad de producción de PHAs utilizando glicerol crudo como sustrato.

Cada uno de estos capítulos, cuenta con las secciones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones.

En el Capítulo 8, se realiza una evaluación general del trabajo y sus perspectivas.

INDICE GENERAL

<i>Agradecimientos</i>	<i>ii</i>
<i>Resumen</i>	<i>iii</i>
<i>Prefacio</i>	<i>v</i>
<i>Índice General</i>	<i>vii</i>
<i>Capítulo 1. Plásticos biodegradables</i>	<i>1</i>
<i>Capítulo 2. Polihidroxialcanoatos</i>	<i>12</i>
<i>Capítulo 3. Producción de polihidroxialcanoatos a partir de glicerol crudo</i>	<i>39</i>
<i>Capítulo 4. Screening de cepas</i>	<i>52</i>
<i>Capítulo 5. Optimización del uso de glicerol crudo en la formulación del medio de cultivo</i>	<i>64</i>
<i>Capítulo 6. Evaluación de cultivo mixto</i>	<i>123</i>
<i>Capítulo 7. Optimización de la producción</i>	<i>130</i>
<i>Capítulo 8. Perspectivas</i>	<i>159</i>
<i>Anexo: Técnicas Analíticas</i>	<i>161</i>
<i>Anexo Capítulo 5</i>	<i>177</i>
<i>Anexo Capítulo 7</i>	<i>195</i>
<i>Abreviaturas y Nomenclatura</i>	<i>205</i>
<i>Resumen presentado en congreso XXI ALAM Santos, Brasil (2012).</i>	
<i>Trabajo completo Congreso V Encuentro Regional XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay (2012).</i>	

Capítulo 1

Plásticos Biodegradables

TABLA DE CONTENIDO

1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS PLÁSTICOS PETROQUÍMICOS	3
2. PLÁSTICOS BIODEGRADABLES.....	5
2.1. Definición e Importancia.....	5
2.2 Clasificación.....	8
2.3. Mercado y perspectivas	8
3. BIBLIOGRAFÍA.....	11
Figura 1. Evolución de la producción de plásticos desde 1950 (Plastics Europe).....	3
Figura 2. Ciclo de vida de bioplásticos.....	6
Figura 3. Capacidad de producción global de bioplásticos. European Bioplastics	9
Tabla 1. Clasificación de Bioplásticos.....	8
Tabla 2. Productores de Bioplásticos.....	10

1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS PLÁSTICOS PETROQUÍMICOS

En el periodo 1930-1940 se inició el desarrollo comercial de los plásticos petroquímicos. La segunda guerra mundial en 1939, generó una gran demanda de plásticos como sustitutos de diversos materiales como las gomas naturales. En Estados Unidos se creó un programa de investigación y desarrollo que llevó a la producción de diversos plásticos sintéticos. A partir de la década del 70, la producción en gran escala de estos materiales disminuyó su costo. Los nuevos plásticos comenzaron a competir con materiales tradicionales como la madera, papel, metales, vidrio y cuero. La posibilidad de realizar aleaciones y mezclas entre diferentes polímeros hizo posible generar plásticos con propiedades que las resinas por si mismas no tendrían, aumentando el rango de posibles aplicaciones. La demanda de plásticos aumentó desde entonces hasta nuestros días, éstos se han convertido en un commodity para mejorar el confort y calidad de vida, siendo parte esencial en casi todas las industrias (Plastic industry trade asociation 2012) (Luengo, y otros 2003).

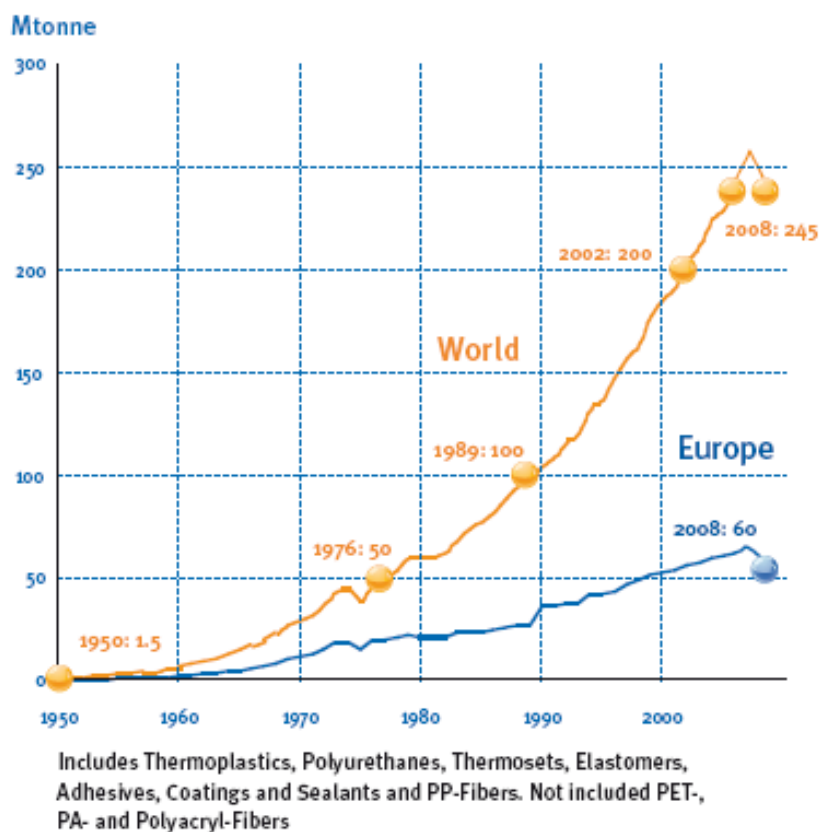


Figura 1. Evolución de la producción de plásticos desde 1950 (Plastics Europe¹)

¹ *PlasticsEurope* es una asociación comercial de la Unión Europea y sede en Bruselas con representantes de los 27 Estados miembros de toda la Unión Europea. *PlasticsEurope* ha desarrollado una estrecha colaboración con las asociaciones que representan la cadena de fabricación de plásticos europeos, que incluye 50.000 convertidores y más de 1.000 fabricantes de maquinaria. También, *PlasticsEurope* es la voz oficial de los fabricantes de plásticos europeos.

Desde 1950, en el mundo ha habido un incremento medio anual en la producción y el consumo de plásticos del 9%. Esto ha sido impulsado por un amplio historial de innovación continua. De 1,5 millones de toneladas en 1950, la producción mundial total alcanzó 245 millones de toneladas en 2008 (Figura 1). Este crecimiento se invirtió en 2008 como consecuencia directa de la crisis financiera mundial. Un análisis del consumo de materiales plásticos sobre una base per cápita muestra que se consumen aproximadamente 100 kg al año en el TLCAN (Tratado de Libre Comercio de América del Norte) y Europa Occidental. Estas regiones tienen el potencial de crecer a aproximadamente 140 kg per cápita para el año 2015. El área con mayor potencial de crecimiento se encuentra en los países asiáticos (excluido Japón), donde el consumo por habitante es sólo alrededor de 20 kg anuales. (Plastics Europe 2009).

Los plásticos generan muchos beneficios para la sociedad y ofrecen futuros avances tecnológicos y médicos. Sin embargo, las preocupaciones sobre su uso y eliminación son diversas e incluyen: la acumulación de residuos en vertederos, en hábitats naturales, problemas físicos para la vida silvestre resultante de la ingestión o atrapamiento en plástico, la lixiviación de sustancias químicas de productos plásticos y potencial transferencia de éstos hacia la vida silvestre y los seres humanos. La preocupación más importante, está implícita en el volumen producido, ya que su uso actual no es sostenible. Alrededor del 4 por ciento de la producción mundial de petróleo se utiliza como materia prima para hacer plásticos y una cantidad similar se utiliza como energía en el proceso. Más de un tercio de la producción actual se utiliza para fabricar artículos de embalaje, que luego son rápidamente descartados. La disminución de las reservas de combustibles fósiles, la capacidad finita para la eliminación de residuos no degradables en vertederos, las limitaciones del reciclado mecánico y químico, hacen que la utilización lineal de hidrocarburos, a través de envases y otras aplicaciones de corta duración, simplemente no sea sostenible (Thompson, y otros 2009).

La cantidad de plásticos producidos en los primeros 10 años del presente siglo casi iguala a la cantidad producida en todo el siglo que precedió. El carácter no biodegradable de los polímeros de origen petroquímico necesariamente llevará a restricciones en su uso futuro, así mismo el incremento del precio de petróleo y su escasez promueven la generación de materiales alternativos a partir de sustratos renovables.

2. PLASTICOS BIODEGRADABLES

2.1. Definición e Importancia.

Existen diversos enfoques en cuanto a la definición y clasificación de plásticos biodegradables o bio materiales. Se citan a continuación diferentes definiciones:

- *Los plásticos biodegradables son materiales capaces de descomponerse en condiciones aerobias o anaerobias por acción de microorganismos tales como bacterias hongos y algas. Son degradados por acción enzimática de los microorganismos bajo condiciones normales del medio ambiente. Son obtenidos usualmente por vía fermentativa y se los denomina también biopolímeros. Los términos biodegradación, materiales biodegradables y compostabilidad son frecuentemente mal utilizados. El término biodegradable en sí mismo no es útil ya que significa que en la biosfera existe al menos una enzima capaz de acelerar la escisión de los enlaces químicos de una cadena polimérica dada. Esto no significa que efectivamente se lleve a cabo la degradación del material, ya que para que esto ocurra deben estar dadas las condiciones ambientales requeridas, el término biodegradable, no implica que el proceso ocurra a alta velocidad. Es necesario completar la información especificando las condiciones y el tiempo necesario para que ocurra la biodegradación. (Department of Dairy and Food Science 2000)*
- *Los bio-materiales son productos naturales sintetizados y catabolizados por diferentes organismos y con diferentes aplicaciones biotecnológicas. Éstos pueden ser asimilados por muchas especies (biodegradable) sin causar efectos tóxicos en el huésped (biocompatibles). Los bioplásticos son considerados un tipo de biomaterial. (Luengo, y otros 2003)*
- *Los plásticos bio-basados, se definen como aquellos elaborados por el hombre o producidos por macromoléculas orgánicas procesadas derivadas de recursos biológicos, utilizados para la elaboración de plásticos o fibras. Los plásticos bio-basados pueden ser biodegradables, parcialmente biodegradables o no degradables. (Shen, Hauge y Patel 2009).*

Los biopolímeros son una clase diversa y versátil de plásticos biológicamente degradables construidos a partir de almidón, azúcares, celulosa, proteínas o poliláctidos (CBI Market Information Database 2006) que tienen potenciales aplicaciones en muchos sectores de la economía. Actualmente muchos biopolímeros aún se encuentran en etapa de desarrollo, pero están emergiendo importantes aplicaciones en envases y medicina. Algunos biopolímeros pueden reemplazar directamente a los plásticos petroquímicos en aplicaciones tradicionales, mientras otros poseen propiedades únicas que pueden generar un nuevo rango de oportunidades comerciales (Frost y Sullivan 2001).

El ciclo de vida de los bioplásticos se asemeja al ciclo del carbono en la naturaleza donde 100 millones de toneladas de biomasa se producen anualmente a partir de plantas, utilizando la luz solar y la fotosíntesis. La misma cantidad se biodegrada de nuevo en los materiales de origen, el dióxido de carbono (CO₂) y agua, junto con pequeñas cantidades de biomasa y minerales.

Esto se produce principalmente a través de la degradación biológica a través de numerosos microorganismos. El objetivo de la industria de los bioplásticos es imitar este circuito cerrado, ya que representa el medio por el cual las emisiones de CO₂ ambientalmente dañinas, pueden ser reducidas y los recursos fósiles conservados para las generaciones futuras (European Bioplastics 2012) (Figura 2).

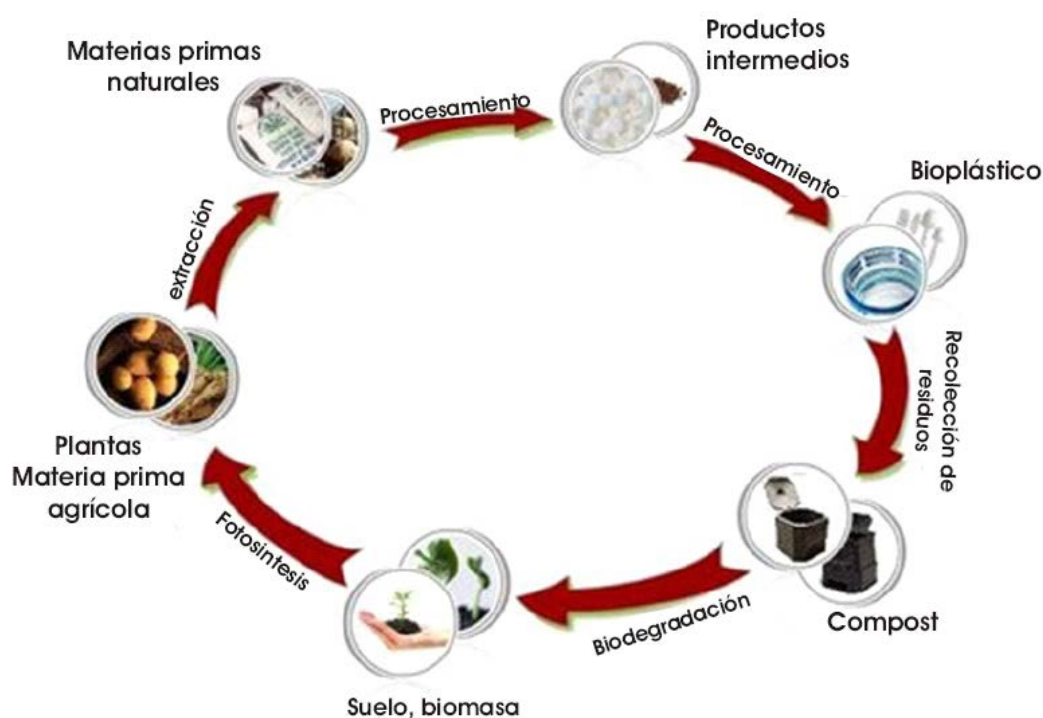


Figura 2. Ciclo de vida de bioplásticos

La gran ventaja de los bioplásticos, es la conservación de los recursos fósiles y la reducción de las emisiones de CO₂ siendo una de las innovaciones más importantes para el desarrollo sostenible. Los plásticos petroquímicos, con un consumo global actual de más de 250 millones de toneladas y un crecimiento anual de aproximadamente 5%, constituyen el principal campo de aplicación del petróleo crudo, luego de la energía. Este 5% del consumo de petróleo crudo puede parecer relativamente pequeño, sin embargo, hace hincapié en la dependencia de la industria del plástico con el petróleo. Los aumentos de precios en el petróleo crudo y gas natural causado por la fuerte demanda y los conflictos políticos, tienen un marcado efecto en el mercado de plásticos. Cada vez es más importante y urgente para esta rama de la industria la utilización de materias primas alternativas (European Bioplastics 2012).

En la actualidad los diferentes tipos de bioplásticos disponibles cubren aproximadamente un 5-10% del mercado de los plásticos actuales. Además, hay aplicaciones completamente nuevas, tales como films compostables. Este potencial técnico está lejos de aprovecharse plenamente, el desarrollo de los bioplásticos apenas está comenzando. El mercado está creciendo en muchas áreas de aplicación, por ejemplo envases o películas agrícolas, el número y la cantidad

está aumentando significativamente. Las estrategias exitosas de mercadeo se basan en la utilización inteligente de la funcionalidad de los materiales y el atractivo para el consumidor a través de la imagen altamente positiva. El Eco-Etiquetado ha sido desarrollado para ayudar al consumidor en el reconocimiento de los productos y diferenciarlos de los plásticos convencionales (European Bioplastics 2012).

La competitividad de los bioplásticos ha mejorado mucho en los últimos años. Esto no sólo es debido al hecho de que los plásticos convencionales se han convertido en caros. Las características técnicas de recuperación después de consumo también pueden representar una ventaja económica. La mayoría de los productos siguen siendo más caros que las fabricadas con plásticos petroquímicos, que han estado en el mercado durante muchos años. Los bioplásticos son actualmente producidos principalmente en pequeñas plantas (capacidad de producción total de más de cinco millones de toneladas en todo el mundo). Sus costos de desarrollo son altos y aún no tienen el beneficio de las economías de escala.

Las condiciones marco (tanto legales como de mercado) juegan un papel importante en esta fase de introducción en el mercado. A diferencia de las áreas de energía renovable y los biocombustibles, no existen condiciones para este tipo de regulaciones. En los distintos países de la UE las primeras iniciativas están surgiendo para facilitar la introducción de los bioplásticos. El hecho de que el riesgo del cambio climático es cada vez más evidente, la dificultad de garantizar el suministro, junto con la evolución de precios de materias primas fósiles representan las razones de peso para fomentar las tecnologías sostenibles. Los bioplásticos tienen un gran futuro por delante. Entre más pronto se comience, mejor (European Bioplastics 2012).

2.2 Clasificación

A continuación se presenta en la Tabla 1, los principales tipos de bioplásticos (Shen, Hauge y Patel 2009).

Tabla 1. Clasificación de Bioplásticos

Grupo	Tipo de polímero	Tipo/estructura/método de producción
Plásticos de almidón	Polisacárido	Almidón parcialmente fermentado. Almidón termoplástico. Almidón químicamente modificado. Resinas compuestas
Polímeros de celulosa	Polisacáridos	Ésteres de celulosa orgánica. Celulosa regenerada
Polilácticos (PLA)	Poliéster	Monómero obtenido por fermentación (ácido láctico) y posterior polimerización química.
Poli(trimetileno tereftalato) (PTT)	Poliéster	1,3-propanodiol obtenido por fermentación y DMT o ácido tereftálico petroquímico
a) PA11	Poliámidas(PA)	Monómero ácido 11-aminodecanoico de aceite de castor
b) PA610		Monómero Acido sebácico de aceite de castor
c) PA6		Caprolactama obtenida a partir de fermentación de azúcares
d) PA66		Monómero ácido adipídico obtenido por fermentación
e) PA69		Monómero obtenido del ácido oleico
Polihidroxialcanoatos (PHAs)	Poliésteres	Polímeros de (R)-hidroxiácidos
Polietileno (PE)	Poliolefina	Monómero: etileno obtenido por fermentación de azúcares
Policloruro de vinilo (PVC)	Polivinilo	Monómero: obtenido de bioetileno

2.3. Mercado y perspectivas

Estadísticas precisas sobre el consumo de biomateriales aún no están disponibles. *European Bioplastics* estima que el mercado para todos los segmentos de aplicación en 2007 fue de aproximadamente 50.000 - 100.000 toneladas en Europa. Las áreas más significativas de la demanda en Europa son:

- Bolsas de residuos compostables.
- Films para envasado, en particular para los productos con una corta vida, tales como productos alimenticios.
- Loose Fill: espuma de almidón utilizado en el transporte de envases.
- Embalaje de servicio: bolsas, productos profesionales para catering, como vasos, platos y cubiertos, películas biodegradables y artículos hortícolas compostables.

Los países europeos con el mayor consumo son Alemania, Inglaterra, Francia, Italia y los Países Bajos.

La capacidad de producción mundial de bioplásticos biodegradables en 2011 asciende a más de 1.161.000 toneladas. Se estima que la capacidad se quintuplique para el año 2016 (Figura 3).

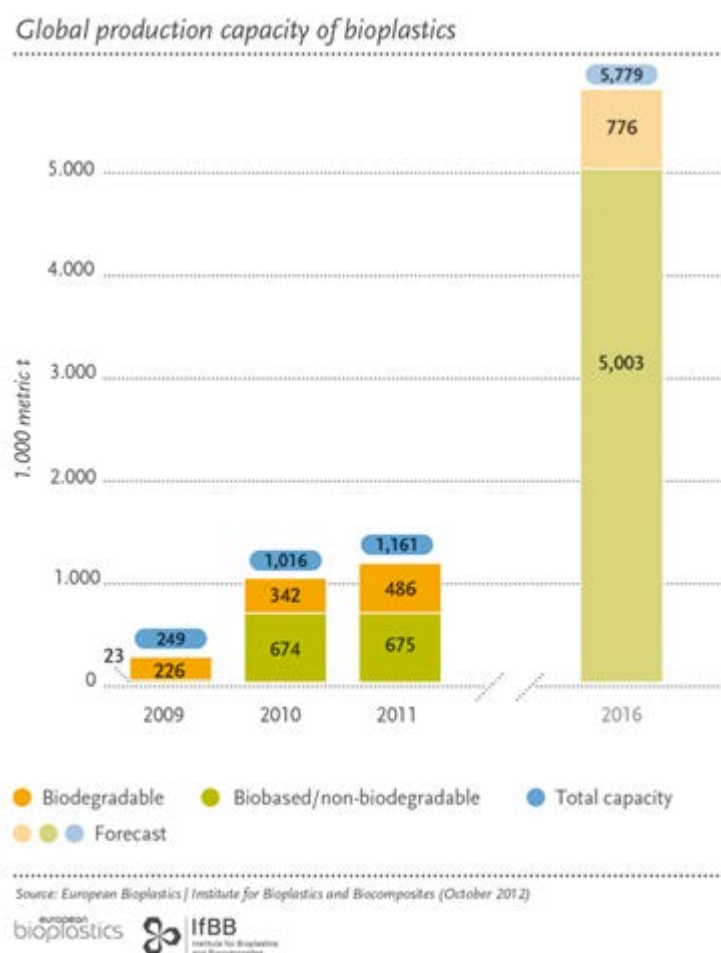


Figura 3. Capacidad de producción global de bioplásticos. European Bioplastics²

² Fundada en Alemania en 1993 como IBAW, *European Bioplastics* hoy representa los intereses de cerca de 70 empresas asociadas en toda la Unión Europea. Con sus miembros: productores de la materia prima agrícola, las industrias química y del plástico, así como usuarios industriales y empresas de reciclaje. *European Bioplastics* sirve tanto como plataforma de contacto y catalizador para el avance de los objetivos de la industria de bioplásticos en crecimiento.

En la tabla 2 se resumen los principales productores de bioplásticos en el mundo.

Tabla 2. Productores de Bioplásticos

Base petroquímica	Productor	Aplicación
Poliéster	BASF (Ecoflex)	Films, moldeo
Base renovable	Productor	Aplicación
Polimeros basados en almidón	Novamont (MaterBi)	Films, moldeo, extrusión
	Rodenburg (Solanyl)	
	Plantic Technologies	
	Bioplast (Biotec)	
	Biop	
Polihidroxialcanoatos (PHAs)	Kaneka	Moldeo, films
	Metabolix	
	Telles	
	PHB Industrial	
Ácido poliláctico (PLA)	NatureWorks PLA	Films, moldeo
	Pyramid Bioplastics	
	Synbra Technologies	
Derivados de celulosa	Innovia Films (NatureFlex)	Films, moldeo, inyección
	FKuR	

3. BIBLIOGRAFÍA

CBI Market Information Database. «Case environmental market opportunities: The use of biopolymers (or bioplastics).» 2006. www.cbi.nl.

Department of Dairy and Food Science. *Biobased Packaging Materials for Food Industry, Department of Food Science*. The Royal Veterinary and Agricultural University, 2000.

European Bioplastics. 2012. www.european-bioplastics.org (último acceso: 15 de Octubre de 2012).

Frost, y Sullivan. *Biopolymers: Sophisticated Materials with Growing Market Potencial*. Technical Insights Inc., 2001.

Luengo, José M, Belén García, Angel Sandoval, Germán Naharro, y Elias R Olivera. «Bioplastics from microorganisms.» *Current Opinion in Microbiology*, 2003: 251-260.

Plastic industry trade asociation. www.plasticsindustry.org. 2012. (último acceso: 2012).

Plastics Europe. «Plastics Europe.» 2009. www.plasticsrecyclers.eu (último acceso: 15 de Agosto de 2010).

Shen, Li, Juliene Hauge, y Martin K. Patel. *Product overview and market project of emerging bio-based plastics*. Universiteit Utrecht, 2009.

Thompson, Richard C., Charles J. Moore, Frederick S. Vom Saal, y Shanna H. Swan. «Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends.» *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2009: 2153-2166.

Capítulo 2

Polihidroxialcanoatos

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. HISTORIA DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS.....	15
3. DIVERSIDAD DE POLIHIDROXIALCANOATOS	18
4. SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS	21
4.1. Producción in vitro:	22
4.2. Producción <i>in vivo</i>	22
4.2.1. Producción por fermentación	22
4.2.2. - Producción en plantas modificadas genéticamente:	23
5. BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN MICROORGANISMOS.....	24
5.1. Enzimas clave en la síntesis de PHAs.....	25
6. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHA.....	27
7. SUSTRATOS PARA PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA	28
7.1. Melazas	29
7.2. Suero de leche.....	29
7.3. Residuos Lignocelulósicos	30
7.4. Glicerol	30
8. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA	30
9. RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN	32
10. APLICACIONES	32
10.1. Industria de embalajes	33
10.2. Aplicaciones en medicina y farmacia	33
10.3. Aplicaciones en la agricultura	33
10.4. Otras aplicaciones	33
11. MERCADO DE PHA.....	34
12. BIBLIOGRAFÍA	35
Tabla 1. Diversidad química de PHAs	19
Tabla 2. Producción de PHAs en plantas modificadas genéticamente.....	24
Tabla 3. Microorganismos productores de PHAs	28
Figura 1. Estructura PHAs.....	18
Figura 2. Estructura química del PHB, PHV y copolímero	21
Figura 3. Formas de producción de polihidroxicanoatos	22
Figura 4. Ruta metabólica de producción y degradación de PHB en <i>Rashtonia eutropha</i> (Graz 2011).....	24
Figura 5. Genes y enzimas involucradas en la síntesis de PHAs	25
Figura 6. Gránulo de PHA.....	27
Figura 7. Consumo de PHA por aplicaciones y región	34

1. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) poseen propiedades fisicoquímicas muy similares a los polímeros petroquímicos. Los PHAs son termoplásticos, como el polipropileno y polietileno, además poseen propiedades antioxidantes, ópticas, piezoeléctricas, pero sus propiedades más importante es que son biodegradables y biocompatibles.

Su estructura y por ende sus propiedades varían ampliamente y son función de: el microorganismo productor, las condiciones ambientales de la biosíntesis y especialmente la fuente de carbono.

La propiedad termoplástica de los PHAs está dada por la estructura lineal de la molécula, siendo una propiedad de alto valor comercial. Los PHAs pueden ser procesados mediante moldeo y extrusión y su formulación requiere de aditivos como ser, estabilizantes, plastificantes, etc.

El Polihidroxibutirato, el PHA más estudiado y caracterizado, posee propiedades mecánicas similares al polipropileno y poliestireno, presentando un mejor desempeño como barrera al pasaje de oxígeno y luz UV; es resistente al agua, al calor y la permeabilidad al vapor de agua es tres veces menor que el polipropileno.

Los PHAs se pueden utilizar en films flexibles de variados espesores, incluyendo membranas semipermeables, filamentos, fibras, materiales para envases, gels y adhesivos.

Dada la similitud de propiedades que presentan los PHAs con los polímeros sintéticos comerciales son aptos para numerosas aplicaciones industriales como ser agricultura, utensilios higiénicos descartables, envases de cosméticos. A su vez, como son resistentes al agua y a la radiación ultravioleta y presentan muy baja permeabilidad al oxígeno y la humedad, son especialmente apropiados como envases para alimentos. Su interés reciente para aplicaciones médicas surge en respuesta a los requerimientos emergentes del campo de la ingeniería tisular donde un amplio rango de polímeros bioabsorbibles están siendo analizados para utilizarlos como soporte tisular. De hecho en los últimos años, los PHAs se han convertido en una de las principales clases de biopolímeros bajo investigación para el desarrollo de productos cardiovasculares y ortopédicos, pues ofrecen propiedades que no son reproducibles en los polímeros sintéticos existentes en el mercado (Williams, y otros 1999).

El principal impedimento de la introducción en el mercado de estos biopolímeros es su costo comparado con sus contrapartes petroquímicas. El interés creciente en la utilización de biopolímeros por su implicancia ambiental; y la posibilidad de mejorar sus costos mediante el aumento en la eficiencia de producción, los establece como materiales prometedores (Volova 2004).

2. HISTORIA DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

En la década del '20, M. Lemoigne descubre el primer PHA al observar que una cepa de *Bacillus megaterium* producía acúmulos de poli-3-hidroxibutirato (Pareja s.f.).

En 1960 la empresa británica Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) comienza el desarrollo industrial de PHA (Biomer 2011).

En 1962 se concede la primera patente para los PHA (Pareja s.f.).

En los '70, muchas compañías inician programas de I&D, como consecuencia de la primera crisis del crudo, estudiando la aplicabilidad de materiales renovables en la producción de plásticos. Al final de la crisis la mayoría de estas empresas detienen tales proyectos. Siendo ICI, PCD Polymer (Petrochemia Danubia) y Linz en Austria (ahora Borealis) las compañías que continúan desarrollando el PHB (Biomer 2011). El concepto de plásticos renovables desaparece de la percepción pública hasta que la presión contra los rellenos sanitarios y la incineración se vuelve opresiva. Es entonces que se recuerda que los bioplásticos son por naturaleza reciclables y biodegradables (Biomer 2011).

En 1975, ICI produce PHA para comercializarlo como botellas, bajo la marca Biopol™. Se trata de un copolímero compuesto por una mezcla de PHB (un homopolímero quebradizo) con polihidroxivalerato (PHV, un copolímero no quebradizo) para crear el producto final poli-β-hidroxibutirato-co-poli-β-hidroxivalerato (PHBV) (Pareja s.f.). La bacteria utilizada en la producción de Biopol acumula PHB solo al final de la fase de crecimiento (Biomer 2011).

Entre los años 1982-88 Chemie Linz y PCD inician un proyecto sobre PHB. PCD introduce una nueva cepa bacteriana que produce PHB durante la etapa de crecimiento de la bacteria, y un proceso de extracción con solventes que soluciona el problema de las impurezas. El PHB así obtenido puede considerarse tan estable térmicamente como los polímeros sintéticos (Biomer 2011).

A finales de los '80, ICI comercializa Biopol™ a escala limitada en Europa, principalmente en Alemania. Este se puede procesar mediante moldeado por extrusión, calandrado, inyección y soplado-extrusión. Este producto tiene características similares al polietileno y polipropileno en flexibilidad y dureza. En 1988 se publica el primer trabajo sobre la expresión de los genes biosintéticos de PHB de *Alcaligenes eutrophus* en *Escherichia coli* (Page 1995).

En el mismo año, comienza la producción a escala piloto en Brasil del homopolímero P(3HB) y el copolímero P(3HB-co-3HV) utilizando como fuente de carbono residuos del procesamiento de la caña de azúcar. Dicho proceso es desarrollado por Copersucar en conjunto con el Instituto Tecnológico de San Pablo y el Instituto Biomédico de la Universidad de San Pablo (Nonato, Mantelatto y Rossell, Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol 2001).

Al principio de los '90, el Instituto de Industria Biológica del Ministerio de Comercio e Industria Internacional (Japón) desarrolla mezclas de PHB y policaprolactona (PCL). Las mezclas pueden

ser procesadas con equipos convencionales, y la relación entre los dos polímeros determina la velocidad de degradación.

Mientras tanto, en Corea se anuncia el desarrollo de PHB. El PHB y sus copolímeros fueron los primeros polímeros biodegradables introducidos en Corea. La empresa Kohap Ltda. anuncia el desarrollo de PHB y más tarde construye una planta piloto. La compañía fomenta la publicidad de los plásticos biodegradables. En 1991 se anuncia la compra de patentes para producir PHA, para mejorar las propiedades del PHB y evitar posibles conflictos de patentes con ICI, U.K (Y. H. Kim 2001).

En el mismo período, la producción estimada de PHBV de ICI era de alrededor de 25 ton/año, y Wella (una compañía Alemana), la emplea en botellas de shampoo con la marca SANARA. El precio del PHBV es de U\$S 16/Kg; mientras que el polipropileno se vende a U\$S 1/Kg (Lee, Review Bacterial polyhydroxyalkanoates 1996).

A pesar de que la relación de precios es desfavorable para el PHBV, ICI anuncia la expansión de su capacidad a 300 ton/año, con planes para la instalación de una planta con una capacidad de 10.000 ton/año en los próximos 3 a 5 años. Se espera que el precio disminuya un 50% cuando se amplíe a la capacidad proyectada.

En 1991, PCD Polymer produce a escala piloto 2 ton/año de PHB (Biomer 2011).

En 1992, ICI comercializa en Norteamérica botellas moldeadas por soplado y por inyección. El mercado potencial estimado para los plásticos biodegradables es de alrededor de 1,5 millones de toneladas por año, siendo esta demanda impulsada por la legislación y por grupos ambientalistas en un intento de proteger la fauna y reducir los residuos plásticos. Los primeros polímeros degradables que entran al mercado son los fotodegradables y las combinaciones de almidón-polietileno, pero su desempeño no es satisfactorio (Page 1995).

En el mismo año se funda la empresa Metabolix (Cambridge, Mass) la cual se enfoca en el desarrollo de cepas microbianas capaces de producir una amplia variedad de PHA, incluyendo copolímeros, a través de fermentación bacteriana con mucha más eficiencia que las cepas salvajes. Actualmente investiga sobre la producción de PHA en plantas transgénicas (Metabolix 2010).

En los siguientes años, ICI deja el campo de los biopolímeros, transfiriendo el Biopol™ a su filial Zeneca, produciendo alrededor de 500 ton/año.

En 1993-94, el Dr. Hänggi (Biomer) compra la cepa bacteriana y la patente de PCD (Biomer 2011).

En 1994-95 se comercializa PHB bajo el nombre comercial de Biomer y se registra su logo mundialmente. Comercializa tres polímeros basados en PHB con diferentes propiedades: Biomer® P209 similar al polipropileno (PP), Biomer® P240 similar al polietileno de baja densidad (PEBD) y Biomer® P226 similar al polietileno de alta densidad (PEAD). Biomer se enfoca en transformar el biopoliéster en un bioplástico mediante el “mezclado” de PHB con plastificantes, agentes nucleantes y otros aditivos para el procesamiento. Todos los aditivos son seleccionados para no poner en peligro la biodegradabilidad bajo ninguna circunstancia.

Biomer desarrolla formulaciones que tienen propiedades mecánicas idénticas a las de PP y PEAD, pero que además son completamente biodegradables (Biomer 2011).

Entre los años 1992-96 en Corea, se realiza un proyecto de investigación nacional de polímeros biodegradables, el cual es financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MOST) en conjunto con varias industrias y organizaciones de investigación. Se trabaja sobre la producción de polímeros derivados del almidón, ácido poliláctico (PLA), PHB, y en métodos de testeo de biodegradabilidad (Y. H. Kim 2001).

En 1996, el Biopol™ se vende a Monsanto Co. (St. Louis, Mo.), la cual continua comercializando el PHBV bajo el mismo nombre. Además de usar bacterias, Monsanto investiga la producción de PHBV en plantas modificadas genéticamente, como soja y canola (Schlechter 2001).

El mercado sigue siendo limitado por el alto precio del PHB comparado a otros materiales. Alrededor de esta época Monsanto anuncia que abandonará la investigación, desarrollo y producción del Biopol™ a finales de 1998 (Metabolix 2010).

En 1999, Consolidated Ecoprogress Technology anunció en conjunto con Johnson & Johnson, el comienzo de la etapa de investigación y desarrollo de pañales y toallas higiénicas para incontinencia biodegradables (Schlechter 2001).

En el año 2000, Brasil patenta la producción y extracción de PHA (PI9103116 y PI9302312) (Nonato, Mantelatto y Rossell, Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol 2001).

A fines de 2001, Procter & Gamble (P&G) finaliza un acuerdo con Kaneka Corp. (Japón) que llevará a la comercialización del poli-(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (PHBH). PHBH será el primer PHA de la familia de polímeros Nodax, con propiedades similares al PEBD de grado estándar. Por otra parte, el copolímero de butirato/ octanoato y el terpolímero butirato/hexanoato/decanoato tienen propiedades similares a LLDPE y PET de alto grado. Pueden ser moldeados o convertidos en films, fibras, tela no tejida, artículos modelados por inyección y soplado.

Actualmente Kaneka se encuentra desarrollando un proceso de manufactura para PHBH para producir cantidades significativas del polímero. P&G proyecta una capacidad de producción de 50.000 ton/año para satisfacer la demanda inicial. En Corea varias industrias e institutos están estudiando la producción de PHB/PHA. Las actividades del departamento de I&D de Biomer se enfocan en fibras naturales compuestas y en films con barrera de oxígeno para empaque de alimentos (Biomer 2011). Tepha en conjunto con Metabolix desarrollan aplicaciones médicas y nuevos heteropolímeros con cadenas laterales más largas (PHA's) o cadenas con uniones no estándares (PHB/4HB) para dispositivos flexibles (Biomer 2011).

Entre de los Institutos que se encuentran desarrollando nuevos materiales y aplicaciones para los PHAs se pueden mencionar: Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS (Rusia), Siberian Technological Institute (Rusia), The Research Institute of Transplantology and Artificial Organs of the RF Ministry Health (Rusia), Institute of Microbiology at Munster

University (Alemania), Laboratory of Membrane Techonlogy at Strathclyde University (Reino Unido) (Volova 2004) (Irigoyen, Herrera y Vallone 2005).

3. DIVERSIDAD DE POLIHIDROXIALCANOATOS

En la naturaleza, algunos microorganismos procariotas responden a incrementos de nutrientes en su ambiente, acumulando nutrientes esenciales para su sobrevivencia durante largos periodos de escasez. Los polihidroxialcanoatos (PHA's) constituyen uno de los compuestos acumulados que se producen intracelularmente. La fuente de carbono asimilada es convertida en hidroxialcanoato, compuesto que finalmente es polimerizado en PHA's de alto peso molecular y es almacenado como gránulos insolubles al agua en el citoplasma (Loo y Sudesh 2007).

Dependiendo del microorganismo y de las condiciones de crecimiento, los PHA pueden consistir en unidades de 3 ó 4 carbonos hasta 14 ó 16 carbonos, con pesos moleculares en el rango de 2E5 a 2E6 Da (Lee, Review Bacterial polyhydroxyalkanoates 1996).

Dada la estereoespecificidad de las enzimas microbianas las unidades monoméricas de hidroxialcanoatos presentan todas ellas configuración D(-) (Lee, Review Bacterial polyhydroxyalkanoates 1996).

Entre las distintas especies de microorganismos, las inclusiones de PHA pueden variar en número y tamaño, llegando a acumular de 8 a 13 gránulos por célula con diámetros de 0.2 a 0.5 μm (Lee, Review Bacterial polyhydroxyalkanoates 1996).

Actualmente se conocen más de 150 variedades de PHA's identificados como homopolímeros y copolímeros. La razón por la cual es posible la formación de diversos tipos de PHA's se debe a la amplia variedad de sustratos específicos para la síntesis de PHA's, y las rutas metabólicas que éstos activan.

La estructura general de los PHAs se resume en el siguiente esquema (Lee, Review Bacterial polyhydroxyalkanoates 1996):

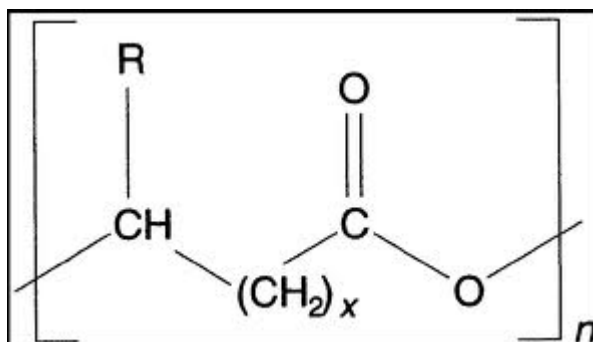
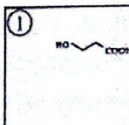
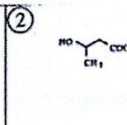
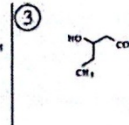
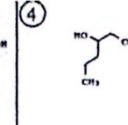
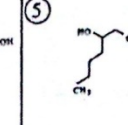
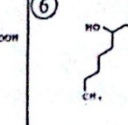
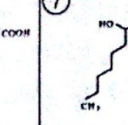
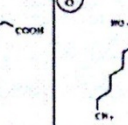
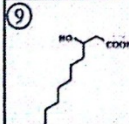
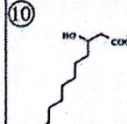
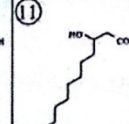

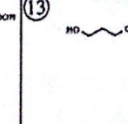
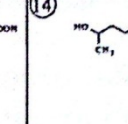
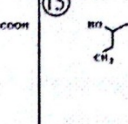
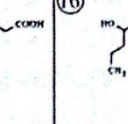
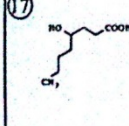
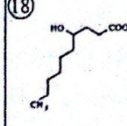
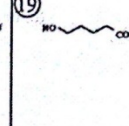
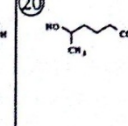
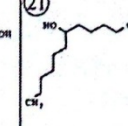
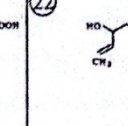
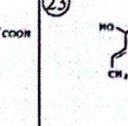
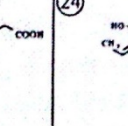
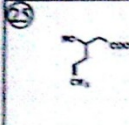
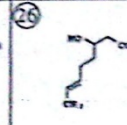

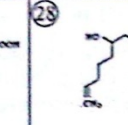


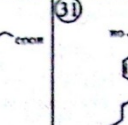



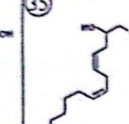
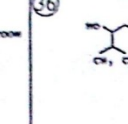
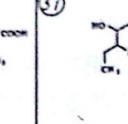
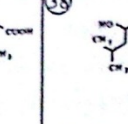
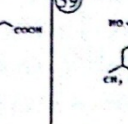
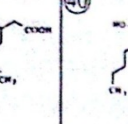
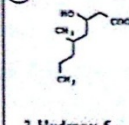
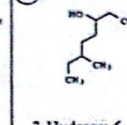
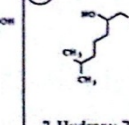
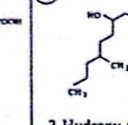
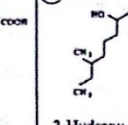
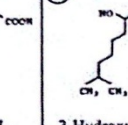
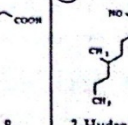
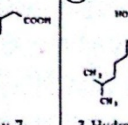
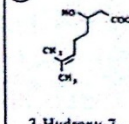
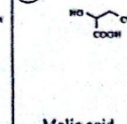
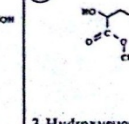
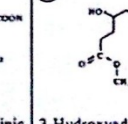
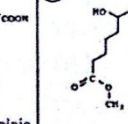
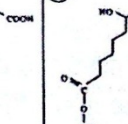
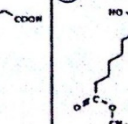
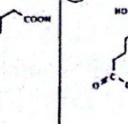
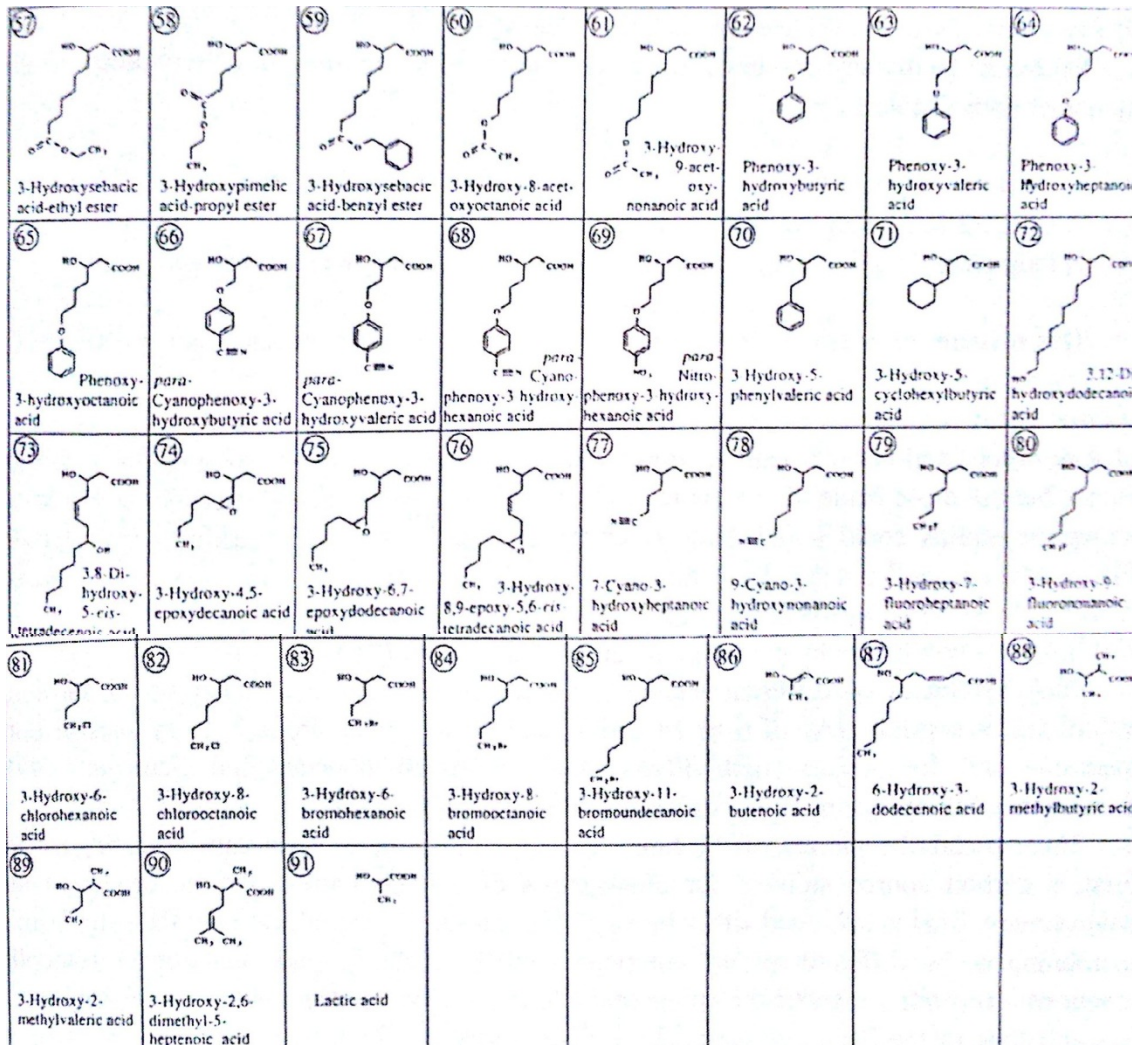


Figura 1. Estructura PHAs

En la Tabla 1 se muestran las unidades monoméricas de los PHA (Volova 2004).

Tabla 1. Diversidad química de PHAs

 <p>3-Hydroxypropionic acid</p>	 <p>3-Hydroxybutyric acid</p>	 <p>3-Hydroxyvaleric acid</p>	 <p>3-Hydroxyhexanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxyheptanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxyoctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxynonanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxydecanoic acid</p>
 <p>3-Hydroxyundecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxydodecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxytridecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxytetradecanoic acid</p>	 <p>4-Hydroxybutyric acid</p>	 <p>4-Hydroxyvaleric acid</p>	 <p>4-Hydroxyhexanoic acid</p>	 <p>4-Hydroxyheptanoic acid</p>
 <p>4-Hydroxyoctanoic acid</p>	 <p>4-Hydroxydecanoic acid</p>	 <p>5-Hydroxyvaleric acid</p>	 <p>5-Hydroxyhexanoic acid</p>	 <p>6-Hydroxydodecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4-pentenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4-trans-hexenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4-cis-hexenoic acid</p>
 <p>3-Hydroxy-5-hexenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-trans-octenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-cis-octenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-7-octenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-8-nonenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-9-decenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-5-cis-dodecenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-cis-dodecenoic acid</p>
 <p>3-Hydroxy-5-cis-tetradecenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-7-cis-tetradecenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-5,8-cis-cis-tetradecenoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4-methylvaleric acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4-methylhexanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-5-methylhexanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-methylheptanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-4-methyloctanoic acid</p>
 <p>3-Hydroxy-5-methyloctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-methyloctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-7-methyloctanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-6-methylnonanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-7-methylnonanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-8-methylnonanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-7-methyldecanoic acid</p>	 <p>3-Hydroxy-9-methyldecanoic acid</p>
 <p>3-Hydroxy-7-methyl-6-octenoic acid</p>	 <p>Malic acid</p>	 <p>3-Hydroxysuccinic acid-methyl ester</p>	 <p>3-Hydroxyadipinic acid-methyl ester</p>	 <p>3-Hydroxysebacic acid-methyl ester</p>	 <p>3-Hydroxyazelaic acid-methyl ester</p>	 <p>3-Hydroxysebacic acid-methyl ester</p>	 <p>3-Hydroxysebacic acid-ethyl ester</p>



De acuerdo al número de átomos de carbono del monómero y el tipo de monómero base los PHAs se pueden dividir en tres grupos (Anderson y Dawes s.f.) (Soloiman, y otros 2006) (Li, Zhang y Qi 2007):

- Homopolímeros de cadena de longitud corta (short-chain length, SCL) los cuales tienen de 3-5 átomos de carbono.
- Homopolímeros de cadena de longitud media (medium-chain length MCL) los cuales tienen entre 6-14 átomos de carbono.
- Copolímeros: compuestos por dos o más tipos de hidroxiaácidos como monómeros constituyentes.

Las dos clases más comunes y comercializadas de PHA son: el homopolímero polihidroxi-butilato (PHB) y el copolímero de polihidroxi-butilato y polihidroxi-valerato conocido como polihidroxi-butilato-valerato (PHBV). En la Figura 2 se pueden observar las estructuras moleculares de estos biopolímeros.

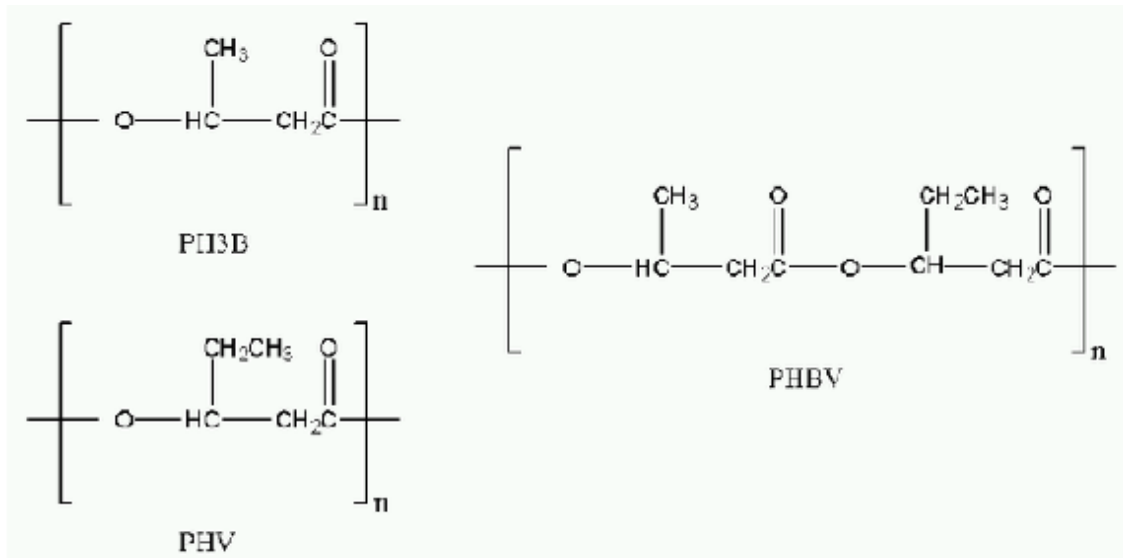


Figura 2. Estructura química del PHB, PHV y copolímero

De acuerdo a la estructura de cada polímero, se obtienen propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes, teniendo incidencia directa sobre las posibles aplicaciones de los polímeros y su formulación.

4. SINTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

En la Figura 3 se observan las diferentes formas de producción de polihidroxialcanoatos.

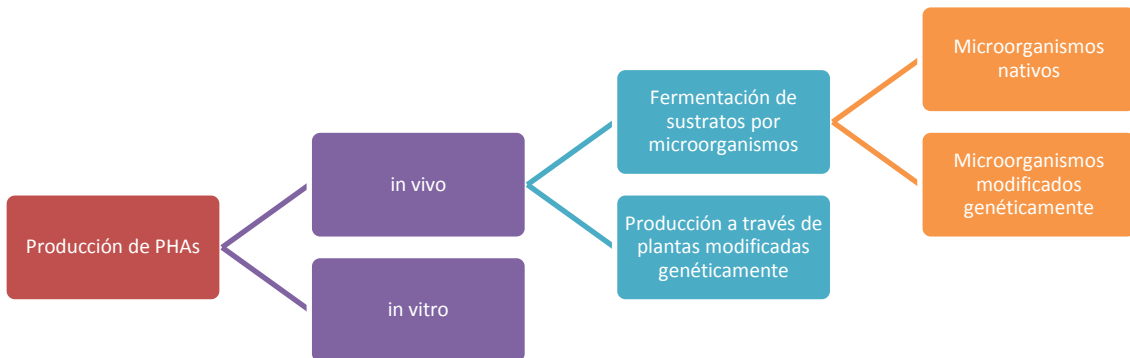


Figura 3. Formas de producción de polihidroxicanoatos

4.1. Producción *in vitro*:

La producción de PHA *in vitro* se realiza en un sistema libre de células, a partir de monómeros como ser: lactonas, ácidos hidroxialcanóicos o el tioéster sintético 3-hidroxiacetil-CoA y empleando enzimas tales como lipasas, esterases o algunas proteasas para realizar la síntesis (Li, Zhang y Qi 2007).

Éste método tiene la ventaja de no producir sub productos, como ser otros compuestos metabólicos, que luego tienen que ser removidos. Se pueden obtener polímeros puros y se pueden polimerizar monómeros específicos que no se sintetizan en forma natural. Por otro lado las desventajas incluyen la baja estabilidad de las enzimas polimerizantes (alto costo) y la utilización de sustratos relativamente costosos. Actualmente los polímeros sintetizados por esta vía se utilizan únicamente para investigación (Endres y Sieberts-Raths 2011).

4.2. Producción *in vivo*

La producción de PHA *in vivo* se puede dar de dos formas: por fermentación de sustratos a través de microorganismos y a través de plantas modificadas genéticamente. (Naranjo Vasco 2010).

4.2.1. Producción por fermentación

Para la producción por vía fermentativa se utilizan microorganismos ya sean especies nativas, o microorganismos que han sido modificados genéticamente con el objetivo de inducir las rutas metabólicas de producción de PHA en aquellos que originalmente no lo hacían o para mejorar rendimientos en la producción y separación del PHA en aquellos que ya poseen esas rutas metabólicas. Existen más de 300 especies de microorganismo nativos reportados capaces de producir PHA, pero solo unos pocos lo hacen con un rendimiento importante para

aplicaciones industriales. Los microorganismos sintetizan PHA a partir de diferentes sustratos y los almacenan en su citoplasma como reserva de fuente de carbono y energía. La producción y acumulación en microorganismos, ocurre cuando la célula es expuesta a condiciones de estrés nutricional en presencia de un exceso de fuente de carbono y una restricción de otro nutriente como ser nitrógeno, fósforo u oxígeno (Lee, *Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria* 1996). Éstos biopolímeros se depositan intracelularmente en formas de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco celular (Endres y Sieberts-Raths 2011) (Steinbuchel y Fuchtenbusch 1998).

4.2.2. Producción en plantas modificadas genéticamente:

Se han desarrollado tecnologías de producción de PHA por medio de tejidos vegetales en plantaciones genéticamente modificadas, la acumulación de PHA se da tanto en semillas como en las hojas, las cuales a través de la fotosíntesis utilizan el dióxido de carbono y agua como materia prima para la producción de PHA (Li, Zhang y Qi 2007) (Naranjo Vasco 2010) En la Tabla 2 se resumen las plantas utilizadas, localización de la acumulación y porcentaje de acumulación en peso seco.

Tabla 2. Producción de PHAs en plantas modificadas genéticamente

Cultivo	Polímero	Tejido	Contenido (% m/m PHA)
Alfalfa	PHB	Hojas	0.18
Arabidopsis	PHB	Hojas	5.8-40
	PHBV	Hojas	0.07-1.6
	PHA _{MCL}	Planta entera sin raíces	0.14-0.18
<i>Brassica napus</i>	PHB	Semillas	7.7
	PHBV	Semillas	0.7-2.3
<i>Camelia sativa</i>	PHB	Semillas	19.9
Lino	PHB	Tallo	0.005
Palma	PHB	Hojas	No cuantificado
	PHB	Mesocarpio	No cuantificado
	PHBV	Hojas	No cuantificado
Álamo	PHB	Hojas	3.69
Papa	PHB	Hojas	0.009
	PHA _{MCL}	Hojas	0.00026
Remolacha azucarera	PHB	Raíz	5.5
Tabaco	PHB	Hojas	0.0002-0.32

Fuente: (Somleva, Peoples y Snell 2013)

5. BIOSINTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN MICROORGANISMOS

Hasta la fecha se han encontrado diversas rutas para la síntesis de PHB. La más conocida y estudiada se muestra en la Figura 4. Ruta metabólica de producción y degradación de PHB en *Rasltonia eutropha* (Graz 2011).

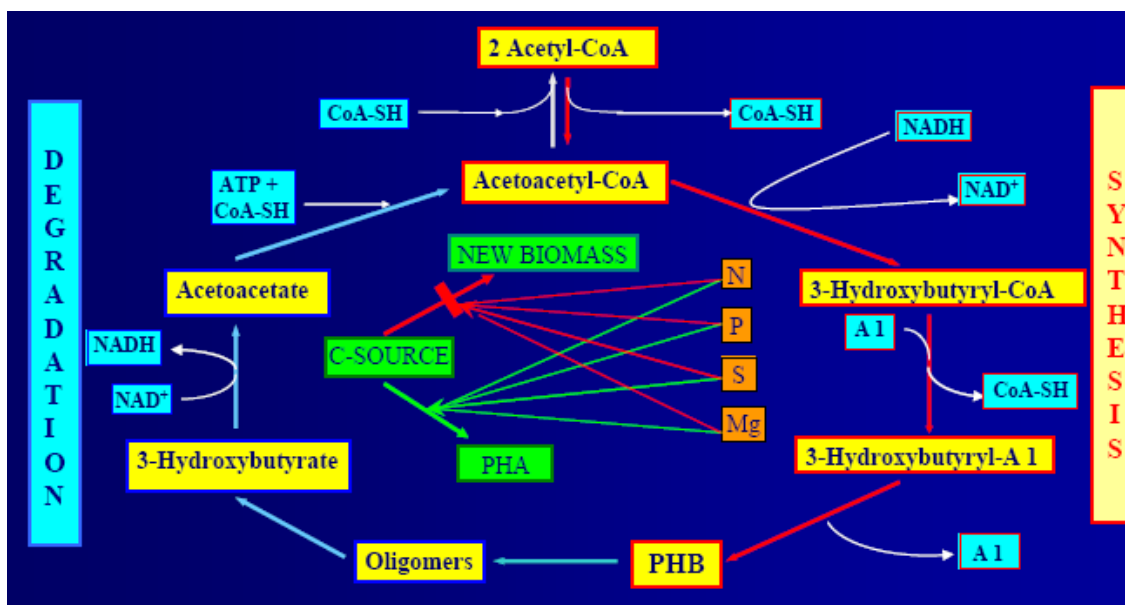


Figura 4. Ruta metabólica de producción y degradación de PHB en *Rasltonia eutropha* (Graz 2011).

La ruta metabólica de la síntesis de PHB en *Ralstonia eutropha* consta de las siguientes etapas (Sudesh, Abe y Doi 2000):

- La β -ketotiolasa lleva a cabo la condensación de 2 moléculas de Acetil-CoA, en Acetoacetyl-CoA.
- Luego la Acetoacetyl-CoA reductasa con la oxidación de una molécula de NADPH, reduce el Acetoacetyl-CoA en 3-hidroxiacetyl-CoA.
- Por último la PHB-sintetasa lleva a cabo una reacción de polimerización en cadena a partir de unidades de 3-hidroxiacetyl-CoA formando las moléculas de PHB.

Cuando en el medio de cultivo se agota la fuente de carbono y no existe limitación de nitrógeno o fósforo, se da la ruta degradativa. El PHB liberado de los gránulos se degrada por la PHB-depolimerasa en unidades de ácido 3-hidroxiacético que se oxida a acetoacetato y se convierte en acetoacetyl-CoA. (Sudesh, Abe y Doi 2000). Este ingresa al metabolismo celular bajo la forma de acetyl-CoA, sirviendo como nutriente para la bacteria.

Se pueden distinguir tres clases de PHA sintetasa de acuerdo con las especificaciones del sustrato utilizado (fuente de carbono) y las estructuras primarias de la enzima. La primera clase de PHA sintetasa es la representada por la PHA sintetasa de *Ralstonia eutropha*, y se caracteriza por tener como sustrato monómeros de hidroxiaácidos de cadena corta (SCL). La segunda clase de PHA sintetasa ha sido detectada en *Pseudomonas oleovorans*. Esta enzima incorpora hidroxiaácidos de cadena de longitud media (MCL). La tercera clase se caracteriza porque tiene dos subunidades designadas como subunidad C (40kDa) y subunidad E (40kDa) mientras que los dos primeros tipos de PHA sintetasa tienen una sola subunidad con 60-70 kDa de masa. Aunque no se tienen muy bien definidos los sustratos con los que trabaja esta enzima, se ha observado preferencia por los SCL. Esta enzima ha sido identificada en los siguientes microorganismos: *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa pfennigii* y en el *Synechocystis sp. PCC 6803*. (Sudesh, Abe y Doi 2000) (Naranjo Vasco 2010).

5.1. Enzimas clave en la síntesis de PHAs Se ha demostrado que las rutas para la síntesis de polímeros hidroxibutíricos son muy similares en diferentes microorganismos (Alcaligenes, *Azotobacter*, etc).

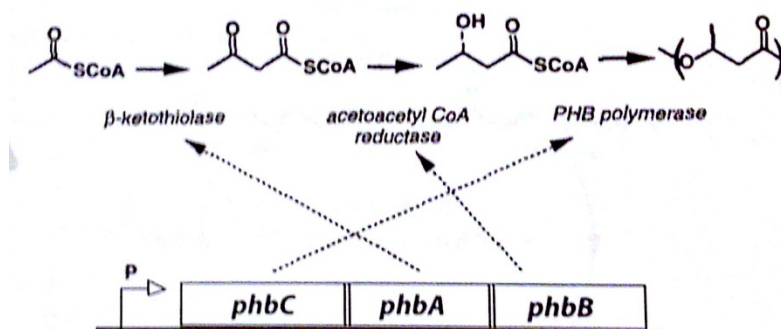


Figura 5. Genes y enzimas involucradas en la síntesis de PHAs

Las condiciones bajo las cuales se detiene la síntesis de proteínas y las células comienzan a sintetizar y acumular P(3HB) están determinadas por el estado redox del citoplasma y la concentración intracelular de piruvato y CoA disponible (Oeding y Schelegel 1973). Durante el crecimiento balanceado, el piruvato y equivalentes reductores (NADH y NADPH) son utilizados en el ciclo de Krebs para formar aminoácidos y generar energía en la célula. Si el nivel de CoA se mantiene alto, no se produce la síntesis de P(3HB). En crecimiento desbalanceado, con exceso de fuente de carbono y limitación de algún nutriente (fuente de nitrógeno, fósforo u oxígeno), el acetyl CoA no entra en el ciclo de Krebs y es transformado en acetoacetyl CoA. Si el nivel de CoA es bajo, se generan condiciones favorables para la activación de las enzimas involucradas en la síntesis de P(3HB) (Volova 2004).

Las enzimas claves en la síntesis de PHAs son 3: ketiolasas, acetylCoA reductasa y PHA sintasa que son codificadas por los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* respectivamente (Steinbuchel y Fuchtenbusch 1998) (Figura 5). La síntesis de PHAs puede ser regulada a diferentes niveles: a nivel de la expresión de los genes con factores ambientales específicos (deficiencia de nutrientes) o a nivel de regulación de la actividad de las enzimas involucradas mediante componentes celulares, sustratos o inhibidores.

Los primeros trabajos realizados, que estudian a los mecanismos de producción, indican que la regulación de la síntesis de PHAs en *R. eutropha* es realizada por metabolitos a nivel enzimático y el factor intracelular más importante, es la concentración disponible de CoA, que inhibe la enzima ketiolasas en *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter* y *Zoogloea ramigera* (Volova 2004).

En una segunda etapa en la síntesis de PHAs, los productos de la reacción con ketiolasas son reducidos a hidroxilácidos. Esta reacción es catalizada por la enzima acetoacetylCoA reductasa. El factor crítico que determina la actividad de la enzima es la relación NADPH/NADP. Cuando este cociente es alto, la actividad de la enzima aumenta. Se ha determinado que la velocidad de la síntesis de polímero en *R. eutropha*, creciendo en diferentes sustratos, es estrictamente dependiente de la concentración de NADPH en la célula.

La tercera enzima, que determina el tipo de PHA, es la PHA sintasa. Hasta la fecha se han encontrado más de 50 genes estructurales de la PHA sintasa. Esta enzima es responsable de una de las propiedades más importantes, el peso molecular de los PHAs.

La PHA sintasa también es responsable de la formación de los gránulos. Una vez que la síntesis del polímero ha comenzado, la forma soluble de la enzima convierte el monómero CoA en un oligómero para formar una micela con la enzima localizada en la superficie. Las partes hidrofóbicas de la cadena polimérica, se localizan dentro de la micela, separado del citoplasma. La cadena de polímero se extiende y el gránulo es formado. El tamaño y número de gránulos dependen de la concentración de PHA sintasa en la célula.

El número de gránulos en una célula varía entre 2-4 a 12 y su diámetro de 100 a 800 μm . Los gránulos se encuentran cubiertos por una membrana compuesta por fosfolípidos y proteínas de 2-4 μm de espesor. EL polímero constituye un 98 % del gránulo (Volova 2004) (Figura 6).

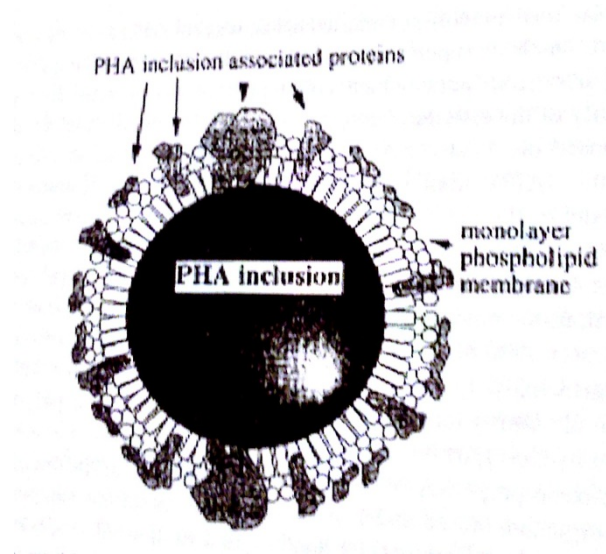


Figura 6. Gránulo de PHA

6. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHA

Dentro de los más de 300 microorganismos conocidos acumuladores de PHA, solo algunos han sido empleados para su producción (Tabla 3) (Lee, Lee y Wang, *Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals* 1999). Éstos incluyen: *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinlandii*, *Pseudomonas oleovorans* y varias cepas de bacterias Metilotrofas y *E. coli recombinante* (Braunegg, Lefebvre y Genzer 1998) (Lee, *Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria* 1996) (Lee, *Review Bacterial polyhydroxyalkanoates* 1996) (Volova 2004) (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos productores de PHAs

Bacteria	PHA	Fuente de Carbono	X (g/L)	PHA (g/L)	% PHA	QP (g/Lh)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Glucosa	164.0	121.0	76.0	2.42
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	CO ₂ + H ₂	91.3	61.9	67.8	1.55
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Hidrolizado de tapioca	106.0	61.9	57.5	1.03
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucosa y ácido propiónico	158.0	117.0	74.0	2.55
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Sacarosa	143.0	71.4	50.0	3.97
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Sacarosa	-	16.2	50.0	2.6
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB)	Glucosa	40.1	32.0	79.8	0.68
<i>Methylobacterium organophilum</i>	P(3HB)	Metanol	250.0	130.0	52.0	1.86
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)	Ácido valérico	39.5	24.5	62.0	-
<i>Protomonas extorquens</i>	P(3HB)	Metanol	233.0	149.0	64.0	0.88
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HHx-co-3HO)	n-octano	11.6	2.9	25.0	0.58
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HHx-co-3HO)	n-octano	37.1	12.1	33.0	0.32
<i>E. coli recombinante</i>	P(3HB)	glucosa	101.4	81.2	80.1	-
<i>Klebsiella aerogenes recombinante</i>	P(3HB)	almidón	37.0	24.0	65.0	-

7. SUSTRATOS PARA PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA

Se conoce que, para la mayoría de los microorganismos, la producción de PHA está ligada a la escasez de nitrógeno o algún otro nutriente en relación a una abundante fuente de carbono, generalmente mono- y disacáridos o ácidos grasos (Verlinden, y otros 2007); (Kadouri, Jurkevitch y Okon 2005); (Patnaik 2005); (Trotsenko y Belova 2000)). Una de las áreas de oportunidad para mejorar el proceso global se centra en encontrar fuentes de carbono económicas, provenientes muchas veces de material considerado como desecho o como subproducto abundante que ofrece por sí mismo poco valor agregado. El uso de material de desecho para producir PHA se ha estudiado de manera particular en varios trabajos (Cho, y otros 2001), en el que utilizan agua desechada de la crianza de cerdos en la producción de PHA por *Azotobacter vinelandii* ATCC 53799. El agua desechada utilizada como fuente de carbono es rica en acetato, propionato y butirato. Al diluir el agua a la mitad, *Azotobacter vinelandii* logró producir y almacenar PHA hasta un 34 % (peso – peso) y la adición de 20 g/L de glucosa elevó este porcentaje hasta 63 % (Cho, y otros 2001). Estos investigadores reportaron que la

cantidad de nitrógeno en el agua de desecho sobrepasa la relación óptima de C:N y sugieren como corrección la adición de compuestos ricos en carbono para desequilibrar la relación entre nutrientes (en este caso la adición de glucosa).

7.1. Melazas

La melaza es un producto líquido espeso derivado de materiales ricos en azúcares como la caña de azúcar y la remolacha azucarera, y en algunos casos de materiales amiláceos como la soya (Naranjo Vasco 2010). El efecto de la concentración de miel de caña en la producción de PHB fue estudiado en *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 (Beaulieu, y otros 1995). En el estudio se demostró que la producción de PHB fue alta cuando se ensayaron concentraciones de miel en el medio entre 0.1-0.3 g/L. Sin embargo, los rendimientos en biomasa (39-48%) y en producción de PHB (17-26%) variaron significativamente dependiendo de la fuente de nitrógeno empleada y de la concentración de miel en el medio de cultivo. El mayor acumulado de PHB con relación al peso seco celular fue superior cuando el medio se suplementó con mieles de caña al 0.1% (p/v). Además reportaron efecto inhibitorio en el crecimiento cuando usaron mieles de caña al 0.5% (p/v). Una evaluación similar se realizó en *Bacillus megaterium* (Gouda 2001). Se ensayaron concentraciones de miel de caña entre 1-5% (p/v) y se estimó el crecimiento y la producción de PHB y de otros PHAs después de 48 horas de fermentación. El mayor crecimiento lo obtuvieron cuando utilizaron mieles de caña de azúcar al 3% (p/v). Se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo cuando utilizaron la miel al 5% (p/v). El máximo rendimiento en la producción de PHB (46,5 %) con respecto al peso seco celular lo obtuvieron cuando el medio se suplementó con miel de caña al 2% (p/v). Concentraciones superiores produjeron un efecto inhibitorio en la producción de PHB. Se evaluó la producción de PHB utilizando la cepa de *Bacillus* sp. JMa 5, en cultivos discontinuos con un contenido de 210 g/L de miel de caña, la densidad celular alcanzó los 30 g/L después de 8 h de cultivo (Wu, y otros 2001). La cepa acumuló entre 25 - 35% de PHB con relación al peso seco celular. Además la producción de PHB estuvo asociada al crecimiento. Se han reportado estudios, utilizando mieles de remolacha estudiaron el efecto de la concentración de miel en la producción de PHB en una cepa de *Bacillus cereus* M5 (Yilmaz y Beyatli 2005). Los autores reportaron la máxima producción de peso seco celular (0,440 g/L) en medios que contenían mieles de remolacha al 4% (Bello, y otros 2009).

7.2. Suero de leche

El suero de leche es rico en lactosa, ésta puede utilizarse como fuente de carbono para la producción de PHAs. Sin embargo, solo unos pocos microorganismos son capaces de convertir directamente lactosa en PHAs. La conversión de lactosa en PHAs se puede dar por tres mecanismos diferentes: el más simple es la conversión directa de lactosa (*Hydrogenophaga pseudoflava* *E. coli recombinante*). El segundo mecanismo supone la hidrólisis (química o enzimática) previa de lactosa en glucosa y galactosa, utilizándose éstos azúcares como fuente de carbono en la síntesis de PHAs (*Ralstonia eutropha*). La tercera posibilidad involucra una primera etapa de conversión anaerobia de lactosa en ácido láctico, que luego es utilizado para producir PHAs (*Alcaligenes latus*) (Ann, Park y Lee s.f.) (Marangoni, Furigo y Aragao 2002).

7.3. Residuos Lignocelulósicos

Otra posible fuente de carbono de bajo costo, es la celulosa, se puede obtener de residuos de madera, pastos etc. La celulosa es un polímero de glucosa de alto peso molecular que no puede ser utilizado directamente por la mayoría de las bacterias. Por lo tanto, la hidrólisis de la celulosa en glucosa es indispensable para poder ser metabolizada para sintetizar PHAs. Utilizando ácido sulfúrico para hidrolizar bagazo en glucosa y xilosa se logró producir una acumulación del 65 % PHB en *R. eutropha* (Naranjo Vasco 2010) (Volova 2004).

7.4. Glicerol

El biodiesel es producido por la transesterificación de grasas animales o aceites vegetales con un alcohol de cadena corta, reacción que es catalizada ya sea por un ácido o una base. El glicerol crudo es un subproducto de esta reacción en una relación másica de 1/10 (glicerol/biodiesel), y está compuesto principalmente de glicerol, ácidos grasos libres, metilésteres de ácidos grasos y algunas trazas de sales. Esta composición depende del aceite vegetal o grasa del proceso de transesterificación (de acuerdo al tipo de catálisis) y la tecnología de separación y purificación del biodiesel utilizadas. La creciente industria del biodiesel ha llevado a una sobreproducción de glicerol, lo que provoca una disminución de precio en el mercado. (Naranjo Vasco 2010)

El glicerol crudo o refinado puede ser utilizado como fuente de carbono en la producción de PHAs. Ésta aplicación se desarrolla en mayor profundidad en el Capítulo 3.

8. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA

La síntesis de PHAs ha sido y continúa siendo investigada básicamente en cultivo discontinuo. Este tipo de cultivo es de fácil manipulación y es muy conveniente usarlo en experimentos de crecimiento y selección de microorganismos productores de PHAs (Yamane 1993). Las bacterias empleadas para producir PHAs se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo con las condiciones de cultivo requeridas para la síntesis del polímero. El primer grupo de bacterias requiere de limitación en el medio de cultivo de uno de los nutrientes esenciales como: N, P, Mg, K, O y S y de un exceso de la fuente de carbono para sintetizar eficientemente los PHAs (Lee, Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria 1996). El segundo grupo de bacterias no requiere de limitación de nutrientes para la síntesis de los PHAs y puede acumular el polímero durante su crecimiento. *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* y muchas otras bacterias pertenecen al primer grupo, mientras algunas bacterias como *Alcaligenes latus*, mutantes de *Azotobacter vinelandii* y recombinantes de *E. coli* que poseen el operon para la biosíntesis de PHAs a partir de *Alcaligenes eutrophus* pertenecen al segundo grupo (Lee, Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria 1996). Tanto el cultivo discontinuo como el continuo pueden ser utilizados para la producción de PHAs con altas productividades. Para el cultivo de las bacterias que pertenecen al primer grupo, el cultivo en dos etapas es el que más frecuentemente se emplea (Lee, Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria 1996). Las células son cultivadas

hasta una concentración deseada, sin limitación de ningún nutriente esencial y posteriormente, un nutriente esencial se limita en el medio para inducir la acumulación de PHAs en la célula. Durante este estadio de limitación de un nutriente esencial, la concentración residual celular (definida como la concentración celular menos la concentración de PHAs) debe permanecer casi constante y la concentración celular se incrementa sólo por el aumento de la concentración intracelular de PHAs. *Alcaligenes eutrophus*, la bacteria más comúnmente empleada para la producción comercial de Poli (3-hidroxi butirato) y Poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato), acumula una gran cantidad de polímero (hasta un 80% del peso seco) cuando hay una limitación total de nitrógeno y fósforo en el medio (Hrabak 1992). Este proceso se puede implementar tanto en un cultivo discontinuo en dos etapas (primera etapa de crecimiento y segunda de limitación de un nutriente) o en un cultivo fedbatch con alimentación continua o intermitente de fuente de carbono luego de agotado un nutriente. Sin embargo, la mayoría de las bacterias restantes que pertenecen al primer grupo de microorganismos como *Pseudomonas oleovorans* (Kim, y otros 1994), acumulan mayores niveles de PHAs cuando el nutriente esencial no se elimina completamente del medio. Para obtener altas productividades con las bacterias del primer grupo es necesario que los medios de cultivo sean suplementados con una relación óptima entre las fuentes de carbono y los nutrientes esenciales. Una limitación prematura de algún nutriente esencial puede dar como resultado una baja concentración celular y por tanto un bajo rendimiento del polímero y una baja productividad en el proceso. Si la limitación de nutriente se demora en el tiempo, las células no tendrán la capacidad de acumular mucho polímero y tiene como resultado un bajo contenido de PHA en las células y una baja productividad del proceso. Estas premisas han sido demostradas experimentalmente en *A. eutrophus* con el nitrógeno como elemento limitante en el medio de cultivo (Hrabak 1992). Cuando la carencia de nitrógeno en el medio se prolonga hasta que se alcanza una concentración celular de 70 g/L, la concentración final de PHB alcanza los 121 g/L. Sin embargo, cuando la carencia de nitrógeno se dilata en tiempo hasta alcanzar una concentración celular de 90 g/L, disminuyen la producción del polímero y la productividad del proceso (Hrabak 1992). En el segundo grupo de bacterias, la producción de PHAs no es dependiente de la limitación de nutrientes esenciales en el medio de cultivo. Por esta razón se utilizan con frecuencia fuentes de nitrógeno complejas como licor de maíz, peptona y extracto de levadura que incrementan el crecimiento celular y al mismo tiempo la acumulación de PHAs (Preusting, Kingma y Witholt 1991). El crecimiento celular y la acumulación de PHAs necesitan estar balanceados para evitar una acumulación incompleta del polímero en las células o una prematura terminación de la fermentación a bajas concentraciones celulares. Como los PHAs se acumulan en el citoplasma, la concentración celular residual determina la cantidad de PHAs que potencialmente pueden producirse. Un alto contenido de PHAs con una baja concentración celular residual resultará en un bajo acumulado de PHAs y en una baja productividad del proceso. También una concentración celular residual alta con un bajo contenido de PHA puede reducir la concentración final de PHA, el rendimiento y la productividad. Una concentración celular residual alta con un elevado acumulado intracelular de PHAs brindará los mejores resultados en términos de rendimiento y productividad (Lee, Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria 1996). Teóricamente, el cultivo continuo es más productivo. *Pseudomonas oleovorans* es una de las bacterias que más se ha estudiado bajo estas condiciones de cultivo (Kim, y otros 1994)

(Park, y otros 1995), fue cultivada variando la tasa de dilución en un medio que contenía octano al 15% (v/v) con el ión amonio como nutriente limitante. Cuando se incrementó la tasa de dilución desde 0,09 a 0,46 h⁻¹ la concentración celular y el contenido de PHA disminuyeron desde 2,25 g/L y 46,7% a 1,32 g/L y 8,3% respectivamente (Park, y otros 1995). Incrementando la tasa de transferencia de oxígeno y optimizando la estrategia de alimentación se puede alcanzar una concentración celular de 11,6 g/L y una productividad de 0,58 g/L/h. Se ha sugerido que puede emplearse, en la mayoría de las bacterias que pertenecen al primer grupo, un cultivo continuo en dos etapas. Para las bacterias del primer grupo, que no requieran grandes cambios en la concentración del nutriente limitante entre la fase de crecimiento celular y la acumulación del polímero, como por ejemplo en *P. oleovorans*, se puede utilizar un cultivo continuo en una etapa (Kim, y otros 1994). En el caso de las bacterias del segundo grupo puede emplearse el cultivo continuo en una etapa (Lee, Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria 1996). (Kim, y otros 1994) (Preusting, Kingma y Witholt 1991)

9. RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN

Luego de la fermentación las células (conteniendo PHAs en su interior) son separadas del medio de cultivo mediante centrifugación. La ruptura celular y extracción de PHA puede realizarse mediante: extracción con químicos (soda, cloroformo, hipoclorito de sodio, surfactantes, acetona), disrupción mecánica (molino de bolas, homogeneizador, sonicación), disrupción enzimática (lisozima, proteasas, lipasas).

En la purificación el polímero es generalmente precipitado con metanol o etanol a 4 °C.

EL método de extracción y purificación puede afectar o modificar algunas propiedades (físicas, químicas o mecánicas) del polímero, incidiendo directamente en su aplicación posterior (Chen, Chen y Yang, Kinetics of PHB-containing biomass disruption in surfactant chelate aqueous solution 2003) (Chen, Yang, y otros 2001) (Demet, y otros 2006) (Jiang, Ramsay y Bruce 2006) (Nonato, Mantelatto y Rossell, Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol 2001)

10. APLICACIONES

Los PHA's son considerados de gran interés industrial, como polímeros biodegradables y biocompatibles, para diversas áreas de aplicación. El plástico biodegradable debe complementar al petroquímico, conquistando terrenos específicos de aplicación donde sus características de pureza y biodegradabilidad sean necesarias.

A continuación se describen en profundidad los usos de estos plásticos.

10.1. Industria de embalajes

El P(3HB) y P(3HB-co-3HV) son conocidos como los potenciales sustitutos de los plásticos convencionales utilizados para embalaje.

Sin embargo, con estos poliésteres no solo pueden fabricarse envases. Pueden ser usados además, como cubierta para papel en la industria del embalaje de comida. El PHA es un material que protege el papel o cartón, contra daños producidos por el alimento y/o el medioambiente. La resistencia puede lograrse por combinación del material hidrofílico con una lámina del poliéster o con una suspensión de látex de gránulos de PHA (Volova 2004).

10.2. Aplicaciones en medicina y farmacia

El producto de la hidrólisis del P(3HB) pertenece a los cuerpos cetónicos, los cuales son intermediarios de la oxidación de ácidos grasos (Lehninger 1985), por lo cual no es tóxico para los tejidos animales. Se han propuesto muchas aplicaciones en el campo de la medicina y para la industria farmacéutica. Entre las aplicaciones del PHA, pueden mencionarse cirugías secundarias y la liberación a largo plazo de fármacos. Algunas aplicaciones, como el uso de P(3HB) para hacer absorbibles algunas prótesis y suturas quirúrgicas, han sido propuestas hace mucho tiempo (Volova 2004).

Actualmente están siendo estudiadas otras aplicaciones en el campo de la medicina. El monómero (3HB) es un mejor nutriente que la glucosa y se puede aplicar por vía intravenosa durante una cirugía.

Debido a su biodegradabilidad, los PHA pueden utilizarse como matriz para la preparación de materiales de liberación controlada. Materiales preparados con P(3HB) conteniendo la hormona Buserelin, fue exitosamente aplicada en el control de la ovulación de hembras de mono. También se han utilizado y testeado tabletas y capsulas conteniendo cytosstaticum aclarubicin para el tratamiento del cáncer de próstata. El uso del PHA como material para liberación controlada de compuestos depende de su biodegradabilidad y la biocompatibilidad del poliéster. Esto ha sido estudiado con detalle solamente con el P (3HB) y con el P(3HB-co-3HV). (Volova 2004)

10.3. Aplicaciones en la agricultura

Se han considerado muchas aplicaciones de los PHA's en la agricultura, como ser caños de irrigación zafrales y materiales para la liberación controlada de pesticidas, herbicidas o fertilizantes. Estas aplicaciones pueden ser muy interesantes, ya que no se requiere una alta pureza del material, como en el caso de la medicina o el embalaje de alimentos.

10.4. Otras aplicaciones

Además de las aplicaciones en la industria de los embalajes, agricultura, medicina y farmacia, otras aplicaciones están siendo investigadas. Estas aplicaciones van desde los accesorios para la industria alimenticia, industria del tabaco, tratamiento municipal de aguas, xerografía, horticultura, etc. Biopol ha fabricado redes de pesca, las cuales, si se pierden accidentalmente

en el océano, se hunden y son finalmente biodegradadas, minimizando los efectos sobre la vida marina.

El PHA puede ser una importante materia prima para la industria química para sintetizar enantiómeros puros, ya que muchos de los poliésteres consisten en bloques quirales. (Volova 2004)

11. MERCADO DE PHA

El mercado de PHAs está emergiendo con un crecimiento positivo debido principalmente a la conciencia de protección ambiental. El consumo global de PHAs en el 2012 fue de 5500 MT (toneladas métricas).

Se estima que el mercado crezca en 10.000 MT en 2013 a 34.000 MT en 2018. Europa es el continente con mayor consumo (46.68 %). América del Norte y Asia se presentan como los mayores productores por su alta tasa de inversión en I+D y disponibilidad de materias primas (Figura 7).

Dentro de las principales aplicaciones actualmente se encuentran (Figura 7): embalajes (31.8%), servicios para alimentos (29.20 %) y aplicaciones médicas (20.67 %). Los factores que impulsan el crecimiento del consumo son: regulaciones gubernamentales hacia políticas protectoras del medio ambiente y la vasta disponibilidad de materias primas.

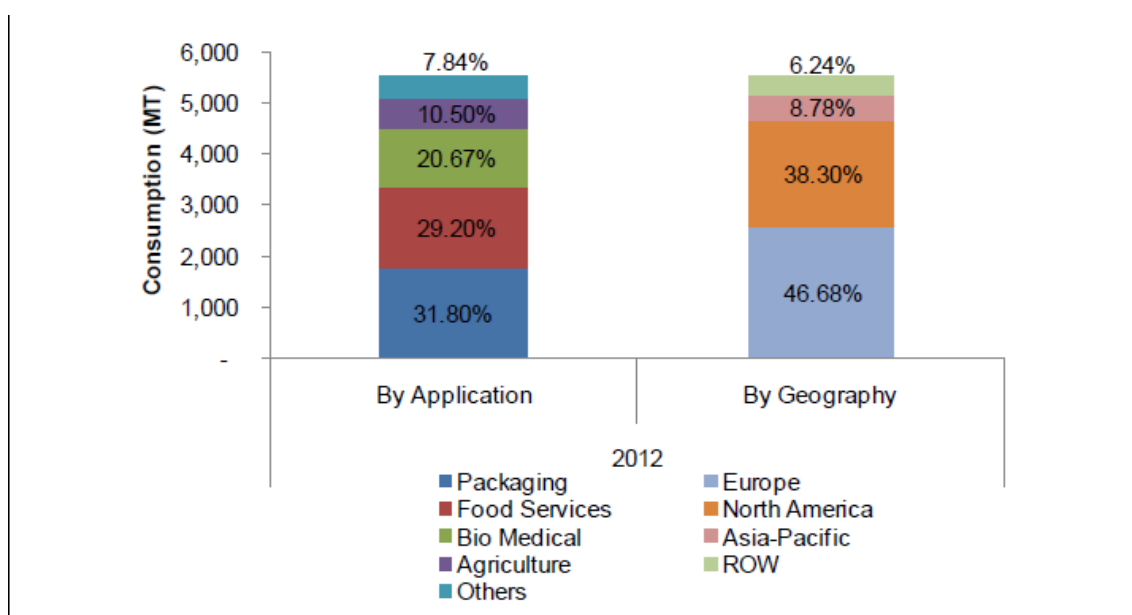


Figura 7. Consumo de PHA por aplicaciones y región

12. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, A J, y E A Dawes. «Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.» *Microbiol Rev.*, nº 54 (s.f.): 450-72.
- Ann, W S, S J Park, y S Y Lee. «Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombiant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution.» *Applied and Environmental Microbiology*, nº 66 (s.f.): 3624-3627.
- Beaulieu, M, Y Beaulieu, J Melinard, S Pandian, y J Goulet. «Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate.» *Appl. Environ. Microbiol*, nº 61 (1995): 165-169.
- Bello, Daniel, Miguel Otero, Grizel Ortega, y Emilia Carrera. «Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxialcanoatos .» *ICIDA Sobre los derivados de caña de azúcar XLIII*, nº 2 (Mayo-Agosto 2009): 3-13.
- Biomer. *www.biomer.de*. 2011.
- Braunegg, G., G. Lefebvre, y K F Genzer. «Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological an engineering aspects.» *J. of Biotechnol* 65 (1998): 127-161.
- Chen, Yinguang, Haizhen Yang, Qi Zhou, Jian Chen, y Gouwei Gu. «Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*.» *Process Biochemistry*, nº 36 (2001): 501-506.
- Chen, Yinguang, Jian Chen, y Haizhen Yang. «Kinetics of PHB-containing biomass disruption in surfactant chelate aqueous solution.» *Process Biochemistry*, nº 38 (2003): 173-182.
- Cho, K S, H W Ryu, C H Park, y P R Goodrich. «Utilization of swine wastewater as a feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD.» *J. Biosci Bioeng* 91, nº 2 (2001): 420-428.
- Demet, C, G Ufuk, N C Ero, Y Meral, y L Turker. «Poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and realising by hydrogen producing bacteria, *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. A transission electron microscopic study.» *African Journal of Biotechnology* 5, nº 22 (2006): 2069-2072.
- Endres, Hans Josef, y Sieberts-Raths. «Bioplastics Magazine.» 6 (2011): 42-45.
- Gouda. «Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugacane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources.» *Microbiol. Res.*, nº 156 (2001): 201-207.
- Graz, TU. *Graz University of Technology*. 2011. *www.tugraz.at* (último acceso: 2011).
- Hrabak, O. «Industrial production of poly-beta-hydroxybutyrate.» *Microbiol. Rev* 103 (1992): 251-256.

- Irigoyen, Catalina, Fátima Herrera, y Rossana Vallone. *Producción de Biopolímeros*. Proyecto Industrial - IIQ- UdelaR, 2005.
- Jiang, Xuan, Juliana Ramsay, y A Bruce. «Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440.» *Journal of Microbiological Methods*, nº 67 (2006): 212-219.
- Kadouri, D, E Jurkevitch, y Y Okon. «Ecological and Agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates.» *Crit. Rev. Microbiol*, nº 31 (2005): 55-67.
- Kim, B. S., S. Y. Lee, S. C. Lee, Y K Chang, H N Chang, y S I Woo. «Production of Poly(3-hydroxybutyric acid) by Fed-Batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control.» *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994): 892-898.
- Kim, Young Ha. *National Report on EDP in Korea*. Biomaterial Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 2001.
- Lee, S Y. «Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.» *Trends in Biotechnology* 14, nº 11 (1996): 431-438.
- Lee, S Y. «Review Bacterial polyhydroxyalkanoates.» *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996): 1-14.
- Lee, S Y, Y Lee, y F Wang. *Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals*. Jhon Wiley & Sons inc., 1999.
- Lehninger, Albert L. *Bioquímica*. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1985.
- Li, Rui, Hanxing Zhang, y Qingsheng Qi. «The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *E. coli*.» *Bioresource Technology* 98 (2007): 2313-2320.
- Loo, Ching-Lee, y Kumar Sudesh. «Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties.» *Malaysian Polymer Journal* 2, nº 2 (2007): 31-57.
- Marangoni, C, A Furigo, y G M Aragao. «Production of Poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding.» *Process Biochemistry*, nº 38 (2002): 137-141.
- Metabolix. www.metabolix.com. 2010.
- Naranjo Vasco, Javier Mauricio. *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. Tesis, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, 2010.
- Nonato, R V, P E Mantelatto, y C E Rossell. «Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol.» *Applied Microbiology and Biotechnology*, nº 57 (2001): 1-5.
- Nonato, R V, P E Mantelatto, y C E Rossell. «Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol.» *Appl. Microbiol. Biotechnol*, nº 57 (2001): 1-5.

- Oeding, V, y H G Schelegel. «Beta-kethiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism.» *Biochem. J.* 2 (1973): 239-248.
- Page, W J. «Bacterial Polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future.» *Canadian Journal of Microbiology*, nº 141 (1995): 1-3.
- Pareja, Enrique. *Producción de biopolímeros*. Universidad de Granada, s.f.
- Park, J S, H C Park, T L Huh, y Y H Lee. «Production of poly-beta-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* transformants harbouring cloned phbcCAB genes.» *Biotechnol. Lett* 17 (1995): 735-740.
- Patnaik, P. «Perspective in modeliangand optimization of PHB production by pure and mixed cultures.» *Crit. Rev. Microbiol.*, nº 25 (2005): 153-171.
- Preusting, H, J Kingma, y B. Witholt. «Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuos two-liquid-phase cultures.» *Enzyme Microb. Technology* 13 (1991): 770-780.
- Schlechter, Melvin. *Biodegradable polymers*. Norealk, CT USA: Buiness Communications Company. INC, , 2001.
- Soloiman, Daniel K.Y., Richard D Ashby, Thomas A Foglia, y William N Marmer. «Conversion of agricultural feedsotck and coproducts into polyhydroxyalkanoates.» *Appl. Microbiol. Biotech.*, nº 71 (2006): 783-789.
- Somleva, M N, O P Peoples, y K D Snell. «PHA Bioplastics, Biochemicals end Energy from Crops.» *Plants Biotech Journal*, 2013.
- Steinbuchel, A, y B Fuchtenbusch. «Bacterial and other biological systems for polyester production.» *TIBTECH* 16 (1998).
- Sudesh, K, H Abe, y Y Doi. «Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters.» *Prog. Polymer Sci.*, nº 25 (2000): 1503-1555.
- Trotsenko, Y A, y L L Belova. «Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) and Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and its regultation in bacteria.» *Microbiology* 69, nº 6 (2000): 635-645.
- Verlinden, R A, M A Hill, M A Kenward, C D Williams , y I Radecka. «Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates.» *Journal of Applied Microbiology*, nº 102 (2007): 1437-1449.
- Volova, Tatiana. *Polyhydroxyalkanoates Plastic Material of the 21st Century*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2004.

- Williams, Simon F, David P Martin, Daniel M Horowitz, y Oliver P Peoples. «PHA applications:addressing the price performance issue I. Tissue Engineering.» *International Journal of Biological Macromolecules*, nº 25 (1999): 111-121.
- Wu, Q, H Huang, G H Hu, J Chen, K P Ho, y G Q Chen. «Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media.» *Antonie Van Leeuwenhoek*, nº 80 (2001): 111-118.
- Yamane, T. «Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study.» *Biotechnol. Bioeng* 41 (1993): 165-170.
- Yilmaz, M, y Y Beyatli . «Poly-beta-polyhydroxybutyrate productionby *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses.» *Zucherindustrie*, nº 2 (2005): 109-112.

Capítulo 3

Producción de Polihidroxialcanoatos a partir de Glicerol Crudo

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	41
2. GLICEROL SUBPRODUCTO DE BIODIESEL	41
2.1. Situación en Uruguay	42
3. METABOLISMO DEL GLICEROL CRUDO EN MICROORGANISMOS.....	43
3.1. Ruta biosintética de PHAs a partir de glicerol.....	46
3.2. Ruta biosintética de PHAs a partir de metanol.....	46
3.3. Efecto de los ácidos grasos presentes en el glicerol crudo en la producción de PHAs.	47
4. ANTECEDENTES DE PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA A PARTIR DE GLICEROL Y METANOL	48
5. BIBLIOGRAFÍA.....	50
Figura 1. Reacción de producción de biodiesel	42
Figura 2. Vía oxidativa y reductiva del glicerol (Da Silva, Mack y Contiero 2009)	44
Figura 3. Metabolismo del glicerol (Da Silva, Mack y Contiero 2009).....	45
Figura 4. Ruta de producción de AcetilCoA precursor de la síntesis de PHAs a partir de glicerol.....	46
Figura 5. Ruta metabólica de asimilación de metanol y formación de precursores para la síntesis de PHAs (Smejkalova, Erb y Fuchs 2010).....	47

1. INTRODUCCIÓN

El biodiesel es una de las opciones de energía renovable que ha tenido una rápida implementación en el Uruguay. La producción de biodiesel por transesterificación de aceites vegetales y animales, genera inevitablemente aproximadamente 1 kg de glicerina por cada 10 kg de biodiesel. La composición de la glicerina varía dependiendo de las condiciones de procesamiento y consiste principalmente en glicerol, metanol, restos de grasas o aceites, ésteres, biodiesel, compuestos sulfurados, proteínas, y minerales (Thompson y He 2006). El crecimiento de la industria del biodiesel a nivel mundial ha generado una sobreproducción de glicerina, con la consiguiente baja de su precio, lo que ha llevado a que este producto sea considerado como un desperdicio. El bajo precio de la glicerina, no solo se debe al mayor volumen de producción, sino a su alto nivel de impurezas. Se cree que el refinado de la glicerina para llegar a un producto de alta pureza es muy costoso y consume mucha energía, por lo que es urgente incursionar en usos innovadores de la glicerina lo que hará a la producción de biodiesel más rentable y sustentable (Tang, y otros 2009).

Dado que el precio actual del glicerol crudo se ha vuelto muy competitivo con los azúcares usados para la producción de químicos y combustibles, la vía de fermentación microbiana es una opción para su aprovechamiento que está siendo re-evaluada (Tang, y otros 2009). Este es el caso de la producción de polímeros biodegradables polihidroxialcanoatos, en el cual el medio de fermentación se estima representa un 40% de los costos globales, por lo que el uso de un subproducto como la glicerina beneficiaría el balance económico del mismo (Ashyby, Solomain y Foglia 2004) (Soloiman, y otros 2006) (Cavalheiro, y otros 2009). El glicerol subproducto del biodiesel contiene dos fuentes de carbono potencialmente utilizables: glicerol y metanol. Además los residuos de ácidos grasos pueden ser utilizados como inductores de la producción de PHAs.

Como ya ha sido reportado es posible utilizar el proceso como alternativa para la valorización de la glicerina (Biodiesel Technotes 2006), obteniendo más de 80% de peso seco de la célula como plástico biodegradable (Braunegg, Lefebvre y Genser 1998). Mediante este proceso es posible integrar la generación de energía con la producción de bioplásticos de alto valor agregado a partir de un subproducto de difícil disposición (Kettl, y otros 2011).

2. GLICEROL SUBPRODUCTO DE BODIESEL

EL Biodiesel se produce a partir de aceites vegetales y grasas animales mediante una transesterificación con etanol o metanol y catalizado por NaOH o KOH, el glicerol representa aproximadamente un 10 % v/v del éster. (Figura 1)

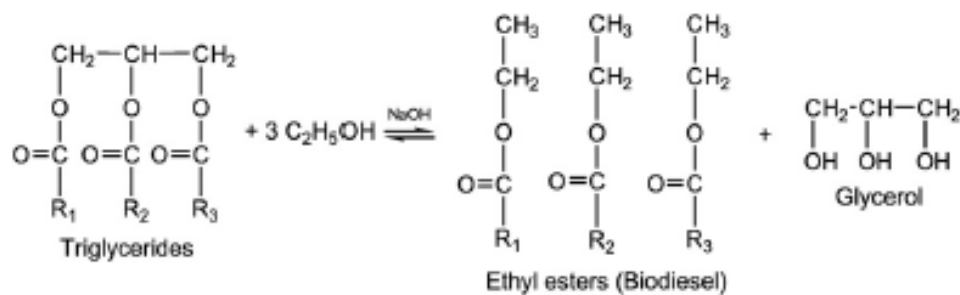


Figura 1. Reacción de producción de biodiesel

La composición del glicerol crudo varía, dependiendo de la materia prima utilizada para generar el biodiesel y tipo de proceso de producción utilizado. La mayoría de los procesos de producción de biodiesel utilizan una relación molar de 6 a 1 alcohol:aceite, que representa un exceso del 100 %. Un gran porcentaje del exceso de alcohol permanece en la fase glicerol luego de la reacción. Los grandes productores de biodiesel refinan el glicerol crudo, no así los pequeños productores (Thompson y He 2006)

Según Brown (2005), para instalar un sistema de recuperación de metanol rentable, la planta debe producir al menos 83774.9 kg de glicerol refinado y 4909.8 litros de metanol, con un costo asociado de (77736 USD) (operación y mantenimiento anual).

En la Tabla 1 figuran diferentes composiciones del glicerol crudo (Thompson y He 2006).

Tabla 1. Composición del glicerol crudo en función del sustrato

Feedstock	IdaGold	PacGold	Rapeseed	Canola	Soy	Crambe	WVO
Biodiesel layer							
Fuel (g)	98.18 ± 0.23	95.09 ± 0.40	99.39 ± 0.46	90.25 ± 0.09	89.58 ± 0.06	100.76 ± 0.57	81.81 ± 0.63
MeOH (g)	4.72 ± 0.31	4.85 ± 0.24	4.54 ± 0.25	4.63 ± 0.17	4.57 ± 0.07	3.17 ± 0.72	3.86 ± 1.12
Sub-total	102.9 ± 0.31	99.9 ± 0.17	103.9 ± 0.32	94.9 ± 0.08	94.2 ± 0.12	103.9 ± 0.19	85.7 ± 1.19
Glycerol layer							
Glycerol+MeOH+Cat (g)	13.61 ± 0.19	13.27 ± 0.40	15.23 ± 0.20	15.94 ± 0.27	16.16 ± 0.47	17.58 ± 1.07	25.26 ± 0.62
Glycerol (g)	8.56 ± 0.35	8.35 ± 0.16	10.01 ± 0.06	10.80 ± 0.26	10.96 ± 0.48	10.98 ± 0.40	19.35 ± 0.82
Glycerol concn. (%wt)	62.9 ± 2.30	62.9 ± 0.65	65.7 ± 1.19	67.8 ± 1.02	67.8 ± 1.12	62.5 ± 2.16	76.6 ± 4.11
Calculations							
Mass balance (%)	+0.71 ± 0.18	+0.83 ± 0.48	+0.29 ± 0.36	-0.01 ± 0.25	-0.29 ± 0.44	-0.07 ± 0.74	-0.86 ± 0.76
Glycerol yield ^[a] (g/100g)	8.82 ± 0.22	8.81 ± 0.05	10.08 ± 0.07	11.93 ± 0.22	12.25 ± 0.25	10.94 ± 0.23	21.74 ± 1.25
Glycerol yield ^[b] (g/mol)	81.5 ± 3.29	83.4 ± 1.62	97.6 ± 0.54	105.3 ± 2.54	106.9 ± 4.71	107.0 ± 3.87	188.5 ± 7.98
MeOH partition coeff ^[c]	11.2 ± 2.23	10.5 ± 0.99	10.4 ± 1.33	8.45 ± 0.70	8.89 ± 0.53	17.8 ± 4.10	8.79 ± 5.40
Fuel yield (g/100g) ^[d]	101.1 ± 0.00	100.3 ± 0.00	100.1 ± 0.00	99.7 ± 0.00	100.1 ± 0.00	100.4 ± 0.01	91.9 ± 0.00

^[a] Grams of crude glycerol yielded per 100 g of oil input (g/100g).

^[b] Grams of crude glycerol yielded per mol of oil input (g/mol).

^[c] The partition coefficient of methanol between crude glycerol and fuel layer is calculated as MEOH concentration in fuel (g/g fuel):MEOH concentration in glycerol (g/g glycerol) excluding catalyst NaOCH₃.

^[d] Grams of fuel yielded per 100 g of oil input (g/100g).

El glicerol crudo en este estudio contiene entre un 23.4 a 37.5 % de metanol.

2.1. Situación en Uruguay

El mayor productor de biodiesel en Uruguay es ALUR, produce unas 16.000 Toneladas/año de biodiesel que son suministradas a ANCAP, permitiendo una mezcla del 2% con el gasoil que se comercializa en el país.

Al año 2012, se produjeron 20 millones de litros de biodiesel. Actualmente la composición del biodiesel es un 60 % de origen vacuno y 40 % de origen vegetal. Una fracción de la glicerina refinada, es exportada a países europeos (1000 ton) y 600 ton fueron comercializadas a nivel nacional, como alimento animal. (ALUR 2013)

Existen numerosos pequeños productores, como ser, Biogran, con una capacidad de producción de biodiesel de 250 ton/mes. El glicerol crudo es producido y almacenado y se ofrece a la venta como complemento para ración animal en el mercado interno. Muchos pequeños productores no cuentan con sistema de recuperación de metanol, almacenando el glicerol crudo.

De acuerdo a la ley 18145, a partir del 1 de enero del 2012, se debería contar con un 5% de biodiesel en el gas oil. Actualmente el porcentaje de biocombustible se mantiene al 2 %, por lo que se prevé en un corto plazo, un aumento de la producción de biodiesel en función del cumplimiento de la normativa vigente. El aumento en la capacidad y producción de biodiesel, traerá aparejado un aumento en la cantidad de glicerol crudo producido. (Khardenavis, y otros 2007)

3. METABOLISMO DEL GLICEROL CRUDO EN MICROORGANISMOS

El Glicerol tiene aplicaciones prometedoras en bioconversión, obteniéndose compuestos de alto valor. Este compuesto no solo es económico y abundante, sino que también tiene un alto grado de reducción mayor que los azúcares, ofreciendo la oportunidad de obtener químicos reducidos como Succinato, Etanol, Propionato, y otros compuestos de alto valor.

Como otras moléculas pequeñas no cargadas, el glicerol puede atravesar la membrana citoplasmática por difusión pasiva. La difusión es facilitada a través de una proteína de membrana (facilitadora del Glicerol (GlpF)). El glicerol intracelular es a continuación convertido en Glicerol-3-fosfato por la glicerolquinasa y es retenido en la célula para luego ser metabolizado. (Da Silva, Mack y Contiero 2009)

Algunas cepas de *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter* y *Lactobacillus*, son capaces de crecer anaeróticamente en glicerol como única fuente de carbono. Microorganismos como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, pueden metabolizar glicerol tanto por el camino reductor y por el camino oxidativo

En la vía oxidativa, (Figura 2) la enzima dependiente de NAD⁺, glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.6) cataliza la conversión del glicerol a dihidroxiacetona y la enzima glicolítica dihidroxiacetona quinasa (EC 2.71.29) fosforila al producto, obteniendo dihidroxiacetona-fosfato, la cual continúa en la vía de la glicólisis. La vía reductora es catalizada por la enzima glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.28) coenzima-B12 dependiente, convirtiendo el Glicerol a 3-hidroxi propionaldehído, y por medio de la enzima 1,3-propanediol dehidrogenasa (NAD⁺, dependiente) reduce el 3- hidroxipropionaldehído a 1,3-propanodiol, regenerándose NAD⁺. El producto obtenido es altamente específico de la fermentación del Glicerol y no puede ser obtenido por ninguna otra conversión anaeróbica. (Da Silva, Mack y Contiero 2009)

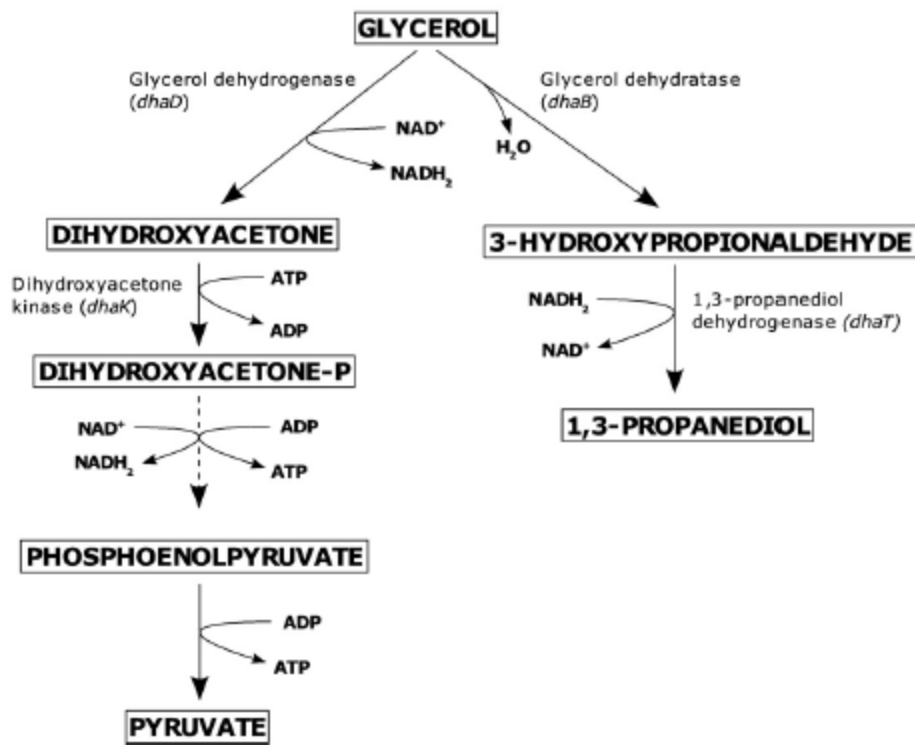


Figura 2. Vía oxidativa y reductiva del glicerol (Da Silva, Mack y Contiero 2009)

Dentro de los posibles productos finales obtenidos por la metabolización del glicerol se encuentran: propionato, butirato, butano, dihidroxiacetona y polihidroxialcanoatos (a partir de acetilcoA) (Figura 3).

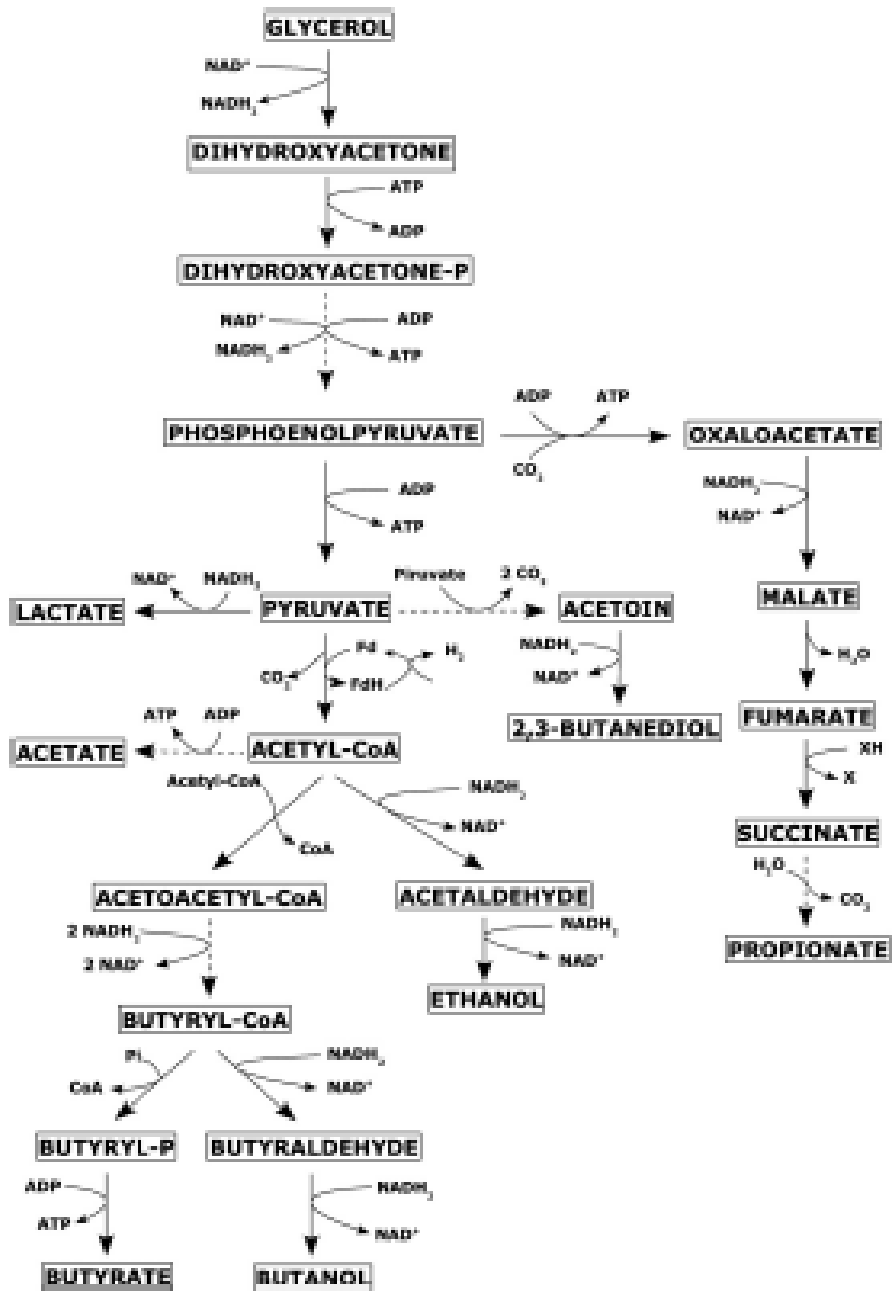


Figura 3. Metabolismo del glicerol ((Da Silva, Mack y Contiero 2009)

3.1. Ruta biosintética de PHAs a partir de glicerol

Bormann y Roth (1999), describieron la producción de PHB por *Methylobacterium rhodesianum* y *Ralstonia eutropha* en un medio conteniendo glicerol y casaminoácidos. Ashyby, Solomain y Foglia (2004) utilizaron *Pseudomonas corrugata* y *P. Oleovorans* para producción de PHA a partir de los co-productos de la producción de Biodiesel, la mezcla contenía glicerol, ácidos grasos libres y metil ésteres de ácidos grasos, sus resultados mostraron que el glicerol era el sustrato de preferencia para *P. Oleovorans*. El glicerol es un sustrato favorable energéticamente para la formación de Acetil-CoA, precursor de la síntesis de PHB (Figura 4). Los autores concluyeron que el co-producto del Biodiesel puede ser utilizado para producción de PHA sin necesidad de separar o recuperar el Glicerol de los otros componentes.

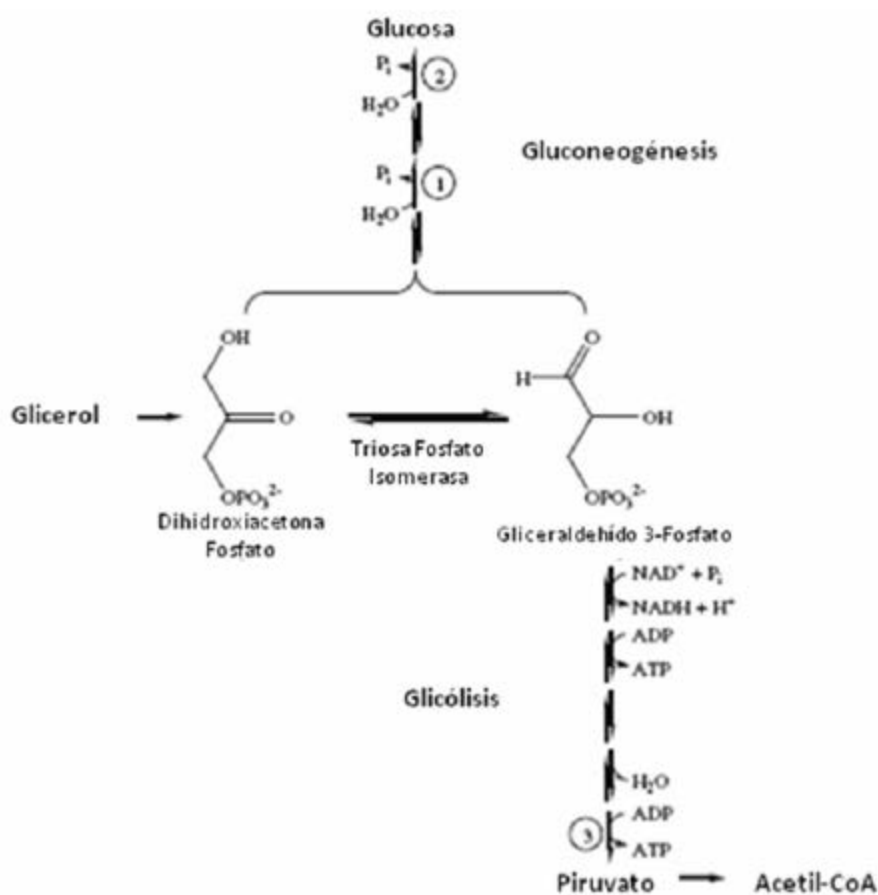


Figura 4. Ruta de producción de AcetilCoA precursor de la síntesis de PHAs a partir de glicerol.

3.2. Ruta biosintética de PHAs a partir de metanol

Las bacterias metilótrofas, utilizan compuestos metilados (pero no metano), estos compuestos de un carbono son entre otros el metanol. Estas bacterias pueden sintetizar compuestos a partir de esta fuente de carbono y además oxidarla para obtener energía. Ejemplos de estas bacterias son *Methylomonas* y *Methylobacter*.

La bacteria oxida metanol a formaldehído, que es condensado con tetrahidrometanopterina y luego oxidado a formiato. El formiato reacciona con tetrahydropterina y el formil-tetrahydrofolato, es luego convertido en metilen tetrahydrofolato (Parte 1) (Figura 5). El ciclo de la serina es utilizado para asimilar formaldehído más bicarbonato (Parte 2). La asimilación del acetil-coA y conversión a glioxilato ocurre por la vía del etilmalonilCoA (Parte 3) (Smejkalova, Erb y Fuchs 2010).

El acetil-coA proveniente de la ruta de la serina, es el intermediario clave que se introduce en la ruta metabólica de producción y acumulación de PHAs.

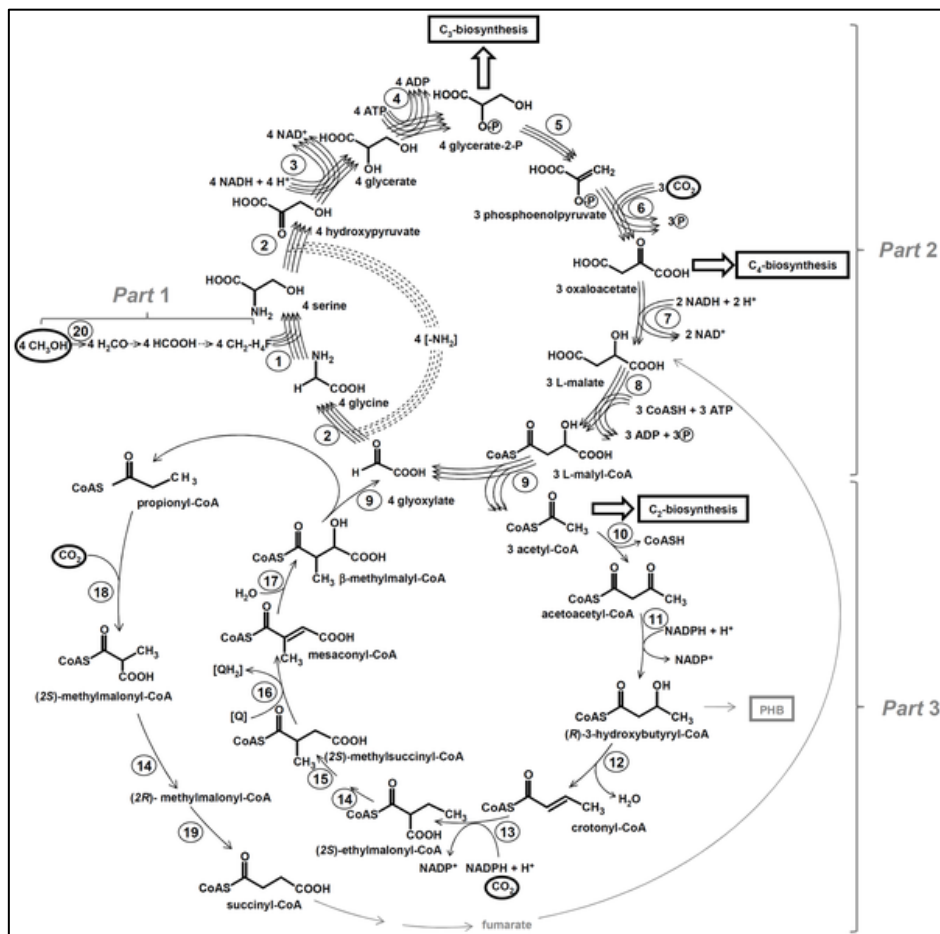


Figura 5. Ruta metabólica de asimilación de metanol y formación de precursores para la síntesis de PHAs (Smejkalova, Erb y Fuchs 2010)

3.3. Efecto de los ácidos grasos presentes en el glicerol crudo en la producción de PHAs.

Los microorganismos pueden redirigir el flujo de acetilCoA de la formación de biomasa hacia la acumulación de PHA (Koller, y otros 2007). El acetilCoA puede incorporarse en varias rutas competitivas: formación de acetato, síntesis de ácidos grasos, formación de citrato y síntesis de PHAs. (Lee y Chang 1996). El menor requerimiento de acetil coA en otras vías metabólicas aumenta la acumulación de PHA. La influencia de la adición de pequeñas cantidades de

fuentes complejas de nitrógeno y ácido oleico en la acumulación de PHB fue estudiada en *E. coli* recombinante por Lee y Chang (1996) y en *R. eutropha* por Martínez y otros (s.f.). El agregado de pequeñas cantidades de fuentes complejas de nitrógeno y ácidos grasos (como el ácido oleico) en un medio definido reducen la cantidad de acetilCoA necesario en la vía del ciclo de Krebs y ácidos grasos, redirigiendo el flujo de carbono hacia la síntesis de PHB, resultando en una mayor producción y acumulación.

4. ANTECEDENTES DE PRODUCCIÓN MICROBIANA DE PHA A PARTIR DE GLICEROL Y METANOL

Se resume en la Tabla 2, los antecedentes bibliográficos de producción de PHA a partir de glicerol y glicerol crudo para diferentes microorganismos.

Tabla 2. Antecedentes de producción de PHAs a partir de glicerol

Microorganismo	Fuente de Carbono	PHB (g/L)	% PHB (Peso seco celular)	Productividad (g/L h)	Referencia
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	Glicerol	4.75	81.9	0.066	(Zhu, y otros 2010)
<i>Cupriavidus necator</i> JPM134	Glicerol	-	70	-	(Cavalheiro, y otros 2009)
	Glicerol crudo	-	48	-	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glicerol	51.2	62	1.51	(Steinbuechel 2001)
Organismo osmofílico <i>Metilobacterium rhodesianum</i> MB126	Glicerol crudo	16.2	49.6	0.05	(Koller, y otros 2007) (Bormann y Roth 1999)
	Glicerol	11	50	0.23	
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 11348	Glicerol	9.7	42	0.210	(Bormann y Roth 1999)
	Glicerol	17.6	65	0.39	
<i>Escherichia coli</i> CT1061	Glicerol	18.8	51	0.18	(Pablo, y otros 2008)
<i>Escherichia coli</i> ATCC:PTA-1597	Glicerol	-	60	-	(Mahishi, Tripathi y Rawal 2003)
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicerol	4.55	45.3	0.03	(Naranjo Vasco 2010)
<i>B. megaterium</i>	Glicerol	8.73	55.99	0.27	(Naranjo Vasco 2010)

Se resume en la Tabla 3, los antecedentes bibliográficos de producción de PHA a partir de metanol para diferentes microorganismos.

Tabla 3. Antecedentes de producción de PHAs a partir de metanol

Microorganismo	Fuente de carbono	% Acumulación	Productividad (g/Lh)	Referencia
<i>M. extorquens</i> ATCC 55366	Metanol	40-46	0.8	(Cavalheiro, y otros 2009)
<i>Methylobacterium</i> sp GW2	Metanol	38.5	-	(Mokhtari-Hosseini, y otros 2009)
<i>M.extorquens</i> DSMZ 1340	Metanol	62.3	0.18	(Zahra, y otros 2009)
<i>M. extorquens</i>	Metanol	7-21	-	(Taidi, y otros 1994)

5. BIBLIOGRAFÍA

ALUR. 2013. www.alur.com.uy (último acceso: 2013).

Ashyby, R D, D. K.Y. Solomain, y T. A. Foglia. «Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream.» *Journal of Polymers and the Environment* 12, nº 3 (2004): 105-112.

Biodiesel Technotes. www.biodieseleducation.org. 2006.

Bormann, E. J., y M. Roth. «Production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates.» *Biotechnol. Lett.* 21 (1999): 1059-1063.

Braunegg, Gerhart, Gilles Lefebvre, y Klaus F. Genser. «Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.» *Journal of Biotechnology* 65, nº 2-3 (1998): 127-161.

Brown, Ryan. *Biodiesel Co-Product Markets in Wyoming*. iCAST, 2005.

Cavalheiro, J.M B.T, .C M.D De Almeida, C. Grandfils, y M.m R. Da Fonseca. «Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupravidus necator* using waste glycerol.» *Process Biochemistry* 44 (2009): 509-515.

Da Silva, Gervásio Paulo, Mathias Mack, y Jonas Contiero. «Glycerol: A promising and abundant source for industrial microbiology.» *Biotechnology Advances* 27 (2009): 30-39.

Kettl, Karl, Michaela Titz, Martin Koller, Khurram Shahzad, Hans Schnitzer, y Michael Narodoslowsky. «Process design and evaluation of biobased polyhydroxyalkanoates (PHA) production.» *Chemical Engineering Transactions* 25 (2011): 983-987.

Khardenavis, A A, Kumar M Suresh, S N Mudliar, y T Chakrabarti. «Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly beta-hydroxybutyrate.» *Bioresource Technology* 98 (2007): 3579-3584.

Koller, M., P. Hesse, R. Bona, C. Kutschera, A. Atlic, y G Braunegg. «Potential of various archae and eubacterial strain as industrial polyhydroxyalkanoates producers from whey.» *Macromol. Biosci* 7 (2007): 218-226.

Lee, S. Y., y H. O. Chang. «Characteristics of Poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis in recombinant *Escherichia coli*.» *Annals of the New York Academy Sciences* 782, nº 1 (1996): 133-142.

Mahishi, LH, G. Tripathi, y SK. Rawal. «Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources.» *Microbiol REs.* 158 (2003): 19-27.

Martinez, G. A., I. A. Laborda, M. I. Maisonneuve, y H. Varela. «Poliéster bacteriano: Desarrollo del medio de cultivo.» *Congreso AIQU*. s.f.

- Mokhtari-Hosseini, Z., Vasheghani-Farahani, Darini Heidarzadeh-Vazifekhoran, y Karimzadeh Shjaosadati. *Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by methylotrophic bacterium*. Biotechnology group, Faculty of Engineering and National Nutrition and Food Technology Institute of Iran, 2009.
- Naranjo Vasco, Javier Mauricio. *Producción de polihidroxitirato a partir de residuos agroindustriales*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, 2010.
- Pablo, IN, MJ Pettinari, MA Galvagno, y BS Méndez. «Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures.» *Appl. Microbiol Biotechnol* 77 (2008): 1337-1343.
- Smejkalova, H., T. H. Erb, y G. Fuchs. «Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: Demonstration of all enzymes and their regulation.» *PlusOne* 5, nº 10 (2010).
- Soloiman, D.K Y., R. D. Asby, T. A. Foglia, y W. M. Marmer. «Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates).» *Applied Biotechnology and Microbiology* 71 (2006): 783-789.
- Steinbuechel, A. «Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example.» *Macromolecular Bioscience* 1 (2001): 1-24.
- Taidi, Behnam, Alistair J. Anderson, Edwin A. Dawes, y David Byrom. «Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*.» *Appl. Microbiol Biotechnol* 40 (1994): 786-790.
- Tang, X M, Y S Tan, H Zhu, K Zhao, y W Shen. «Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *E. coli*.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, nº 2 (2009): 1628-2634.
- Thompson, J. C., y B. He. «Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks.» *Applied Eng. Agri.* 22, nº 2 (2006): 261-265.
- Zahra, B., y otros. «Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium.» *Bioresource Technology* 100 (2009): 2436-2443.
- Zhu, C., C. T. Nomura, J. A. Perrotta, A. J. Stipanovic, y J. P. Nakas. «Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759.» *Biotechnol. Prog.* 26, nº 2 (2010): 424-430.

Capítulo 4

Screening de cepas

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	54
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.1. Composición del subproducto modelo: glicerol crudo	54
2.2. Selección de microorganismos productores de PHA	54
2.2.1. Cepas pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería productoras de PHAs (Grupo A)	54
2.2.2. Cepas aisladas de la Antártida (Grupo B)	54
2.2.3. Cepas adquiridas en ceparios.....	56
2.3. Activación y Conservación de las cepas	56
2.4. Detección de PHA en los cultivos bacterianos	56
2.4.1. Cepas Grupo A.....	56
2.4.2. Cepas Grupo B.....	57
2.4.3. Cepas obtenidas en ceparios.....	57
2.5. Aislamiento de glicerol crudo.....	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
3.1. Aislamiento de glicerol crudo.....	58
3.2. Crecimiento de cepas en subproducto modelo	58
3.2.1. Cepas Grupo A.....	58
<i>Acinetobacter</i> sp.....	58
3.2.2. Cepas Grupo B.....	58
3.2.3. Cepas obtenidas de ceparios.....	59
3.3. Tinción de PHAs.....	60
4. CONCLUSIONES	61
5. BIBLIOGRAFÍA.....	63
Tabla 1. Cepas antárticas grupo a)	55
Tabla 2. Cepas antárticas grupo b).....	55
Tabla 3. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas grupo A.....	58
Tabla 4. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas grupo Ba	59
Tabla 5. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas grupo Bb.....	59
Tabla 6. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas obtenidas de ceparios	60
Tabla 7. Tinción de PHA en <i>R. eutropha</i> y <i>M. extorquens</i>	60
Figura 1. Tinción de Negro Sudán en <i>M. extorquens</i>	61
Figura 2. Tinción Negro Sudán en <i>R. eutropha</i>	61

1. OBJETIVO

Evaluación y selección de cepas pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería y proporcionadas por ceparios. Aislamiento de cepas productoras de PHA presentes en glicerol crudo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Composición del subproducto modelo: glicerol crudo

Dado la variación en la composición del glicerol subproducto de biodiesel se decidió trabajar con un medio modelado. La composición de este medio tiene en cuenta las peores condiciones en las cuales se puede encontrar este subproducto: sin recuperación de metanol. Basado en estudios realizados por diversos autores (Thompson y He s.f.) y la información brindada por productores nacionales de biodiesel se seleccionó la siguiente composición del subproducto modelo: glicerol (67% m/m), metanol (30% m/m), catalizador (1% m/m) agua (2%). Los monoacilglicéridos no fueron considerados dado que la cantidad presente en este subproducto es generalmente despreciable, y de estar presentes en el medio producen aumento en el crecimiento bacteriano y acumulación de PHA (Martinez, y otros 2008). La influencia del catalizador sólido básico se descarta en base a estudios anteriores (Cavalheiro, y otros 2009).

2.2. Selección de microorganismos productores de PHA

Para la selección de microorganismos productores se utilizaron cepas pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería y cepas adquiridas en ceparios. Además se planteó una estrategia de aislamiento de cepas de un subproducto de biodiesel proporcionado por un productor local. Las cepas utilizadas para el screening pertenecientes al Dpto. se pueden dividir en dos grupos:

2.2.1. Cepas pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería productoras de PHAs (Grupo A)

Se utilizaron cepas aisladas e identificadas como productoras de PHAs, en trabajos previos realizados en el Dpto de Bioingeniería (Loperena, y otros 2007).

Acinetobacter sp.,

Brachymonas sp.,

Pseudomonas sp.,

Bacillus sp.,

Staphylococcus sp.

2.2.2. Cepas aisladas de la Antártida (Grupo B)

De las más de 500 cepas antárticas pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería (muchas de ellas aún sin identificar), se seleccionaron aquellas aisladas de locaciones en las cuales, fuera más factible encontrar cepas productoras. Las cepas antárticas pueden poseer la ventaja de tener temperaturas óptimas de crecimiento inferiores a sus contrapartes mesófilas (con

temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 20 °C) siendo atractivas desde el punto de vista industrial por requerir su cultivo menor consumo de energía. En este sentido y según su locación se seleccionaron dos grupos de cepas:

- a) Potenciales cepas pertenecientes al género *Metilobacterium*

Tabla 1. Cepas antárticas grupo a)

Cepa	Muestra de origen	Sitio de recolección
28b	Suelo con gas oil	Tanque 1 de Combustible Base Artigas
29c	Suelo con gas oil	Tanque 1 de Combustible Base Artigas
104a	Madera en descomposición	Playa, Deception Island
104b	Madera en descomposición	Playa, Deception Island
137a	Suelo y roca con gas oil	Tanque 2 de combustible Base Artigas
137b	Suelo y roca con gas oil	Tanque 2 de combustible Base Artigas
137c	Suelo y roca con gas oil	Tanque 2 de combustible Base Artigas
127a	Madera en descomposición	Deception Island
127b	Madera en descomposición	Deception Island

- b) Potenciales cepas pertenecientes al género *Vibrio*.

Tabla 2. Cepas antárticas grupo b)

Cepa	Muestra de origen	Sitio de recolección
40a	Sedimento	Deshielos entre Base Artigas y Pta. Suffield
40b	Sedimento	Deshielos entre Base Artigas y Pta. Suffield
40c	Sedimento	Deshielos entre Base Artigas y Pta. Suffield
47a	Sedimento en rocas	Baliza Punta Suffield
47b	Sedimento en rocas	Baliza Punta Suffield
47c	Sedimento en rocas	Baliza Punta Suffield
47d	Sedimento en rocas	Baliza Punta Suffield
16a	Sedimento	Cañada Base Artigas
16b	Sedimento	Cañada Base Artigas
61a	Sedimento profundo	Lago Uruguay
61b	Sedimento profundo	Lago Uruguay
62a	Sedimento de la orilla	Lago Uruguay
62b	Sedimento de la orilla	Lago Uruguay
2-2	Agua de Mar	
8-4	Agua de Mar	
4-3	Agua de Mar	
2-6	Agua de Mar	
3-7	Agua de Mar	
7-3	Agua de Mar	
2-7	Agua de Mar	
9-2	Agua de Mar	
3-9	Agua de Mar	
8-6	Agua de Mar	
4-2	Agua de Mar	

2.2.3. Cepas adquiridas en ceparios

Las cepas evaluadas adquiridas en ceparios fueron: *Ralstonia eutropha* DSM 545 y *Methylobacterium extorquens* DSM 1340, se seleccionaron en base a la bibliografía consultada por ser capaces de acumular PHA en sustratos similares al propuesto. (Bormann y Roth 1999) (Taidi, y otros 1994) (Mokhtari-Hosseini, y otros 2009) (Joa, y otros 2009).

2.3. Activación y Conservación de las cepas

Las cepas se encontraban almacenadas en crioviales en freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, con 20 % de glicerol (crioprotector). La activación se realizó mediante siembra en TSA y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, salvo las cepas antárticas que se incubaron a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta que el microorganismo alcanzara un crecimiento prudencial, desde un punto de vista cualitativo. Posteriormente se conservó el microorganismo activo en tubos inclinados de TSA a 4°C .

2.4. Detección de PHA en los cultivos bacterianos

Todas las cepas fueron cultivadas en 3 mL de medio líquido (tubos) y en medio sólido (placas). La presencia de acúmulos de PHA, se determinó mediante tinción de frotis con violeta cristal y tinción de PHAs con Negro Sudán. En los cultivos sólidos, además se revela la presencia de PHA por fluorescencia de la biomasa bañadas en Azul Nilo (Loperena, y otros 2007). Para cada cepa se realizó un seguimiento cualitativo (a diferentes tiempos) para evaluar crecimiento y producción de PHA mediante tinción de frotis con Negro Sudán. Para las cepas positivas en esta tinción se realiza una confirmación por detección de fluorescencia en UV en los cultivos sólidos bañados con Azul Nilo. La confirmación se realiza dado que la tinción de frotis con negro Sudán no es específica para PHAs. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. La descripción de las técnicas empleadas, se encuentran detalladas en el ANEXO *Técnicas analíticas*.

2.4.1. Cepas Grupo A

Las cepas pertenecientes al grupo A, se incubaron en las condiciones descritas anteriormente (Loperena, y otros 2007) y utilizando un medio mineral descrito en el mismo trabajo. La composición del medio de cultivo fue, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/L KH_2PO_4 , 7g/L Na_2HPO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H_2BO_4 , 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Como fuente de carbono se utilizaron tres concentraciones diferentes del subproducto modelo (diluciones manteniendo la relación glicerol: metanol fija): 0.67 % v/v glicerol, 0.5 metanol % v/v (Concentración A); 1.0 % v/v glicerol, 0.75 metanol % v/v (Concentración B) y 1.34 % v/v glicerol, 1 metanol % v/v (Concentración C). Este rango se determinó en base a la tolerancia al metanol reportada en metilobacterias (Mokhtari-Hosseini, y otros 2009). Dado que son cepas sobre las cuales ya se reportó presencia de PHAs en otras fuentes de carbono, se evalúan 3 concentraciones de fuente de carbono. Las cepas fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 7.

2.4.2. Cepas Grupo B

Para las cepas del grupo Ba se utilizó un medio base para metilobacterias reportado en Mokhtari-Hosseini, y otros (2009) utilizando como fuente de carbono subproducto modelo, en concentración equivalente en metanol, según lo descrito en dicho trabajo. La composición del medio de cultivo fue: 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L Na_2HPO_4 y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mg/L, H_3BO_3 0.2 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L. Dado el origen de estas cepas, la temperatura de incubación utilizada fue 15°C y pH 7

De igual forma para las cepas del grupo Bb se utilizó un medio base reportado en bibliografía como óptimo para el crecimiento de *Vibrio* (Chien y al 2007), sustituyendo la fuente de carbono por subproducto modelo. El medio de cultivo base fue medio marino: sales marinas 28 g/L triptona 2.5 g/L y extracto de levadura 1 g/L. Las cepas se incubaron a 15°C y pH 7.

2.4.3. Cepas obtenidas en ceparios

Para las cepas obtenidas de ceparios, se utilizaron como medio base, medios reportados anteriormente. Para *Ralstonia eutropha* DSM 545 (Martinez, y otros 2008): 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/L KH_2PO_4 , 7g/L Na_2HPO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H_2BO_4 , 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Los cultivos se realizaron a 35 °C y pH 7

Para *Metilobacterium extorquens* DSM 1340 se utilizó el medio descrito en Mokhtari-Hosseini, y otros (2009), La composición del medio de cultivo fue: 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L Na_2HPO_4 y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mg/L, H_3BO_3 0.2 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L. La temperatura de incubación utilizada fue 37°C y pH 7.

Como fuente de carbono, en ambas cepas, se ensayaron las mismas tres concentraciones del subproducto modelo descrito para las cepas del grupo A. Dado que son cepas sobre las cuales ya se reportó presencia de PHAs en otras fuentes de carbono, se evalúan 3 concentraciones de fuente de carbono.

2.5. Aislamiento de glicerol crudo

Para el aislamiento de cepas del subproducto real, se utilizó un medio base de caldo nutriente para medio líquido y agar nutriente para medio sólido. Como fuente de carbono se utilizaron las tres concentraciones de subproducto modelo antes descritas. Se realizaron varias tomas del subproducto real se sembraron en medio sólido y en medio líquido, ambos se incubaron a 37°C. El aislamiento se realizó por estriado en medio sólido y por diluciones sucesivas en medio líquido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de glicerol crudo

Se aislaron levaduras y hongos, no se aislaron bacterias.

3.2. Crecimiento de cepas en subproducto modelo

Se realizó un seguimiento cualitativo con inspección visual y tinción de Gram para el caso de cepas crecidas en medio líquido, e inspección bajo lupa, en los ensayos realizados en medio sólidos en placa de Petri. Como referencia para el crecimiento se utilizó la siguiente simbología:

(-) Sin crecimiento.

(+) Crecimiento leve o solo observable bajo lupa (medio sólido).

(++) Crecimiento apreciable.

(+++) Crecimiento abundante.

3.2.1. Cepas Grupo A

Tabla 3. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas grupo A

Cepa	Medio líquido 72 h.			Medio sólido 72 h		
	Conc. A	Conc. B	Conc. C	Conc. A	Conc. B	Conc. C
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Brachymona</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-

No se observó crecimiento en ninguna de las concentraciones del subproducto modelo ensayada (Tabla 3).

3.2.2. Cepas Grupo B

En el estudio de crecimiento para cepas Antárticas pertenecientes al Grupo Ba, aproximadamente un 78 % de las cepas fueron capaces de crecer en el medio ensayado. Se determinó que la mayoría de las cepas capaces de crecer eran Bacilos Gram (-). Se produjo crecimiento tanto a nivel de cultivo líquido como sólido (Tabla 4).

Tabla 4. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas grupo Ba

Cepa	Medio líquido		Medio sólido		Descripción
	48 h	120 h	48 h	120 h	
28b	+	+	+	+	Coco Bacilo Gram (-)
29c	-	-	-	-	
104a	++	++	++	++	Bacilo Gram (-)
104b	++	++	++	++	Bacilo Gram (-)
137a	+	++	+	++	Bacilo Gram (-)
137b	-	-	-	-	
137c	-	+	-	+	Bacilo Gram (-)
127a	+	++	+	++	Coco Bacilo Gram (-)
127b	-	+	-	+	Bacilo Gram (-)

En el grupo de cepas Bb, el 75 % de las mismas crecieron en el medio de cultivo utilizado, el 25 % creció en menos de 24 horas en forma abundante, lo cual le brinda un gran potencial desde un punto de vista industrial. Al igual que el grupo anterior, se determinó que en su gran mayoría eran bacilos Gram (-) (Tabla 5).

Tabla 5. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas grupo Bb

Cepa	Medio sólido				Medio líquido		Descripción
	24h	48 h	72 h	96 h	48 h	120 h	
40a	-	-	-	-	-	+	Bacilo Gram (-)
40b	-	-	-	-	-	+	Bacilo Gram (-)
40c	-	-	-	++	-	+	Bacilo Gram (-)
47a	-	+	++	++	-	+	Bacilo Gram (-)
47b	-	-	+	++	-	+	Bacilo Gram (-)
47c	-	+	++	++	-	++	Bacilo Gram (-)
47d	-	+	++	++	-	++	Bacilo Gram (-)
16a	-	-	++	++	-	+	Bacilo Gram (-)
16b	-	+	+++	+++	-	++	Bacilo Gram (-)
61a	-	+	++	++	-	+	Bacilo Gram (-)
61b	-	+	+++	+++	-	+	Bacilo curvado Gram (-)
62a	-	-	+	++	-	+	Bacilos Gram (-) y Gram (+)
62b	-	-	-	-	-	-	sin crecimiento
2-2	+++	+++			++	++	Bacilos Gram (-) y Gram (+)
8-4	+++	+++			++	++	Bacilo Gram (-)
4-3	-	-	-	-	-	-	sin crecimiento
2-6	+++	+++			++	++	Bacilos y cocobacilos Gram (-)
3-7	-	-	-	-	-	-	sin crecimiento
4-3	-	-	-	-	-	-	sin crecimiento
2-7	+++	+++			++	++	Bacilo Gram (-)
9-2	+++	+++			+	++	Bacilo Gram (-)
3-9	-	-	-	-	-	-	sin crecimiento
8-6	-	-	-	-	-	-	sin crecimiento
4-2	+++	+++			++	++	Bacilo Gram (-)

3.2.3. Cepas obtenidas de ceparios.

Para *Ralstonia eutropha* DSM 545, se observó mayor crecimiento a mayores concentraciones del medio modelo. Si bien ya se ha reportado la tolerancia de *R. eutropha* a la presencia de

metanol, todavía no se había reportado en concentraciones como las ensayadas en este trabajo (Tabla 6).

Contrariamente para *Metilobacterium extorquens* DSM 1340, se observa mayor crecimiento a menores concentraciones del subproducto modelo (Tabla 6).

Tabla 6. Cultivos en medio líquido y sólido: Cepas obtenidas de ceparios

Cepa	Medio líquido 72 h			Medio sólido 72 hs		
	Conc. A	Conc. B	Conc. C	Conc. A	Conc. B	Conc. C
<i>R.eutropha</i> DSM 545	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>M.extorquens</i> DSM 1340	+++	++	++	+++	+++	++

3.3. Tinción de PHAs

A los cultivos en los que se registró crecimiento, se le realizaron frotis y tinción con Violeta Cristal y Negro Sudán, se verificó la presencia del polímero por fluorescencia en los cultivos en placa bañados con Azul Nilo.

La tinción de frotis con Violeta Cristal tiñe la parte vegetativa de la célula de color violeta y las inclusiones permanecen sin teñir. Esta técnica no es específica para la detección de inclusiones de PHAs, por lo que frente a la visualización de inclusiones sin teñir se debe verificar la presencia de PHAs mediante otra técnica. Como técnicas de confirmación, se utilizaron la tinción de frotis con técnica de Negro Sudán (célula rosada e inclusiones azul oscuro) y baño en placa con Azul Nilo y detección de fluorescencia (colonias naranjas).

Con la técnica de tinción de frotis con violeta cristal, solo se hallaron inclusiones en las cepas *R. eutropha* DSM 545 y *M. extorquens* DSM 1340. Se realizó un seguimiento a las 48 y 72 horas de incubación obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 7):

Tabla 7. Tinción de PHA en *R. eutropha* y *M. extorquens*

Cepa	48 h			72 h		
	Conc. A	Conc. B	Conc. C	Conc. A	Conc. B	Conc. C
<i>R.eutropha</i> DSM 545	-	-	-	-	+*#	+*#
<i>M.extorquens</i> DSM 1340	+*	-	-	+*#	+*	

Referencias (+) Presencia de inclusión con tinción de violeta cristal, * verificado con Tinción Negro Sudán, (#) verificado con fluorescencia con baño en placa de azul nilo.

Se observó en *R. eutropha* presencia de inclusiones de PHAs a partir de las 72 horas de incubación, siendo más notorias a altas concentraciones de subproducto modelo.

Para *M extorquens*, se detectó acumulación de PHAs a partir de las 48 horas mediante técnica de tinción de frotis con Negro Sudán, no se observó fluorescencia frente a exposición UV en placa con baño de azul nilo. Esto puede deberse a la baja concentración del biopolímero a las 48 horas de incubación. Se observó mayor acumulación a bajas concentraciones, a las 72 horas de incubación y el ensayo con azul nilo resultó positivo.

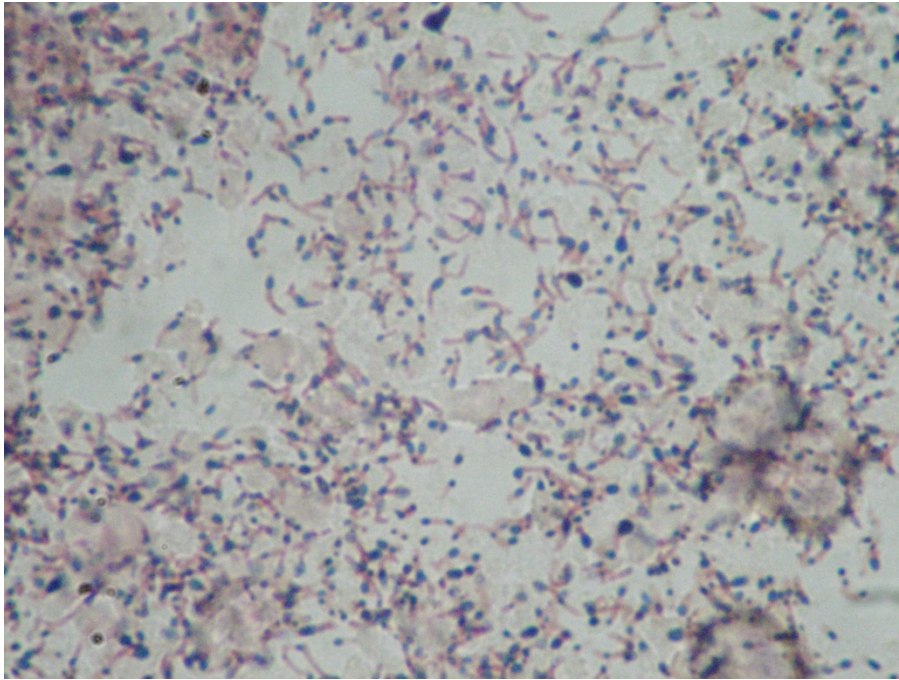


Figura 1. Tinción de Negro Sudán en *M. extorquens*

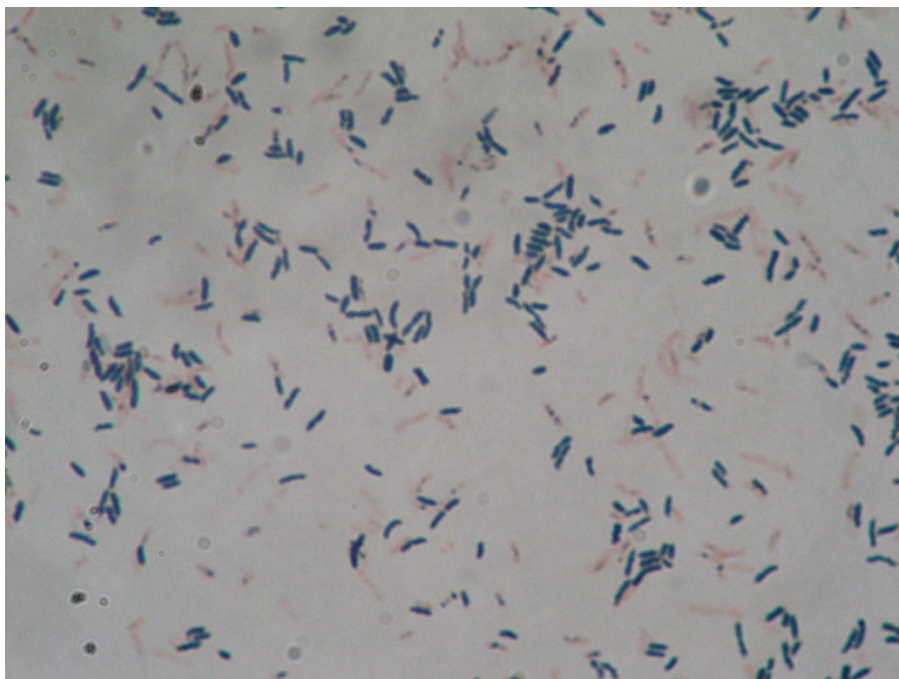


Figura 2. Tinción Negro Sudán en *R. eutropha*

4. CONCLUSIONES

No se lograron aislar bacterias del subproducto real. Un gran porcentaje de las bacterias antárticas analizadas fueron capaces de crecer en el medio modelo planteado sin acumulación de PHAs. Ninguna de las bacterias pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería productoras de PHAs en otros medios, crecieron en el medio modelo planteado.

Las cepas *M extorquens* DSM 1430 y *R. eutropha* DSM 545 crecieron y acumularon PHAs en las condiciones ensayadas. Se continúa con ellas en las siguientes experiencias.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bormann, E.J., y M Roth. «The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates.» *Biotechnology Letters*, 1999: 1059-1063.
- Cavalheiro, J.M B.T, .C M.D De Almeida, C. Grandfils, y M.m R. Da Fonseca. «Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol.» *Process Biochemistry* 44 (2009): 509-515.
- Chen, Yinguang, Jian Chen, y Haizhen Yang. «Kinetics of PHB-containing biomass disruption in surfactant chelate aqueous solution.» *Process Biochemistry*, nº 38 (2003): 173-182.
- Chien, y et al. *Journal of Biotech*, 2007: 259-263.
- Joa, Cavalheiro, Catarina de Almeida, Christian Grandfils, y Fonseca. «Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol.» *Process Biochemistry*, 2009: 509-515.
- Loperena, Lyliam, Hermosinda Varela, Guadalupe Martinez, Fiorella Crovetto, y Valeria Romano. «Production of biodegradable plastics PHB (Polyhydroxybutyrate) from different substrate: screening of producer microorganisms.» *SinaFerm, Curitiba, Brasil*, 2007.
- Martinez, Guadalupe, Ignacio Laborda, Ines Maisonneuve, y Hermosinda Varela. «POLIÉSTER BACTERIANO: DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO.» *IV Encuentro Regional de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay*, 2008.
- Mokhtari-Hosseini, Vasheghani-Farahani, Heidarzadeh-Vazifekhoran, Darani, Shjaosadati, y Karimzadeh. «Statical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium.» *Food Techology Institute of Iran*, 2009.
- Taidi, B, A.J. Anderson, EA Dawes, y D. Byrom. «Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of PHB produced by *Methylobacterium extorquens* y *Alcaligenes eutrophus*.» *Departament of applied biology, University of Hull, UK*, 1994.
- Thompson, J:C, y B.B He. *Appl. Engineering in Agriculture*, s.f.: 261-265.

Capítulo 5

Optimización del uso de glicerina cruda en la
formulación del medio de cultivo

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVOS	68
2. INTRODUCCIÓN	68
2.1. Selección de los factores a evaluar	68
2.2. Diseños Factoriales completos.....	69
2.3. Diseños factoriales fraccionarios	69
2.3.1. Efectos confundidos y resolución.....	71
2.4. Diseños factoriales con punto central.....	72
2.5. Modelos matemáticos.....	73
2.5.1. Estimación del error para los efectos a través de repeticiones.....	74
2.5.2. Estimación de los errores para los efectos y coeficientes a partir de repeticiones en el punto central.....	75
2.5.3. Identificación de los efectos y coeficientes significativos.....	76
2.6. Metodología de la Superficie de Respuesta.....	76
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
3.1. <i>R. eutropha</i> DSM 545	79
3.2. <i>M. extorquens</i> DSM 1340.....	79
3.3. Optimización del medio de cultivo de <i>R. eutropha</i> DSM 545	79
3.3.1. Medio de cultivo base	79
3.3.2. Diseño de experiencia: Factores y niveles ensayados.....	79
3.3.3. Condiciones de cultivo	80
3.4. Optimización del medio de cultivo de <i>M. extorquens</i> DSM 545.....	80
3.4.1. Medio de cultivo base	80
3.4.2. Diseño de experiencia: Factores y niveles ensayados.....	80
3.4.3. Condiciones de cultivo	81
3.5. Métodos analíticos.....	81
3.6. Evaluación de respuestas	81
3.7. Análisis estadístico	81
4.1. Optimización del medio de cultivo de <i>R. eutropha</i>	82
4.1.1. Rendimientos y productividades.....	82
4.1.2. Evaluación del rendimiento de producto en función de biomasa	82
4.1.3. Análisis del rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido	87
4.1.4. Análisis del rendimiento de producto basado en sustrato consumido	88

4.1.5.	Análisis de la productividad específica de producto.....	92
4.1.6.	Análisis de la productividad volumétrica de producto	95
4.2.	Optimización del medio de cultivo de <i>M. extorquens</i>	100
4.2.1.	Rendimientos y productividades.....	100
4.2.2.	Evaluación del rendimiento de producto en función del sustrato consumido (YP/S). 100	
4.2.3.	Evaluación del rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido..	105
4.2.4.	Evaluación del rendimiento de producto en función de la biomasa generada.	109
4.2.5.	Evaluación de la productividad volumétrica de producto	113
4.2.6.	Evaluación de la productividad específica de producto.....	114
4.3.	Selección de las condiciones de cultivo	118
4.3.1.	Selección de la composición del medio de cultivo para <i>R. eutropha</i>	118
a)	Condiciones de cultivo para producción Batch.....	118
b)	Condiciones de cultivo para producción Batch en dos etapas.....	119
	Primer batch.....	119
4.3.2.	Selección de la composición de medio de cultivo para <i>M. extorquens</i>	120
4.4.	Comparación de <i>R. eutropha</i> DSM 545 y <i>M. extorquens</i> DSM 1430 como productoras de PHA.....	121
5.	CONCLUSIONES	121
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	122

Tabla 1.	Estrategia de optimización	68
Tabla 2.	Planeamiento factorial fraccionario 2^{3-1} a partir de un factorial completo 2^2	70
Tabla 3.	Planeamiento factorial completo 2^3	70
Tabla 4.	Coefficientes de contraste para un diseño 2^{5-1}	71
Tabla 5.	Diseño factorial fraccionario 2^{4-1} con punto central	79
Tabla 6.	Niveles de factores para <i>R. eutropha</i> DSM 545	80
Tabla 7.	Niveles de factores para <i>M. extorquens</i> DSM 1340.....	81
Tabla 8.	Resultados <i>R. eutropha</i>	82
Tabla 9.	Análisis estadístico Y P/X <i>R. eutropha</i>	83
Tabla 10.	Niveles óptimos Y P/X <i>R. eutropha</i>	86
Tabla 11.	Análisis YX/S en <i>R. eutropha</i>	87
Tabla 12.	Análisis estadístico Y P/S <i>R. eutropha</i>	88
Tabla 13.	Niveles de factores optimizados Y P/S <i>R. eutropha</i>	91
Tabla 14.	Análisis estadístico qP <i>R. eutropha</i>	92
Tabla 15.	Niveles óptimos de factores qP <i>R. eutropha</i>	95
Tabla 16.	Análisis estadístico QP <i>R. eutropha</i>	96
Tabla 17.	Tabla de niveles óptimos QP <i>R. eutropha</i>	99
Tabla 18.	Rendimientos y productividades <i>M. extroquens</i>	100
Tabla 19.	Análisis estadístico YP/S en <i>M. extorquens</i>	101

Tabla 20. Nivel Óptimo de YP/S <i>M. extorquens</i>	104
Tabla 21. Análisis estadístico de YX/S para <i>M. extorquens</i>	105
Tabla 22. Nivel Óptimo de YX/S <i>M. extorquens</i>	108
Tabla 23. Análisis estadístico para YP/X <i>M. extorquens</i>	109
Tabla 24. Nivel Óptimo de YP/X <i>M. extorquens</i>	112
Tabla 25. Resultados de análisis de Qp en <i>M. extorquens</i>	113
Tabla 26. Análisis de qp en <i>M. extorquens</i>	114
Tabla 27. Nivel Óptimo de qP <i>M. extorquens</i>	117
Tabla 28. Niveles óptimos de factores <i>R. eutropha</i>	118
Tabla 29. Composición de factores evaluados para una producción batch	119
Tabla 30. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (primer batch)	119
Tabla 31. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (segundo batch)	119
Tabla 32. Niveles óptimos de factores <i>M. extorquens</i>	120
Tabla 33. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (primer batch)	120
Tabla 34. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (primer batch)	120
Tabla 35. Composición de factores evaluados para una producción batch	121
Tabla 36. <i>M. extorquens</i> vs <i>R. eutropha</i>	121
Figura 1. Diseño factorial 2^2 con punto central.....	73
Figura 2. Gráfico de Pareto estandarizado YP/X <i>R. eutropha</i>	84
Figura 3. Gráfico de contorno Y P/X <i>R. eutropha</i>	85
Figura 4. Perfiles de predicción Y P/X <i>R. eutropha</i>	86
Figura 5. Gráfico de Pareto estandarizado para Y P/S en <i>R. eutropha</i>	89
Figura 6. Gráfico de contorno YP/S <i>R. eutropha</i>	90
Figura 7. Gráfico de perfiles de predicción YP/S <i>R. eutropha</i>	91
Figura 8. Gráfico de Pareto qP <i>R. eutropha</i>	93
Figura 9. Gráfico de contorno qP <i>R. eutropha</i>	94
Figura 10. Perfiles de predicción qP <i>R. eutropha</i>	95
Figura 11. Gráfico de Pareto estandarizado QP <i>R. eutropha</i>	97
Figura 12. Gráfico de contorno QP <i>R. eutropha</i>	98
Figura 13. Gráfico de perfiles de predicción QP, <i>R. eutropha</i>	99
Figura 14. <i>M. extorquens</i> en frotis tinción Negro Sudán.....	100
Figura 15. Gráfico de Pareto YP/S <i>M. extorquens</i>	102
Figura 16. Gráfico de contorno YP/S para <i>M. extorquens</i>	103
Figura 17. Gráfico de Pareto: YX/S <i>M. extorquens</i>	106
Figura 18. Gráfico de contorno YX/S <i>M. extorquens</i>	107
Figura 19. Perfiles de predicción para YX/S en <i>M. extorquens</i>	108
Figura 20. Gráfico de Pareto Y P/X <i>M. extorquens</i>	110
Figura 21. Gráfico de contorno YP/X <i>M. extorquens</i>	111
Figura 22. Perfiles de predicción Y P/X en <i>M. extorquens</i>	112
Figura 23. Gráfico de Pareto qP <i>M. extorquens</i>	115
Figura 24. Gráfico de contorno qP para <i>M. extorquens</i>	116
Figura 25. Perfiles de predicción de qP para <i>M. extorquens</i>	117

1. OBJETIVOS

Optimización del medio de cultivo, utilizando como fuente de carbono glicerol y metanol (modelado como subproducto del biodiesel) para producir PHAs a partir de los microorganismos seleccionados: *R. eutropha* DSM 545 y *M. extorquens* DSM 1340.

2. INTRODUCCIÓN

La producción microbiana de PHAs, es un proceso biológico sobre el cual actúan e intervienen diversos factores como ser: microorganismo productor, medio de cultivo, relación fuente de carbono y sustrato limitante, condiciones ambientales de cultivo, etc. Para el estudio de este tipo de sistema multivariado, la implementación de una estrategia estadística de diseño de experiencia facilita el trabajo experimental asociado y la interpretación de los resultados.

Las técnicas de diseño de experiencias, especifican el tipo y número de variables a testear en una serie de experiencias, mientras que la optimización permite predecir y modelar, en este caso, la composición de un medio de cultivo a partir de los datos experimentales disponibles, y de la aplicación de modelos matemáticos. (Teófilo y Ferreira 2006). En la Tabla 1, se resumen las etapas que incluye una estrategia de optimización (Rodrigues y lemma 2005).

Tabla 1. Estrategia de optimización

ETAPAS	OBJETIVOS	SITUACIÓN
Selección de variables	Identificar las variables más importantes	<ul style="list-style-type: none"> Muchos factores Poco conocimiento del proceso y de las condiciones deseadas u optimizadas
Optimización	Construir los modelos predictivos (Factoriales, Superficies de Respuesta)	<ul style="list-style-type: none"> Pocos factores Dentro de la región óptima
Validación de la condiciones	Análisis de la superficie de respuesta. Confirmar experimentalmente los resultados obtenidos.	Condiciones óptimas definidas

2.1. Selección de los factores a evaluar

En un sistema determinado por diversos factores o variables (se consideran términos equivalentes), la influencia de dichos factores sobre el sistema puede diferir según se realicen variaciones en un factor u en otro o varios factores a la vez. Es por ello, que en una primera etapa, se realiza una selección de factores, con el fin de determinar qué variables experimentales tienen influencias significativas sobre el sistema. A esto se agrega que pueden conocerse las interacciones entre variables significativas estadísticamente, y su influencia sobre el sistema. (Teófilo y Ferreira 2006) (Rodrigues y lemma 2005). Se debe determinar además las respuestas a través de las cuales se medirá la influencia de los diferentes factores

sobre el sistema. Luego de seleccionar las variables que posiblemente afecten el sistema y la respuesta a medir, es preciso validar la metodología experimental, evaluando los costos en que se incurrirá, tiempo requerido para la realización del experimento, etc. Las variables que no fueron seleccionadas tendrán que ser fijadas durante todo el experimento.

En una segunda etapa, se debe escoger el diseño experimental a utilizar para estudiar la influencia (o efecto) de los diferentes factores, así como su interacción sobre el sistema (Teófilo y Ferreira 2006).

2.2. Diseños Factoriales completos.

En un diseño de experiencia tipo factorial completo, se investiga la influencia de todas las variables experimentales de interés y los efectos de interacción (entre variables) en la respuesta o respuestas. Se entiende por efecto a la variación ocurrida en la respuesta, cuando el o los factores se mueven desde el nivel bajo (-) hacia el nivel alto (+), siendo los niveles (+) y (-) el mayor y menor valor, respectivamente, de la variable en estudio. Los efectos pueden ser clasificados como efectos principales y efectos de interacción o de segundo orden (efecto producto de la interacción de más de un factor). Si se investiga una combinación de K factores en dos niveles, un diseño factorial implicará la realización de 2^k experimentos. (Teófilo y Ferreira 2006) (Rodrigues y lemma 2005).

Dado un diseño factorial con n ensayos e y_i observaciones individuales, los efectos son dados por las siguientes ecuaciones:

$$Efecto_{medio} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \text{ ecuación (1)}$$

$$Efecto = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \text{ ecuación (2)}$$

La ecuación (1) describe el efecto para la media de todas las observaciones, mientras que la ecuación (2) describe el cálculo del efecto para las variables e interacciones usando la diferencia entre las medias de las observaciones en el nivel más alto ($y_{i(+)}$) y las medias de las observaciones en el nivel menor ($y_{i(-)}$). (Rodrigues y lemma 2005) (Teófilo y Ferreira 2006)

2.3. Diseños factoriales fraccionarios

El diseño factorial completo requiere de 2^k ensayos (más sus réplicas) para su ejecución y por lo tanto, su principal desventaja es el gran número de ensayos que deben ser realizados, especialmente al aumentar el número de variables en estudio. Si se considera que los efectos de alto orden (generalmente para $k > 4$, producto de la interacción de 4 o más factores), son casi siempre no significativos, la realización de ensayos para estimar dichos efectos puede ser irrelevante. A partir de un diseño factorial fraccionario, con un número menor de experimentos, es posible obtener información, de aquellos efectos más importantes y obtener las mismas conclusiones que si se hubiera realizado un diseño factorial completo.

Existen muchos y diferentes tipos de diseños factoriales fraccionarios de un diseño 2^{k-b} , siendo k el número de variables y b el tamaño de la fracción. El tamaño de la fracción influye en el posible número de efectos a ser estimados y consecuentemente, el número de experiencias a realizar (Rodrigues y Lemma 2005) (Teófilo y Ferreira 2006).

Normalmente, para la construcción del diseño factorial fraccionario deseado, se utiliza un diseño factorial completo. Como ejemplo, se presenta un diseño 2^{3-1} construido a partir de un diseño factorial completo con dos variables: V_1 y V_2 . La Tabla 3 muestra el diseño factorial completo con tres variables, requiere de 8 experiencias. Cuatro experimentos (Tabla 2) serán necesarios para implementar la planificación 2^{3-1} , y a partir de los resultados, se pueden obtener los principales efectos de las dos variables y el efecto interacción ($V_1 V_2$). Los signos de las columnas X_1 y X_2 corresponden a los signos de las primeras cuatro filas del diseño factorial completo. La columna de la matriz de coeficientes responsable de contraste interacción (X_3) se obtiene multiplicando los elementos de la columna V_1 variable con los elementos correspondientes de la variable V_2 . Las columnas V_1 , V_2 y V_1V_2 de la matriz de planificación de coeficientes de contraste factorial completo, definen la configuración de una planificación diseño factorial fraccional con tres variables usando solamente el cuatro ensayos (Tabla 3), donde $V_1 V_2$, y V_1V_2 se sustituye por las variables independientes x_1 , x_2 y x_3 . Como el número de experimentos es la mitad de un diseño completo, el planeamiento fraccional es un medio de un factorial 2^3 ($1/2 * 2^3 = 2^{-1}2^3 = 2^{3-1}$). (Tabla 2y Tabla 3).

Tabla 2. Planeamiento factorial fraccionario 2^{3-1} a partir de un factorial completo 2^2

$N^{\circ} \text{exp.}^{(*)}$	$x_1 (V_1)$	$x_2 (V_2)$	$x_3 (V_1V_2)$
5	-1	-1	1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
8	1	1	1

$N^{\circ} \text{exp}^*$: equivalente al diseño factorial completo

Tabla 3. Planeamiento factorial completo 2^3

$N^{\circ} \text{exp.}$	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

2.3.1. Efectos confundidos y resolución

Cuando se realizan diseños factoriales fraccionados hay pérdida de información. Los principales efectos se mezclan con los efectos de interacción y este efecto se magnifica al aumentar la fracción de la planificación.

En la Tabla 4, se presenta un diseño para una planificación 2^{5-1} . El objetivo es obtener todos los efectos principales y todos los posibles efectos de interacción mediante la realización de sólo 16 pruebas.

La matriz de planificación se hace de una planificación 2^4 . La variable (signo) de columna (5) se obtiene a partir de la multiplicación de los signos de las otras columnas (1,2,3,4). Así, $5(+)=1234[(-)x(-)x(-)x(-)]$ se denomina generador de una planificación fraccionaria. Se observa de la Tabla 4 que los coeficientes de contraste (signos positivo o negativo de los efectos principales y los efectos de interacción) de 123 tienen los mismos signos que 45. Esto demuestra que los efectos estimados por estas dos interacciones son las mismas, o pueden confundirse, y así llamado alias entre sí.

Tabla 4. Coeficientes de contraste para un diseño 2^{5-1}

Nº exp.	1	2	3	4	5	1234	123	45	2345
1	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	+	+	+
3	-	+	-	-	-	-	+	+	-
4	+	+	-	-	+	+	-	-	+
5	-	-	+	-	-	-	+	+	-
6	+	-	+	-	+	+	-	-	+
7	-	+	+	-	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	+	-	-	-	-	+
10	+	-	-	+	+	+	+	+	+
11	-	+	-	+	+	+	+	+	-
12	+	+	-	+	-	-	-	-	+
13	-	-	+	+	+	+	+	+	-
14	+	-	+	+	-	-	-	-	+
15	-	+	+	+	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La media fracción de la planificación en la Tabla 4 se obtuvo desde el generador ($5 = 1234$), sin embargo, para conocer la identidad un alias se lleva a cabo una definición de contrastes a partir de la relación dada por la ecuación 3.

$$I = 12345$$

Ecuación (3)

El alias se obtiene de multiplicar el contraste por cada uno de los efectos. Por ej., El alias de 1 se obtiene multiplicando 1 por 12345. Como regla general, no se toman en cuenta los términos que se repiten. Por lo tanto, $2345 = 112345$. Por los que efecto del factor 1, se confundirá con

el efecto de interacción de los factores 2, 3,4 y 5. Para efecto de interacción 12 el alias 1212345 es = 345. (Teófilo y Ferreira 2006)

La resolución de la planificación define el orden en el que se confunden efectos y se define por un número romano colocado después de la planificación o subíndice.

En general, la resolución es valor del número de factores que constituyen el término de menor longitud en las definiciones de contrastes:

Resolución III. Ningún efecto principal se confunde con otro efecto principal, pero los efectos principales se confunden con interacciones de dos factores y estas con otras interacciones de dos factores.

Resolución IV. Los efectos principales no se confunden entre factores principales ni con interacciones de dos factores. Pero las interacciones de dos factores se confunden entre ellas.

Resolución V. Los efectos principales no se confunden entre factores principales ni con interacciones de dos factores, las interacciones de dos factores no se confunden entre ellas, pero estas se confunden con las interacciones de tres factores (Teófilo y Ferreira 2006).

2.4. Diseños factoriales con punto central.

En los diseños factoriales con punto central se evalúa la respuesta del sistema frente a la variación de tres niveles: un nivel superior (+), un nivel inferior (-) y un valor central promedio (nivel cero).

En los diseños factoriales es necesaria la realización de réplicas de las experiencias realizadas para determinar el error y parámetros estadísticos. En muchos casos la realización de réplicas en cada punto experimental puede ser inconveniente por diversos motivos. Entre estas razones se encuentran: costos en los que se incurre al realizar más experimentos y el tiempo requerido para llevar adelante dichas experiencias (Teófilo y Ferreira 2006).

Por ello, para afrontar estas dificultades y obtener una buena estimación del error, habitualmente se introducen réplicas de experimentos sólo en el punto central. En este punto se emplean los valores medios de todas las variables tenidas en cuenta en el diseño. Estas variables son evaluadas en el *nivel cero*. (Teófilo y Ferreira 2006)

Esto permite validar la significancia de los efectos o de los coeficientes, tanto en experimentos preliminares como en metodologías de superficie de respuesta. (Rodrigues y lemma 2005) (Teófilo y Ferreira 2006)

Existen otras ventajas en la inclusión de experimentos en el punto central que se mencionan a continuación:

- Se minimiza el riesgo de perder la relación lineal entre los intervalos.
- Es posible estimar un modelo razonable y verificar si existe falta de ajuste.
- Permite optimizar mediante metodología de superficie de respuesta
- Se puede utilizar tanto para diseños factoriales completos como fraccionarios.

- Permite determinar efecto de curvatura (existencia de un mínimo o un máximo) dentro del rango experimental evaluado.

En la Figura 1 se presenta un diseño factorial 2^2 con punto central

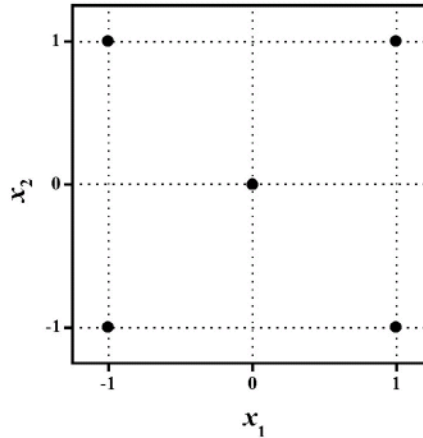


Figura 1. Diseño factorial 2^2 con punto central

2.5. Modelos matemáticos.

El sistema estudiado o dominio experimental puede ser representado por alguna función matemática en la que se encuentran reflejadas las variables experimentales. Normalmente esta función se puede aproximar a un polinomio y describir la relación existente entre los factores experimentales y la respuesta obtenida. (Rodriguez y lemma 2005) (Teófilo y Ferreira 2006)

El orden del polinomio está limitado por el tipo de diseño experimental utilizado. Por ejemplo los diseños factoriales de dos niveles tanto completos como fraccionarios solo pueden estimar efectos principales e interacciones (términos lineales). En cambio los diseños factoriales de tres niveles o más, pueden estimar además de lo anterior mencionado, el grado de curvatura en la respuesta. (Teófilo y Ferreira 2006)

Como modelos son utilizados los polinomios más simples, o sea aquellos que contienen los términos lineales. Considerando un ejemplo para tres variables x_1, x_2, x_3 sería la ecuación (4), que contiene sólo los efectos principales y la ecuación (5) que considera además, los efectos de interacción entre los factores:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + e \quad \text{ecuación(4)}$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + e \quad \text{ecuación(5)}$$

El coeficiente b_0 representa al valor de la media poblacional de todas las respuestas obtenidas, b_1 , b_2 , b_3 , son los coeficientes relacionados con las variables x_1 , x_2 , y x_3 respectivamente. El término e representa el error aleatorio asociado al modelo.

En el caso de la ecuación (5) b_{12} , b_{13} , b_{23} son los coeficientes para las interacciones x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 y b_{123} es el coeficiente para la interacción $x_1x_2x_3$. (Teófilo y Ferreira 2006)

A partir del diseño armado se puede construir la matriz de coeficientes de contraste X y junto con el vector de respuestas y obtenido experimentalmente, se podrán calcular los coeficientes del modelo, conocidos como *vector de regresión* (b).

El modelo descrito en las ecuaciones (4) y (5) puede ser representado matricialmente por la ecuación (6).

$$\hat{y} = Xb \text{ ecuación (6)}$$

Donde \hat{y} es el vector de las respuestas estimadas por el modelo, y b es el vector de regresión.

Una manera de determinar el vector de regresión b es través del método de mínimos cuadrados, que es definido por la ecuación (7) en que X^t indica la matriz traspuesta de X .

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y \text{ ecuación (7)}$$

Donde: $(X^t X)^{-1}$ es la matriz inversa del producto de la traspuesta de la matriz X con ella misma.

Para un diseño factorial completo la matriz $[1/(n^k)]X$ es cuadrada y ortogonal, donde n corresponde al número de ensayos. Esto ocurre porque las columnas no están normalizadas, por lo tanto $X^{-1} = 1/n X^t$. En este caso la ecuación (7) se resume en la (8).

$$b = (1/n) X^t y \text{ ecuación (8)}$$

La ecuación (7) es general y puede ser aplicada a cualquier tipo de diseño factorial, mientras que la ecuación (8) es específica para un diseño factorial completo, no siendo aplicable en otros diseños. (Rodrigues y Lemma 2005) (Teófilo y Ferreira 2006)

2.5.1. Estimación del error para los efectos a través de repeticiones.

Normalmente los resultados obtenidos en experimentos de diseños factoriales completos o fraccionarios con repeticiones consisten en una pequeña muestra de un hipotético conjunto mayor representado por una población. De estos datos se puede obtener una media muestral, una varianza muestral y un desvío estándar muestral, como se muestra a continuación:

$$\hat{y} = \frac{\sum_{i=1}^r y_i}{r} \text{ ecuación (9)}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^r (y_i - \bar{y})^2}{r-1} \text{ ecuación (10)}$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^r (y_i - \bar{y})^2}{r-1}} \text{ ecuación (11)}$$

Donde r es el número de réplicas, el número de ensayos realizados en un mismo punto experimental (nivel), y_i son los valores de cada observación individual, \bar{y} es el valor medio, s^2 es la varianza y s la desviación estándar (Teófilo y Ferreira 2006). De esta manera cuando se realizan repeticiones genuinas la variación entre las observaciones puede ser utilizada para estimar el desvío estándar de una simple observación, y consecuentemente el desvío de los efectos.

Cuando en un diseño se realizan pocas repeticiones en cada punto experimental, ej $2 < r < 10$, habrá pocos grados de libertad para el cálculo de la varianza. Una manera de obtener un número mayor de grados de libertad es realizando una estimación en conjunto de las varianzas conforme a la ecuación (12). (Teófilo y Ferreira 2006)

$$s_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_i - 1) S_i^2}{\sum_{i=1}^n (r_i - 1)} \text{ ecuación (12)}$$

$$v = \sum_{i=1}^n (r_i - 1) \text{ ecuación (13)}$$

S_c^2 refleja a la varianza conjunta de cada observación individual y_i siendo el error estándar igual a la raíz cuadrada del mismo. (Teófilo y Ferreira 2006)

La ecuación (13) representa el número de grados de libertad de la estimación conjunta, y es designada por v .

2.5.2. Estimación de los errores para los efectos y coeficientes a partir de repeticiones en el punto central.

A partir de las repeticiones realizadas en el punto central, es posible obtener la media y la varianza de las réplicas de acuerdo con las ecuaciones (9) y (10) respectivamente. (Teófilo y Ferreira 2006)

2.5.3. Identificación de los efectos y coeficientes significativos.

Existen diferentes métodos para validar que efectos y coeficientes son significativos en el estudio; entre los más usados se destacan el Análisis de Varianza (ANOVA) o Gráfico de Probabilidad Normal (para distribución normal), y la comparación de efectos con una medida independiente de la variabilidad. (Teófilo y Ferreira 2006)

En este trabajo las validaciones de significancia fueron realizadas utilizando el **test t- Student** (para distribución de Student). La comparación se realiza a través del valor **p**.(ANOVA)

En este se considera como Hipótesis Nula (H_0) que el valor del efecto se confunde con su error. A partir de esto se llega a la siguiente regla de decisión:

Rechazo de la Hipótesis Nula con un 95% de nivel de confianza, cuando el valor de t_{calc} . Se sitúa fuera del intervalo: $\pm t_{\alpha}$ ($|t_{calc}| \geq t_{\alpha}$). Esto equivale a decir que el valor del estadístico muestral observado es significativo en el nivel definido.

Aceptación de la Hipótesis Nula en el caso contrario.

Otra manera de llegar a las mismas conclusiones es comparar el valor **p** del test estadístico muestral con el nivel de significancia α . El valor **p** del test estadístico muestral es el menor nivel de significancia para que se rechace H_0 . En este sentido se compara el valor **p** con α y si el valor $p \leq \alpha$ se rechaza H_0 , en el caso contrario se acepta.

Específicamente el valor de **p** representa la probabilidad de validar el error en el resultado observado, y es representativo de la población. (Teófilo y Ferreira 2006)

2.6. Metodología de la Superficie de Respuesta.

Después de la realización de los experimentos preliminares se seleccionan los factores significativos y se ejecuta una metodología de análisis de superficies de respuestas para la optimización del experimento. En este sentido optimizar significa encontrar los valores de las variables que van a producir la mejor respuesta deseada, esto es encontrar una región óptima en la superficie definida por los factores. (Teófilo y Ferreira 2006).

La Metodología de Superficies de Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta. (Fernandez Melcon y Piñeiro Barcia 2004)

Si el valor real esperado, η , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, \dots, X_k , esto significa que existe alguna función de X_1, X_2, \dots, X_k (que se supone continua en $X_i, \forall i=1\dots k$ proporciona el correspondiente valor de η para alguna combinación dada de niveles: $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como: $Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$, donde ε es el error

observado en la respuesta. La relación $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ existente entre η y los niveles de los k factores puede representarse a través de una hipersuperficie: la superficie de respuesta. (Fernandez Melcon y Piñeiro Barcia 2004)

Una técnica utilizada para ayudar a visualizar la forma que puede tener una superficie de respuesta tridimensional, consiste en representar la gráfica de contornos de la superficie, en la que se trazan las denominadas líneas de contorno, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano X_1X_2 (plano cuyos ejes coordenados vienen dados por los niveles X_1 y X_2 de los factores). Geométricamente, cada línea de contorno es una proyección sobre el plano X_1X_2 de una sección de la superficie de respuesta al intersectar con un plano paralelo al X_1X_2 . La gráfica de contornos resulta útil para estudiar los niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta. (Fernandez Melcon y Piñeiro Barcia 2004)

La forma de la función f que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es, en general, desconocida, por lo que el primer objetivo de la RSM consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la función f . Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los k factores X_1, X_2, \dots, X_k y se selecciona un conjunto de tratamientos sobre los que realizar las observaciones experimentales, que se utilizarán tanto para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo propuesto (por ejemplo, a través del método de mínimos cuadrados) como para obtener una estimación de la variación del error experimental. Se realizan, entonces, contrastes sobre las estimaciones de los parámetros y sobre el ajuste del modelo y si el modelo se considera adecuado estadísticamente, puede utilizarse como función de aproximación. En tal caso, el estudio de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada, estimada o esperada, pues su análisis será aproximadamente equivalente al del sistema real. (Fernandez Melcon y Piñeiro Barcia 2004)

Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de estimación son los de órdenes uno y dos, que proporcionan, respectivamente los siguientes modelos:

$$\text{modelo de primer orden} \equiv Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon$$

$$\text{modelo de segundo orden} \equiv Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j \\ i < j}} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

En la construcción de modelos de superficies de respuesta, es muy común la codificación de los valores reales de los niveles de los factores, pues las distancias medidas sobre los ejes de las variables codificadas en el espacio k -dimensional se convierten en estándar, lo que facilita considerablemente los cálculos que deben llevarse a cabo para obtener el modelo de aproximación e incrementa el ajuste en la estimación de los coeficientes. (Fernandez Melcon y Piñeiro Barcia 2004)

Una fórmula que suele resultar útil para codificar los valores de los factores es la siguiente:

$$x_i = \frac{X_i - \left(\frac{X_{iNInf} + X_{iNSup}}{2} \right)}{X_{iNSup} - X_{iNInf}} = \frac{X_i - (\tilde{X}_i)}{X_{iNSup} - X_{iNInf}} \quad i = 1, 2, \dots, k$$

\tilde{X} es la media entre los valores más alto y más bajo del nivel $i = 1, \dots, n$. $X_{iNInf} \equiv$ valor del nivel más bajo del factor i y $X_{iNSup} \equiv$ valor del nivel más alto del factor i y ,

El primer intento de ajuste se hace, generalmente, aproximando a través de un modelo de primer orden, generalmente a partir de diseños de experiencias de tipo factorial de dos niveles con interacción de factores.

Cuando existe curvatura en la superficie de respuesta, el modelo de primer orden no es una aproximación adecuada y es necesario utilizar un modelo que ajuste mejor. Se emplea entonces un modelo de segundo orden como ser, diseños factoriales con punto central (3 niveles de variables), diseño central compuesto (5 niveles de variables) etc.

Luego de obtenido el modelo se determinan los niveles codificados de los factores que maximizan la expresión matemática obtenida. (Fernandez Melcon y Piñeiro Barcia 2004)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El componente clave para la síntesis microbiana de PHAs es la relación entre la fuente de carbono y el nutriente limitante en el medio de cultivo. Se ha reportado en diversas publicaciones que los nutrientes limitantes de mayor influencia en la síntesis de PHAs son la fuente de nitrógeno y de fósforo. De esta forma, la selección de los factores a optimizar se realizó en base al conocimiento del sistema reportado por otros investigadores (Naranjo Vasco 2010) (Volova 2004). Los componentes del medio de cultivo evaluados fueron: fuente de carbono, fuente de nitrógeno y fuente de fósforo. Para la optimización del medio de cultivo se utilizó un diseño experimental factorial fraccionario con punto central 2^{4-1}_{IV} , para cada una de la cepas siendo los factores del medio de cultivo evaluados: Metanol/Glicerol (%v/v) (manteniendo la relación del subproducto modelo), $(NH_4)_2SO_4$ (g/L), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (g/L) y KH_2PO_4 (g/L), correspondientes a la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y fuentes de fósforo del microorganismo. Los factores a optimizar así como las fuentes de nitrógeno y fósforo se seleccionaron a partir la revisión bibliográfica. (Volova 2004) (Naranjo Vasco 2010) (Mokhtari-Hosseini, y otros 2009) (Braunegg, Lefebvre y Genzer 1998) (Lee 1996).

En la Tabla 5 se muestra el diseño de experiencia utilizado en ambas cepas:

Tabla 5. Diseño factorial fraccionario 2^{4-1} con punto central

Ensayos	Factor X1	Factor X2	Factor X3	Factor X4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
pc1	0	0	0	0
pc2	0	0	0	0
pc3	0	0	0	0

3.1. *R. eutropha* DSM 545

Se utiliza el stock de trabajo generado, descrito en el Capítulo 4. La cepa fue mantenida en tubos inclinados de agar nutriente con glicerol (1 %) a 4 °C hasta ser utilizados.

3.2. *M. extorquens* DSM 1340

Se utiliza el stock de trabajo generado, descrito en el Capítulo 4. La cepa fue mantenida en tubos inclinados de agar nutriente con metanol (1 %) a 4 °C hasta ser utilizados.

3.3. Optimización del medio de cultivo de *R. eutropha* DSM 545

3.3.1. Medio de cultivo base

Se utilizó un medio base, optimizado para *R. eutropha* DSM 545, descrito por (Martinez, y otros 2009) constituido por 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H_2BO_4 , 0.2 g/L $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03 g/L $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 g/L $NiCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.01 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.03 g/L $MnCl_2 \cdot 6H_2O$. La concentración de la fuente de nitrógeno, $(NH_4)_2SO_4$, fuentes de fósforo, KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , y glicerol crudo modelado para cada experiencia se describen en el diseño de la experiencia (3.3.2). El pH se ajustó a 7.0 con 5.0 N NaOH ó 5.0 N HCl. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C separando las fuentes de carbono, fósforo, nitrógeno y otras sales. El metanol fue esterilizado mediante filtración.

3.3.2. Diseño de experiencia: Factores y niveles ensayados

Se establecieron 3 niveles para cada factor (-1), (0), (1), siendo los valores asignados basados en la bibliografía consultada (Marangoni, Furigo y Aragao 2002) (Martinez, y otros 2009) (Volova 2004) (Cavalheiro, y otros 2009) (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles de factores para *R. eutropha* DSM 545

Factor	Nivel		
	-1	0	1
X1: Metanol/Glicerol (g/L)	3,96/8,38	10.88/23.10	17.80/37.83
X2: (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0,50	1,25	2,00
X3: Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (g/L)	4,00	7,00	10,00
X4: KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,20	1,10	2,00

3.3.3. Condiciones de cultivo

El inóculo se preparó por duplicado en Erlenmayer de 1 L conteniendo 200 mL del medio de cultivo de cada experiencia, en shaker orbital durante 12 h a 250 rpm y 35°C. Como semilla inicial se utilizó el contenido de 2 tubos inclinados (ver punto 3.1), suspendidos en suero fisiológico estéril.

Los ensayos se realizaron en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo y 0.5 g/L de inóculo, incubados en shaker orbital a 35°C y 250 rpm durante 48 horas.

Las condiciones de incubación (Temperatura, agitación y tiempo de incubación) fueron seleccionadas en base a la bibliografía consultada (Cavalheiro, y otros 2009) (Martinez, y otros 2009) (Marangoni, Furigo y Aragao 2002) .

3.4. Optimización del medio de cultivo de *M. extorquens* DSM 545

3.4.1. Medio de cultivo base

Se utilizó un medio base descrito según (Mokhtari-Hosseini, y otros 2009): 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: ZnSO₄.7H₂O 1.5 mg/L, Na₂MoO₄.2H₂O 0.04 mg/L, CuSO₄.5H₂O 0.04 mg/L, CaCl₂. 6H₂O 0.6 mg/L, H₃BO₃ 0.2 mg/L, MgSO₄.7H₂O 5 mg/L, FeSO₄.7H₂O 20 mg/L. La concentración de la fuente de nitrógeno, (NH₄)₂SO₄, fuentes de fósforo, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄, y glicerol crudo modelado para cada experiencia se describen en el diseño de la experiencia 3.4.2. El pH se ajustó a 7.0 con 5.0 N NaOH ó 5.0 N HCl. El medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C separando las fuentes de carbono, fósforo, nitrógeno y otras sales. El metanol fue esterilizado mediante filtración.

3.4.2. Diseño de experiencia: Factores y niveles ensayados

Se establecieron 3 niveles para cada factor (-1), (0), (1), siendo los valores asignados basados en la bibliografía consultada (Mokhtari-Hosseini, y otros 2009). (Tabla 7)

Tabla 7. Niveles de factores para *M. extorquens* DSM 1340

Factor	Nivel		
	-1	0	1
X1 Metanol/Glicerol (g/L)	0,79/1,76	7,75/10,60	8,70/19,42
X2 (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0,50	1,25	2,00
X3 KH ₂ PO ₄ (g/L)	3,00	5,00	7,00
X4 Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (g/L)	0,20	1,10	2,00

3.4.3. Condiciones de cultivo

El inóculo se preparó por duplicado en Erlenmayer de 1 L conteniendo 200 mL del medio de cultivo correspondiente a cada experiencia, en shaker orbital durante 12 h a 250 rpm y 30°C. Como semilla inicial se utilizó el contenido de 2 slants (ver punto 3.1), suspendidos en suero fisiológico estéril.

Los ensayos se realizaron en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo y 0.5 g/L de inóculo, incubados en shaker orbital a 30°C y 250 rpm durante 92 horas.

Las condiciones de incubación (Temperatura, agitación y tiempo de incubación) fueron seleccionadas en base a la bibliografía consultada (Mokhtari-Hosseini, y otros 2009).

3.5. Métodos analíticos

Se determinó: biomasa (peso seco y turbidimetría), glicerol y metanol consumidos (HPLC) y PHAs producidos (kit enzimático) (Ver Anexo técnicas analíticas). Para verificar la pureza del cultivo se realizaron frotis con tinción de Gram y para verificar la presencia de inclusiones de PHAs con tinción de Negro Sudán.

3.6. Evaluación de respuestas

Se calcularon:

Y X/S: Rendimiento de biomasa basado en consumo de sustratos (g/g)

Y P/S: Rendimiento de producto basado en consumo de sustratos (g/g)

Y P/X: Rendimiento de producto basado en biomasa generada (g/g)

QP: Productividad volumétrica de producto (g/Lh)

qP: Productividad específica de producto (g/gh)

3.7. Análisis estadístico

Para la realización de los cálculos del diseño experimental y estadísticos, se utilizaron planillas electrónicas elaboradas por UNICAMP y el software Statistica®.

4. RESULTADOS

4.1. Optimización del medio de cultivo de *R. eutropha*

4.1.1. Rendimientos y productividades

Se resumen en la Tabla 8 los resultados obtenidos para las experiencias del diseño, luego de 48 horas de incubación. No se registró consumo de metanol a lo largo del tiempo de incubación.

Tabla 8. Resultados *R. eutropha*


Matraz	Biomasa (g/L)	Consumo glicerol (g/L)	PHA (g/L)	YP/X (g/g)	QP (g/Lh)	Yx/s (g/g)	qP (g/gh)	YP/S (g/g)
1	1,24	2,26	0,68	0,55	0,014	0,55	0,011	0,30
2	1,35	3,99	0,49	0,36	0,010	0,34	0,008	0,12
3	3,27	6,43	0,60	0,18	0,013	0,51	0,004	0,09
4	1,95	4,27	0,40	0,21	0,008	0,46	0,004	0,09
5	1,85	2,55	0,50	0,27	0,010	0,73	0,006	0,20
6	1,09	4,66	0,36	0,33	0,007	0,23	0,007	0,08
7	2,35	4,91	0,37	0,16	0,008	0,48	0,003	0,08
8	4,07	8,24	0,52	0,13	0,011	0,49	0,003	0,06
9	2,85	9,59	0,68	0,24	0,014	0,30	0,005	0,07
10	3,15	6,85	0,69	0,22	0,014	0,46	0,005	0,10
11	3,67	9,38	0,70	0,19	0,015	0,39	0,004	0,07

4.1.2. Evaluación del rendimiento de producto en función de biomasa

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico. Se detallan, el valor y signo de los efectos, error, estadístico t-Student, p, y en la última columna las equivalencias de los efectos que se confunden. A los efectos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se les asigna la sigla **SG**.

C1, C2, C3 y C4 representan los efectos principales de X1, X2, X3 y X4, respectivamente. C12, representa el efecto de la interacción de los factores X1 y X2, C13, el efecto entre los factores X1 y X3 y C14, el efecto entre los factores X1 y X4.

Tabla 9. Análisis estadístico Y P/X *R.eutropha*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	YP/X	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	-1	0,55	SG <i>Media</i>	0,257 ± 0,01	34,46	8E-04	1 234
2	1	-1	-1	1	0,36	<i>C1</i>	-0,034 ± 0,02	1,963	0,189	2 134
3	-1	1	-1	1	0,18	SG <i>C2</i>	-0,208 ± 0,02	11,87	0,007	3 124
4	1	1	-1	-1	0,21	SG <i>C3</i>	-0,105 ± 0,02	6,0086	0,027	4 123
5	-1	-1	1	1	0,27	<i>C4</i>	-0,075 ± 0,02	4,2569	0,051	12 34
6	1	-1	1	-1	0,33	<i>C12</i>	0,032 ± 0,02	1,8261	0,209	13 24
7	-1	1	1	-1	0,16	<i>C13</i>	0,048 ± 0,02	2,7642	0,11	14 23
8	1	1	1	1	0,13	<i>C14</i>	0,052 ± 0,02	2,993	0,096	
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,24	Nivel de significancia α: 0,050 				
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,22					
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,19					
Media - <i>pc</i>					0,216					
Varianza - <i>pc</i>					6E-04					
Desviación estandar - <i>pc</i>					0,025					



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta YP/X)

- C2, representando el factor X2 (NH₄)₂SO₄
- C3, representando el factor X3 (KH₂PO₄)

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto) el efecto de mayor importancia es C2 ((NH₄)₂SO₄). Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado

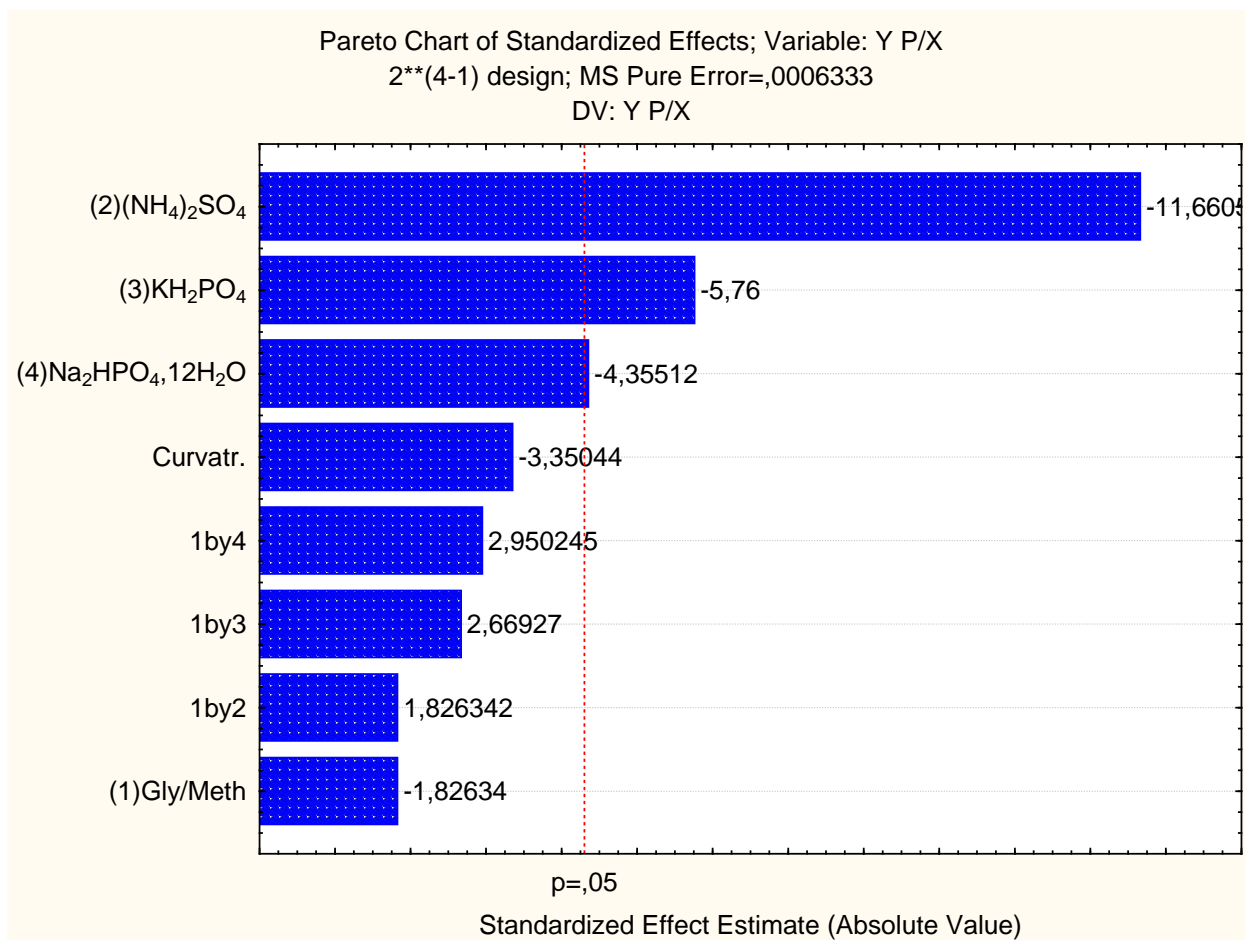


Figura 2. Gráfico de Pareto estandarizado YP/X *R. eutropha*

El ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher se adjunta en el ANEXO Capítulo 5. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente y se observa linealidad entre los datos observados y los predichos por el modelo del diseño (ANEXO Capítulo 5). Para culminar con la validación se realizó el histograma de los residuos con distribución de tipo normal (ANEXO Capítulo 5). En la Figura 3 se presenta el análisis del gráfico de contorno para la respuesta evaluada. Los factores se grafican con sus valores codificados (-1 a 1) tomados de a dos factores y tomando el resto de los factores en el nivel cero y constantes.

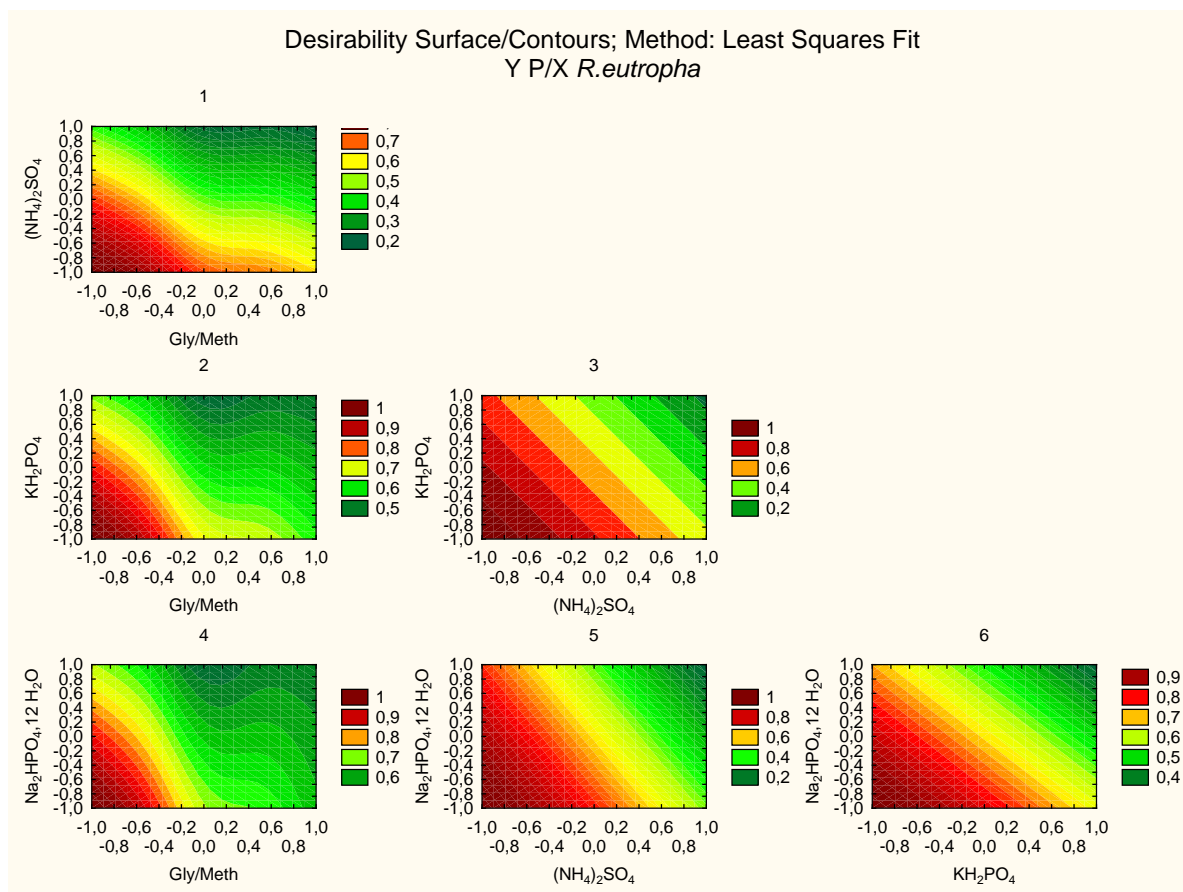


Figura 3. Gráfico de contorno Y P/X *R.eutropha*

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a niveles de valores de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Glicerol/Metanol inferiores.
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que los niveles de Glicerol/Metanol y KH_2PO_4 son inferiores.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se obtiene mayor respuesta a bajos valores de niveles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y (KH_2PO_4) .
- **Gráfico 4:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs Glicerol/Metanol, La respuesta se hace mayor al disminuir el nivel de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y de Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 5:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la respuesta aumenta a niveles bajos de $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- **Gráfico 6:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs (KH_2PO_4) , Se observa mayor nivel de respuesta a bajos niveles de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 .

A través de los perfiles de predicción se determina el óptimo nivel para cada uno de los factores, de forma de maximizar la respuesta.

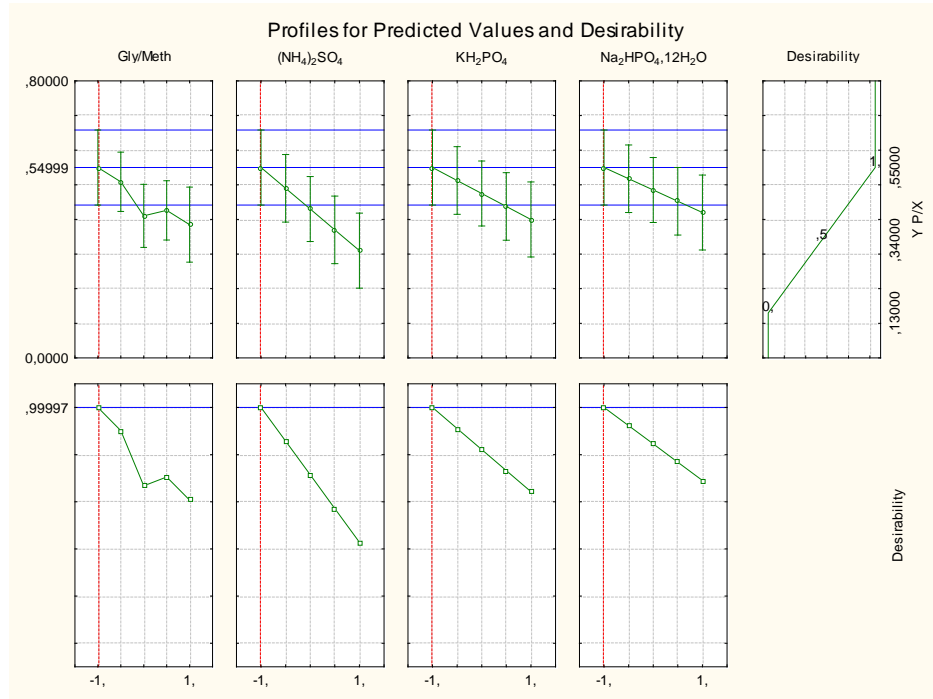


Figura 4. Perfiles de predicción Y P/X *R. eutropha*

Se presentan en la Tabla 10, los niveles codificados de los factores (X1, X2, X3 y X4) que maximizan la respuesta (valor deseado codificado), junto con el valor predicho (YP/X g/g) por el modelo y el intervalo de confianza.

Tabla 10. Niveles óptimos Y P/X *R. eutropha*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario ralstonia) Predicted responses at the current level of each factor in the model								
	X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
	-,9999	-1,	-1,	-,9999	0,549987	0,999969	0,441712	0,658261

4.1.3. Análisis del rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido

En la Tabla 11 se presenta el análisis estadístico realizado.

Tabla 11. Análisis YX/S en *R.eutropha*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y X/S	Efectos				Confundidos		
						Efectos	Error	t (2)	p			
1	-1	-1	-1	-1	0,55	SG <i>Media</i>	0,449	± 0,02	18,229	0,003	1	234
2	1	-1	-1	1	0,34	<i>C1</i>	-0,184	± 0,06	3,1813	0,086	2	134
3	-1	1	-1	1	0,51	<i>C2</i>	0,023	± 0,06	0,4021	0,726	3	124
4	1	1	-1	-1	0,46	<i>C3</i>	0,021	± 0,06	0,3586	0,754	4	123
5	-1	-1	1	1	0,73	<i>C4</i>	0,088	± 0,06	1,5296	0,266	12	34
6	1	-1	1	-1	0,23	<i>C12</i>	0,166	± 0,06	2,8724	0,103	13	24
7	-1	1	1	-1	0,48	<i>C13</i>	-0,055	± 0,06	0,9491	0,443	14	23
8	1	1	1	1	0,49	<i>C14</i>	-0,017	± 0,06	0,2994	0,793		
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,30	Nivel de significancia α: 0,050						
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,46							
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,39							
Média - pc					0,383							
Varianza - pc					0,007							
Desviación std - pc					0,082							




Solo la media es estadísticamente significativa, por lo que el modelo planteado, no representa los resultados obtenidos experimentalmente. (No se obtiene relación entre los factores evaluados y la respuesta).

4.1.4. Análisis del rendimiento de producto basado en sustrato consumido

El análisis estadístico para la respuesta Y P/S se presenta a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis estadístico Y P/S R. *eutropha*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y P/S	Efectos				p	Confundidos		
								Error	t (2)				
1	-1	-1	-1	-1	0,30	SG	Media	0,115	± 0	23,627	0,002	1	234
2	1	-1	-1	1	0,12	SG	C1	-0,077	± 0,01	6,7196	0,021	2	134
3	-1	1	-1	1	0,09	SG	C2	-0,092	± 0,01	8,0576	0,015	3	124
4	1	1	-1	-1	0,09	SG	C3	-0,05	± 0,01	4,3713	0,049	4	123
5	-1	-1	1	1	0,20		C4	-0,018	± 0,01	1,5594	0,259	12	34
6	1	-1	1	-1	0,08	SG	C12	0,072	± 0,01	6,2737	0,024	13	24
7	-1	1	1	-1	0,08		C13	0,011	± 0,01	0,987	0,428	14	23
8	1	1	1	1	0,06		C14	0,025	± 0,01	2,2008	0,159		
pc1	0	0	0	0	0,07	Nivel de significancia α: 0,050 							
pc2	0	0	0	0	0,10								
pc3	0	0	0	0	0,07								
					Media - pc	0,082							
					Varianza - pc	3E-04							
					Desviación std - pc	0,016							



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos positivos (un aumento en el factor aumenta la respuesta YP/S)

- C12, representando el efecto de interacción entre el factor X1 (Glicerol/Metanol) y X2((NH₄)₂SO₄).

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta YP/S)

- C1, representando el factor X1 Glicerol/Metanol
- C2, representando el factor X2 (NH₄)₂SO₄
- C3, representando el factor X3 (KH₂PO₄)

Siendo el efecto más significativo en valor absoluto la fuente de nitrógeno. Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado

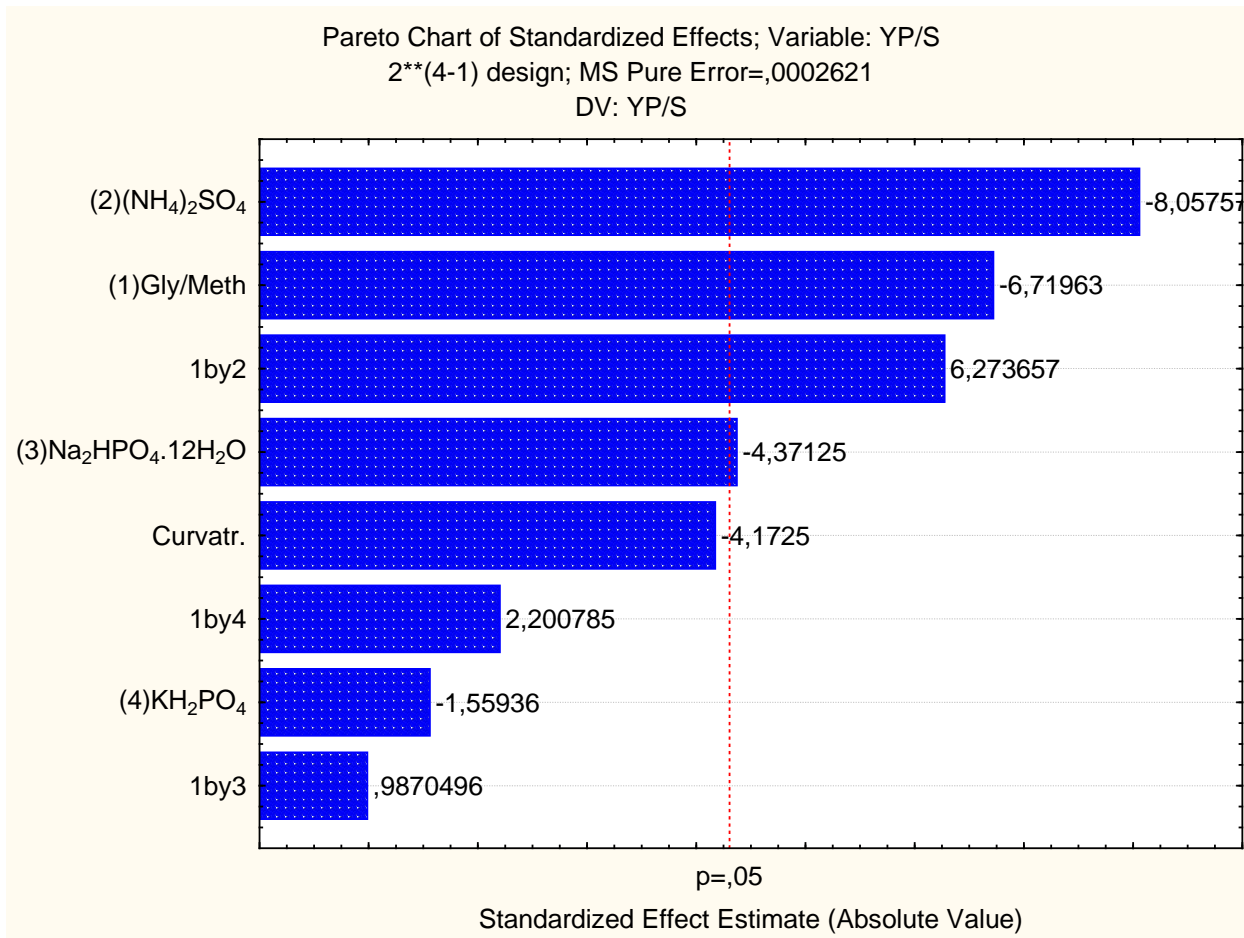


Figura 5. Gráfico de Pareto estandarizado para Y P/S en *R. eutropha*

La validación de los coeficientes hallados se realiza mediante análisis de ANOVA, linealidad de datos observados en función de los datos predichos por el modelo y la distribución de los residuos (ANEXO Capítulo 5). Se validan todos los coeficientes de los efectos encontrados en el análisis anterior ($p < 0.05$). El efecto de curvatura no es significativo estadísticamente ($p > 0.05$). En ANEXO Capítulo 5 se valida la linealidad entre los datos experimentales y los predichos por el modelo, a su vez el histograma de los residuos, presenta una distribución normal, validando el modelo.

En la Figura 6 se presenta el análisis del gráfico de contorno para la respuesta evaluada. Los factores se grafican en niveles codificados (-1 a +1), tomados de a dos factores y manteniendo el resto de los factores constantes en el nivel codificado cero.

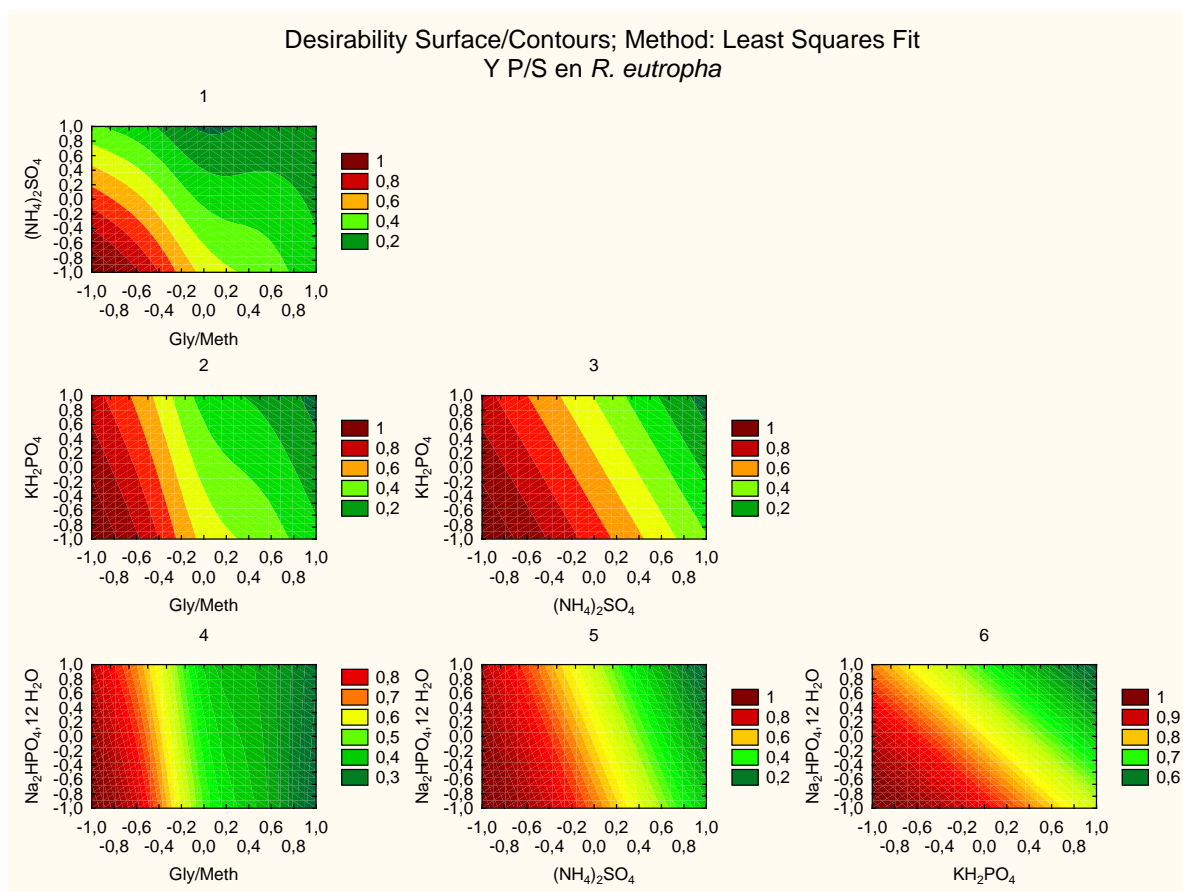


Figura 6. Gráfico de contorno YP/S *R.eutropha*.

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a valores bajos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol y KH_2PO_4 es menor.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Se obtiene mayor respuesta a bajos niveles de ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y (KH_2PO_4).
- **Gráfico 4:** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) vs Glicerol/Metanol, La respuesta es independiente del nivel de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a partir del nivel cero de Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 5:** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la respuesta aumenta a niveles bajos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y es independiente del nivel de $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ a partir del nivel cero de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- **Gráfico 6:** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) vs (KH_2PO_4), Se observa mayor nivel de respuesta a bajos niveles de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y de KH_2PO_4 .

Para determinar los niveles codificados de los factores evaluados, se utiliza un gráfico de predicción. Los resultados se presentan a continuación.

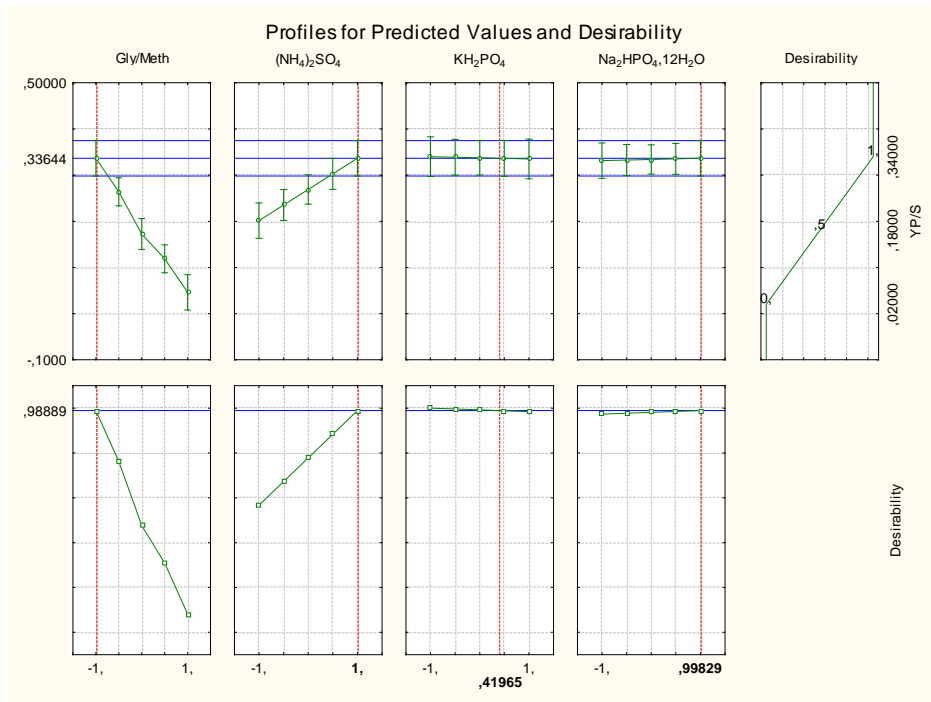


Figura 7. Gráfico de perfiles de predicción YP/S *R. eutropha*

En la Tabla 13 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta Y P/S (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.

Tabla 13. Niveles de factores optimizados Y P/S *R. eutropha*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario ralstonia) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
-1,	1,	,41965	,99829	0,336445	0,988890	0,298126	0,374764

4.1.5. Análisis de la productividad específica de producto

Se realiza el análisis estadístico de la respuesta. Los resultados se adjuntan en la Tabla 14

Tabla 14. Análisis estadístico qP *R.eutropha*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	qP	Efectos	Erros	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	-1	0,011	SG <i>Media</i>	0,005 ± 0	34,46	8E-04	1 234
2	1	-1	-1	1	0,008	<i>C1</i>	-7E-04 ± 0	1,963	0,189	2 134
3	-1	1	-1	1	0,004	SG <i>C2</i>	-0,004 ± 0	11,87	0,007	3 124
4	1	1	-1	-1	0,004	SG <i>C3</i>	-0,002 ± 0	6,0086	0,027	4 123
5	-1	-1	1	1	0,006	<i>C4</i>	-0,002 ± 0	4,2569	0,051	12 34
6	1	-1	1	-1	0,007	<i>C12</i>	7E-04 ± 0	1,8261	0,209	13 24
7	-1	1	1	-1	0,003	<i>C13</i>	0,001 ± 0	2,7642	0,11	14 23
8	1	1	1	1	0,003	<i>C14</i>	0,001 ± 0	2,993	0,096	
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,005	Nivel de significancia α: 0,050				
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,005					
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,004					
Média - pc					0,004					
Varianza - pc					3E-07					
Desviación std - pc					5E-04					



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta qP).

- C2, representando el factor X2 (NH₄)₂SO₄
- C3, representando el factor X3 (KH₂PO₄)

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto) el efecto de mayor importancia es C2 ((NH₄)₂SO₄). Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado.

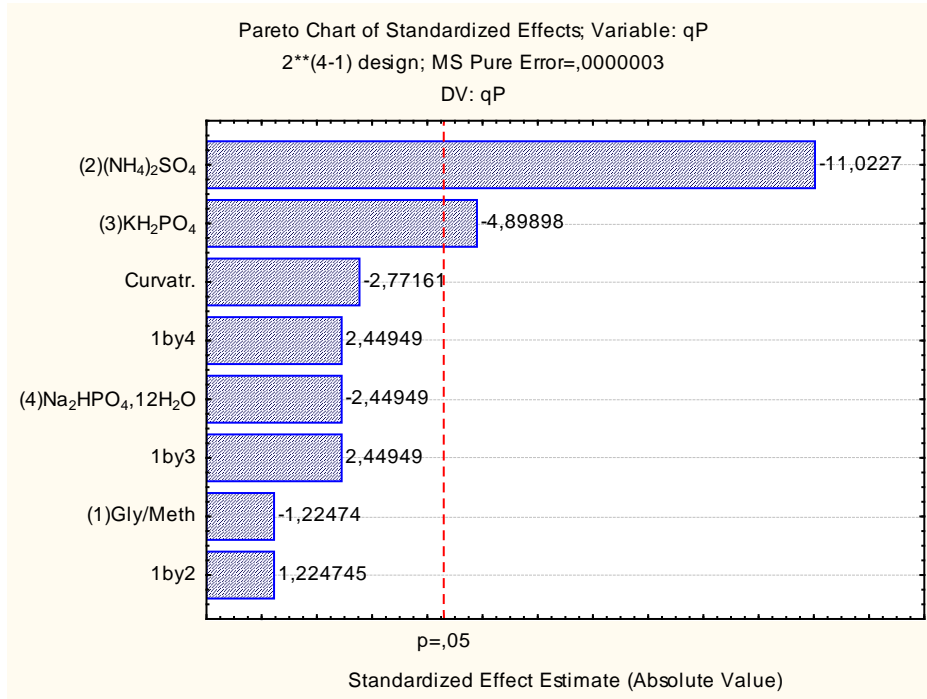


Figura 8. Gráfico de Pareto qP *R.eutropha*

El ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher se adjunta en el ANEXO Capítulo 5. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente. Se verifica la linealidad entre los valores observados y los predichos por el modelo, (ANEXO Capítulo 5). El histograma de residuos verifica una distribución de tipo normal en los mismos (ANEXO Capítulo 5).

En la Figura 9 se presenta el análisis del gráfico de contorno para la respuesta evaluada. Los factores se grafican en niveles codificados (-1 a +1), tomados de a dos factores y manteniendo el resto de los factores constantes en el nivel codificado cero.

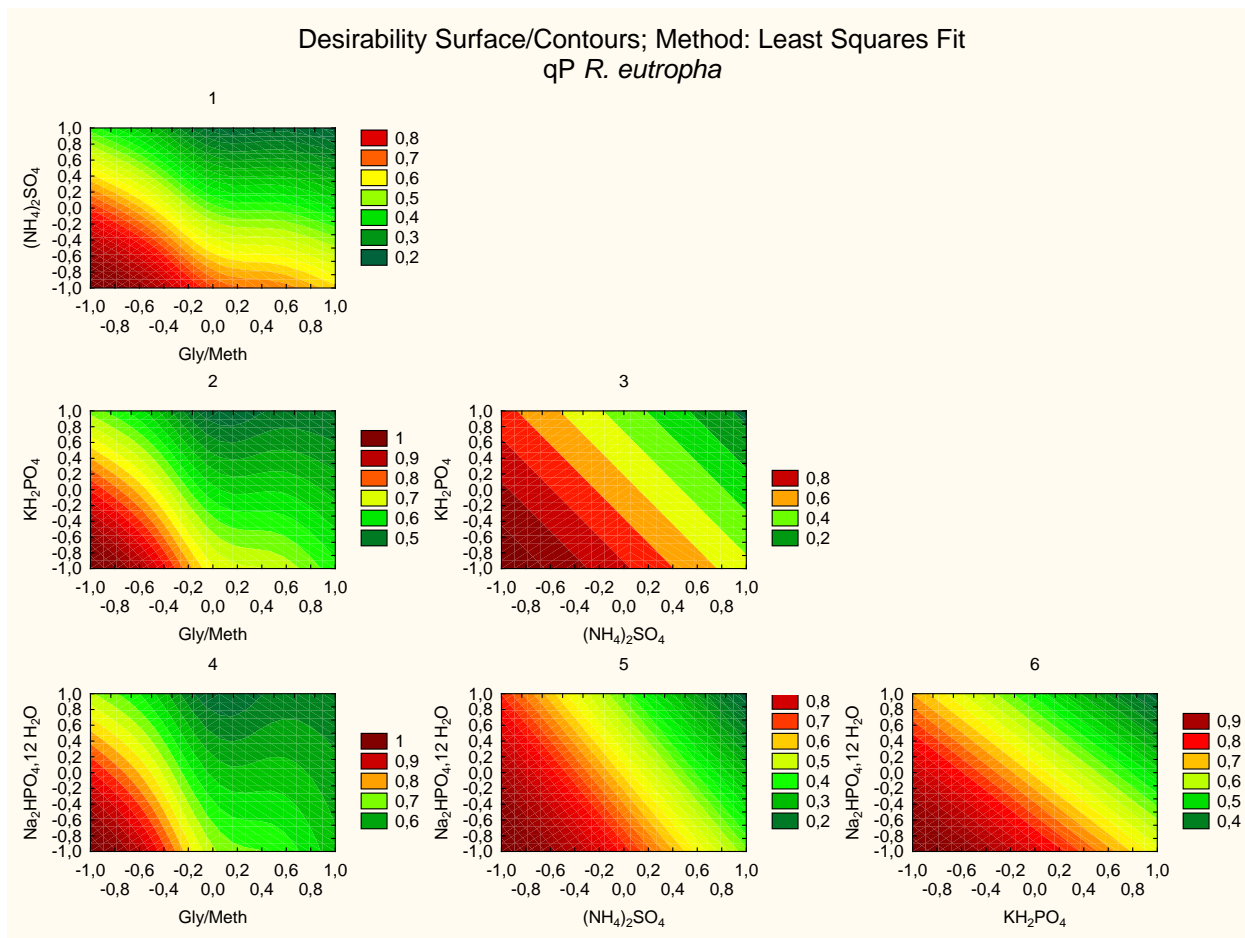


Figura 9. Gráfico de contorno qP *R.eutropha*

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a valores de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Glicerol/Metanol bajos.
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que los niveles de Glicerol/Metanol y KH_2PO_4 son menores.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se obtiene mayor respuesta a bajos niveles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y (KH_2PO_4)
- **Gráfico 4:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs Glicerol/Metanol, La respuesta se hace mayor al disminuir los niveles de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 5:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la respuesta aumenta a niveles bajos de $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- **Gráfico 6:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs (KH_2PO_4) , Se observa mayor nivel de respuesta a menores niveles de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y de KH_2PO_4 .

Finalmente, a través de los perfiles de predicción se determinan los valores de nivel de factores que maximizan la respuesta.

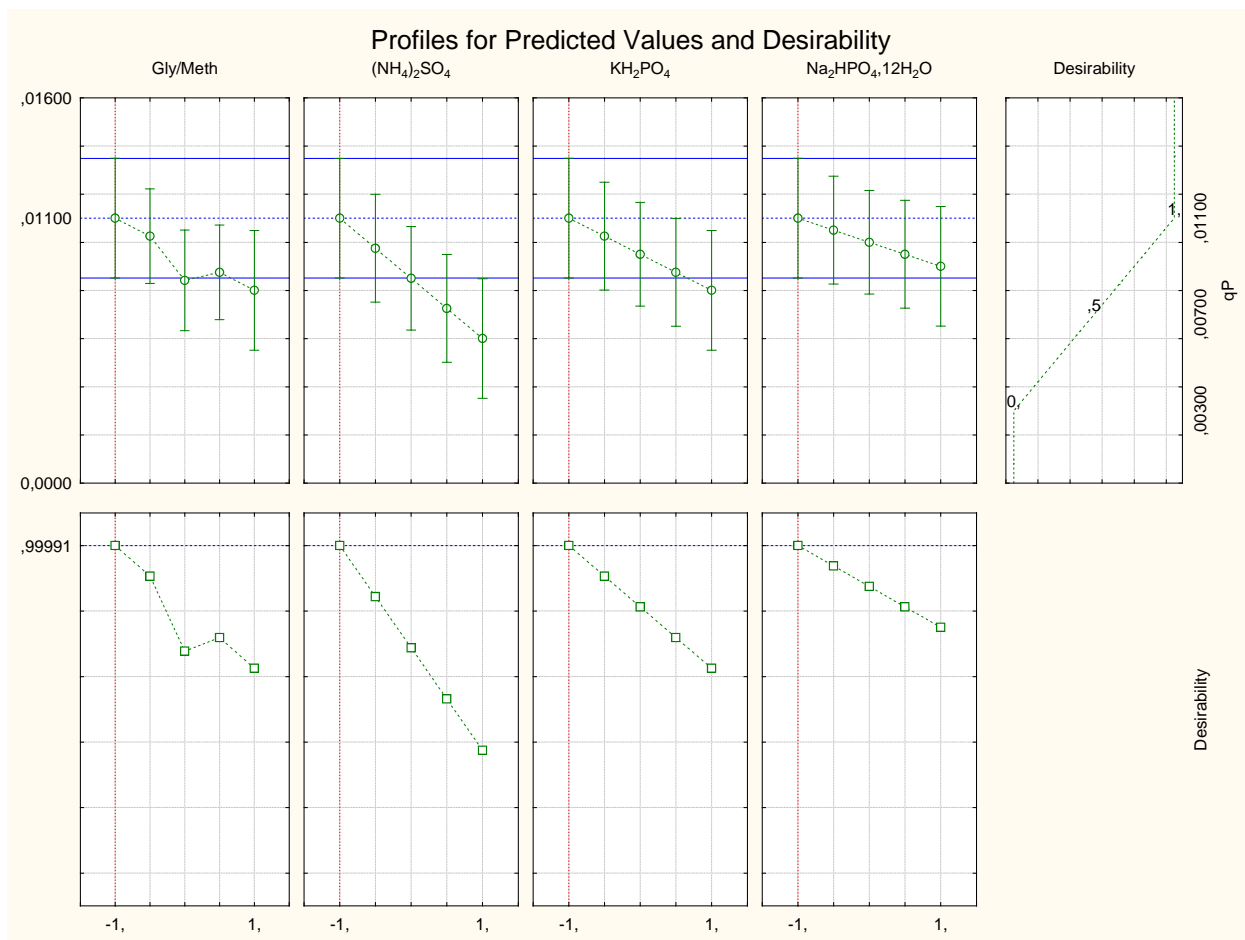


Figura 10. Perfiles de predicción qP *R. eutropha*

En la Tabla 15 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.

Tabla 15. Niveles óptimos de factores qP *R. eutropha*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario ralstonia) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
-,9998	-1,	-,9998	-,9999	0,010999	0,999908	0,008516	0,013483

4.1.6. Análisis de la productividad volumétrica de producto

El análisis estadístico de la respuesta se presenta en la Tabla 16

Tabla 16. Análisis estadístico QP *R. eutropha*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	QP	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	-1	0,014	SG <i>Media</i> 0,011 ± 0	239,93	2E-05	1	234
2	1	-1	-1	1	0,010	SG <i>C1</i> -0,002 ± 0	17,722	0,003	2	134
3	-1	1	-1	1	0,013	SG <i>C2</i> -7E-04 ± 0	6,0546	0,026	3	124
4	1	1	-1	-1	0,008	SG <i>C3</i> -0,002 ± 0	20,02	0,002	4	123
5	-1	-1	1	1	0,010	SG <i>C4</i> 0,002 ± 0	14,098	0,005	12	34
6	1	-1	1	-1	0,007	SG <i>C12</i> 0,002 ± 0	13,744	0,005	13	24
7	-1	1	1	-1	0,008	SG <i>C13</i> 0,002 ± 0	18,694	0,003	14	23
8	1	1	1	1	0,011	SG <i>C14</i> 0,001 ± 0	9,325	0,011		
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,014	Nivel de significancia α: 0,050				
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,014					
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,015					
Media - pc					0,014					
Varianza - pc					2E-08					
Desviación std - pc					2E-04					



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos positivos (un aumento en el factor aumenta la respuesta QP)

- C4, representando el factor X4 (Na₂HPO₄·12H₂O)
- C12, efecto de interacción entre X1(Glicerol/Metanol) y X2 (NH₄)₂SO₄
- C13, efecto de interacción entre X1 (Glicerol/Metanol) y X3 (KH₂PO₄)
- C14, efecto de interacción entre X1 (Glicerol/Metanol) y X4 (Na₂HPO₄·12H₂O)

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta QP)

- C1, representando el factor X1 (Glicerol/Metanol)
- C2, efecto del factor X2 ((NH₄)₂SO₄)
- C3, representando el factor X3 (KH₂PO₄)

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto), salvo C2, el resto de los efectos son del mismo orden, se representa en el gráfico de Pareto.

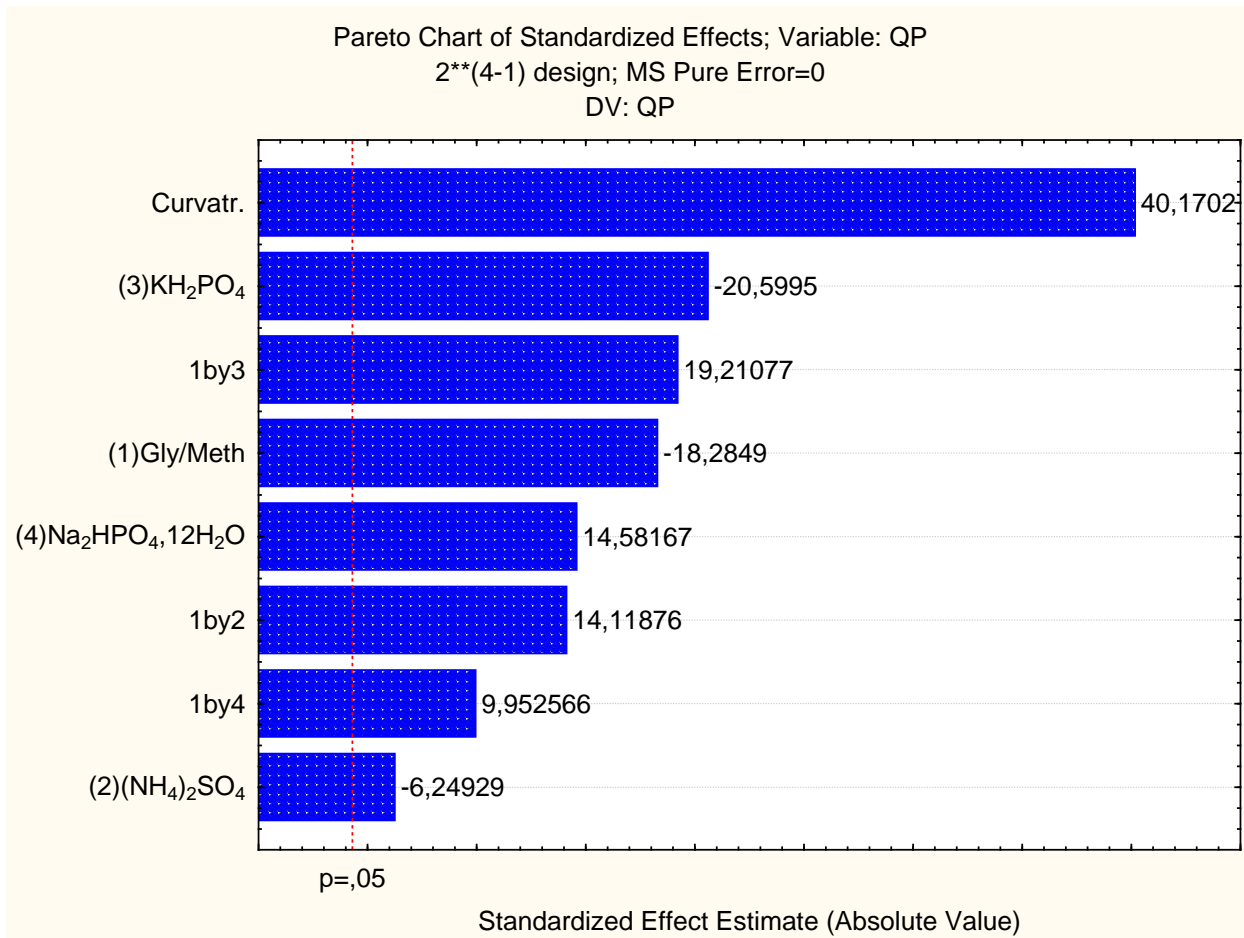


Figura 11. Gráfico de Pareto estandarizado QP *R. eutropha*

El ANOVA realizado para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher se presenta en el ANEXO Capítulo 5. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente. El gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales se adjunta en el ANEXO Capítulo 5 al igual que el histograma de residuos.

En la Figura 12 se muestran los gráficos de contorno para el sistema. Los factores se grafican con sus valores codificados (-1 a 1) tomados de a dos factores y tomando el resto de los factores en el nivel cero y constantes.

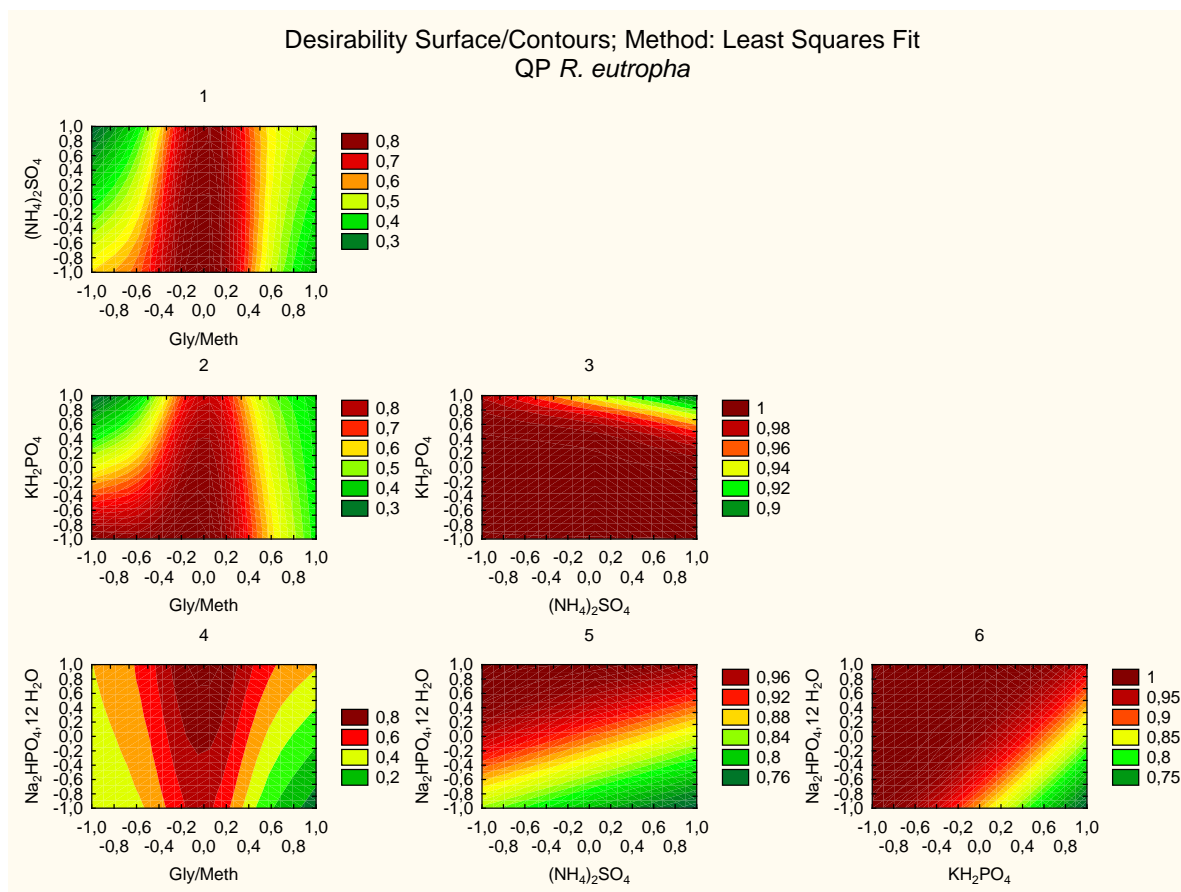


Figura 12. Gráfico de contorno QP *R. eutropha*

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a niveles de valores de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ independientes y niveles de Glicerol/Metanol cercanos al nivel cero, con efecto de curvatura
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a en nivel central de Glicerol/Metanol e independiente de la concentración de KH_2PO_4 . Para niveles de Glicerol/Metanol menor al nivel central, la respuesta aumenta con menores concentraciones de la sal. Se observa efecto de curvatura.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se obtiene la máxima respuesta en casi todo el rango de niveles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de (KH_2PO_4)
- **Gráfico 4:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs Glicerol/Metanol, La respuesta se hace mayor al aumentar el nivel de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y en el nivel cero de Glicerol/Metanol. Existe efecto de curvatura.
- **Gráfico 5:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la respuesta aumenta a niveles altos de $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ y bajos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- **Gráfico 6:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs (KH_2PO_4) , Se observa mayor nivel de respuesta a bajos niveles de KH_2PO_4 en casi todo el rango de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

A partir de los perfiles de producción se determinan los niveles para cada factor que maximizan la respuesta

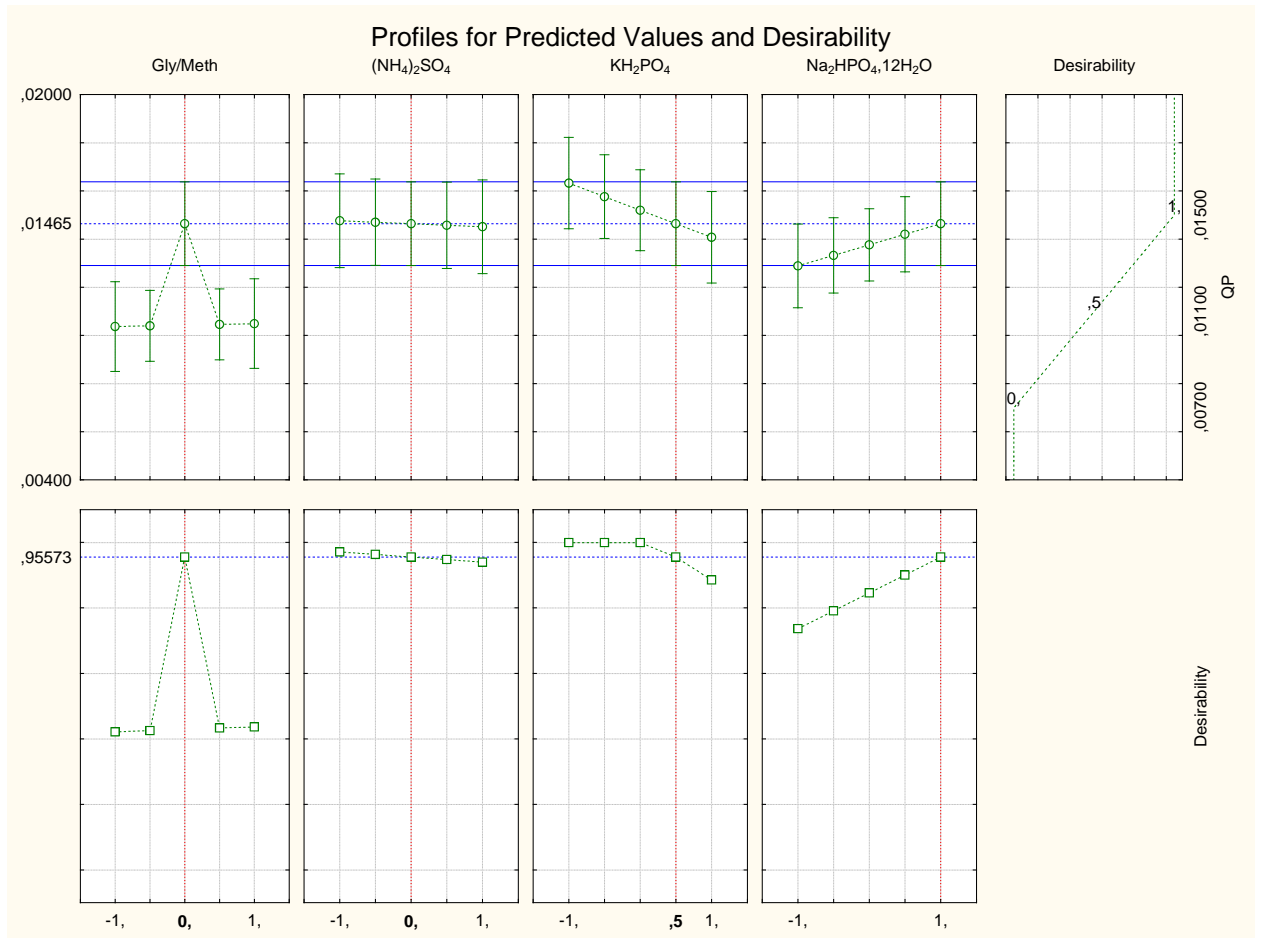


Figura 13. Gráfico de perfiles de predicción QP, *R. eutropha*

En la Tabla 17 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.

Tabla 17. Tabla de niveles óptimos QP *R. eutropha*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario ralstonia) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
0,0	0,0	0,5	1,0	0,014598	1,000000	0,014138	0,015058

4.2. Optimización del medio de cultivo de *M. extorquens*

4.2.1. Rendimientos y productividades

Se resumen en la Tabla 18, los resultados obtenidos luego de 92 horas de incubación.

Tabla 18. Rendimientos y productividades *M. extorquens*

Ensayo	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	Consumo Glicerol (g/L)	Consumo Metanol (g/L)	YX/S (g/g)	YP/S (g/g)	QP (g/Lh)	qP (g/gh)	Y p/x (g/g)
1	0,59	0,36	0,54	1,23	0,33	0,20	0,0038	0,0064	0,61
2	0,99	0,24	6,10	2,50	0,12	0,03	0,0025	0,0025	0,24
3	0,81	0,44	0,37	0,91	0,63	0,34	0,0046	0,0057	0,54
4	0,72	0,36	0,00	1,78	0,40	0,20	0,0038	0,0052	0,50
5	0,86	0,34	0,54	1,14	0,51	0,20	0,0035	0,0041	0,40
6	0,83	0,34	4,89	5,53	0,08	0,03	0,0035	0,0043	0,41
7	0,66	0,34	0,00	1,02	0,65	0,33	0,0035	0,0054	0,52
8	1,36	0,33	5,43	8,57	0,10	0,02	0,0034	0,0025	0,24
9	0,83	0,42	0,00	3,05	0,27	0,14	0,0044	0,0053	0,51
10	0,94	0,49	0,00	3,05	0,31	0,16	0,0051	0,0054	0,52
11	0,88	0,46	0,00	3,05	0,29	0,15	0,0048	0,0054	0,52

En Figura 14, se observa un frotis con tinción de Negro Sudán. Los acúmulos de PHAs se observan en color azul y la parte vegetativa de la célula en rosado.

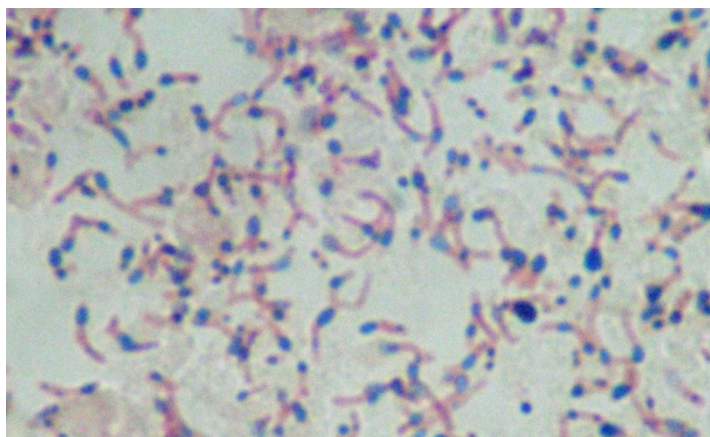


Figura 14. *M. extorquens* en frotis tinción Negro Sudán

4.2.2. Evaluación del rendimiento de producto en función del sustrato consumido (YP/S).

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico. Se detallan, el valor y signo de los efectos, error, estadístico t-Student, p, y en la última columna las equivalencias de los efectos que se confunden. A los efectos estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se les asigna la sigla **SG**.

C1, C2, C3 y C4 representan los efectos principales de X1, X2, X3 y X4, respectivamente. C12, representa el efecto de la interacción de los factores X1 y X2, C13, el efecto entre los factores X1 y X3 y C14, el efecto entre los factores X1 y X4.

Tabla 19. Análisis estadístico YP/S en *M. extorquens*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	YP/S	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	-1	0,20	SG <i>Media</i> 0,165 ± 0	0	47,617	4E-04	1 234
2	1	-1	-1	1	0,03	SG <i>C1</i> -0,199 ± 0,01	0,01	24,446	0,002	2 134
3	-1	1	-1	1	0,34	SG <i>C2</i> 0,109 ± 0,01	0,01	13,423	0,006	3 124
4	1	1	-1	-1	0,20	SG <i>C3</i> -0,046 ± 0,01	0,01	5,6412	0,03	4 123
5	-1	-1	1	1	0,20	SG <i>C4</i> -0,044 ± 0,01	0,01	5,363	0,033	12 34
6	1	-1	1	-1	0,03	<i>C12</i> -0,027 ± 0,01	0,01	3,2674	0,082	13 24
7	-1	1	1	-1	0,33	SG <i>C13</i> -0,041 ± 0,01	0,01	5,0483	0,037	14 23
8	1	1	1	1	0,02	SG <i>C14</i> -0,048 ± 0,01	0,01	5,9033	0,028	
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,14	Nivel de significancia α: 0,050				
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,16					
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,15					
Media - pc					0,15					
Variancia - pc					1E-04					
Desviación std - pc					0,012					



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos positivos (un aumento en el factor aumenta la respuesta YP/S)

- C2, representando el factor X2 ((NH₄)₂SO₄)

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta YP/S)

- C1, representando el factor X1 (Glicerol/Metanol)
- C3, representando el factor X3 (KH₂PO₄)
- C4, representando el factor X4 (Na₂HPO₄.12H₂O)
- C13, representando el efecto de interacción entre X1 y X3 (Glicerol/Metanol KH₂PO₄) la interacción entre los efectos provoca una disminución de la respuesta
- C14, representando el efecto de interacción entre X1 y X (Glicerol/Metanol Na₂HPO₄.12H₂O) la interacción entre los efectos provoca una disminución de la respuesta

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto) el efecto de mayor importancia es C1 (Glicerol/Metanol), seguido de C2 ((NH4)2SO4), siendo los restantes efectos principales y los de interacción de menor importancia. Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado.

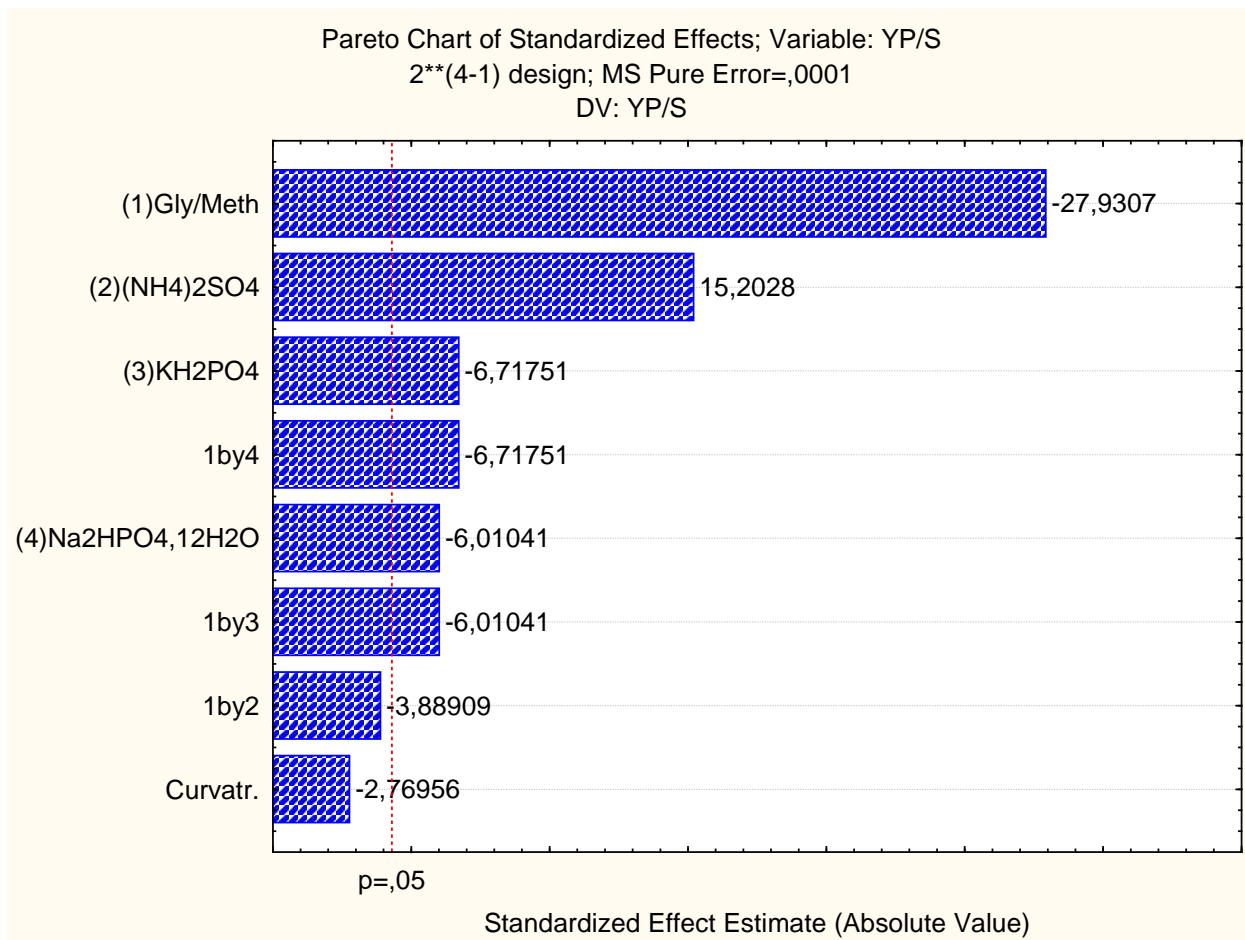


Figura 15. Gráfico de Pareto YP/S *M. extorquens*

En el ANEXO Capítulo 5 se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente. El gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales y el histograma de residuos se adjuntan en ANEXO Capítulo 5. A continuación se presentan los gráficos de contorno de respuesta. Los factores se grafican con sus valores codificados (-1 a 1) tomados de a dos factores y tomando el resto de los factores en el nivel cero y constantes.

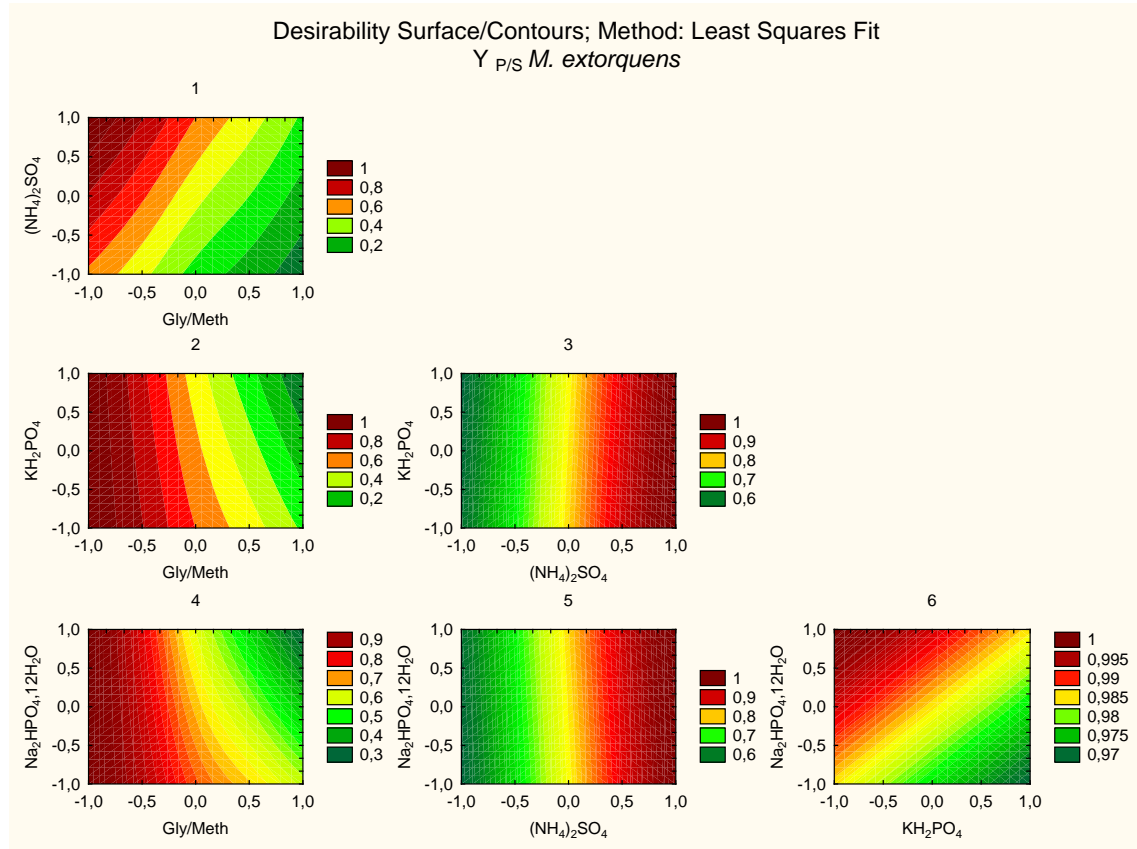


Figura 16. Gráfico de contorno YP/S para *M. extorquens*.

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(NH_4)_2SO_4$: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol es menor y rango de valores altos de $(NH_4)_2SO_4$.
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol es menor casi para todo el rango de valores de KH_2PO_4 .
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(NH_4)_2SO_4$. Se obtiene mayor respuesta a altos niveles de $(NH_4)_2SO_4$ para todo el rango de nivel de (KH_2PO_4) .
- **Gráfico 4:** $(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O)$ vs Glicerol/Metanol, La respuesta se hace mayor al disminuir el nivel de Glicerol/Metanol, para todo el rango de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.
- **Gráfico 5:** $(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O)$ vs $(NH_4)_2SO_4$, la respuesta aumenta a niveles altos de $(NH_4)_2SO_4$ e independiente del nivel de $(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O)$.
- **Gráfico 6:** $(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O)$ vs (KH_2PO_4) , Se observa mayor nivel de respuesta a niveles bajos de KH_2PO_4 y altos de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.

A través de los perfiles de predicción se determina el óptimo nivel para cada uno de los factores, de forma de maximizar la respuesta.

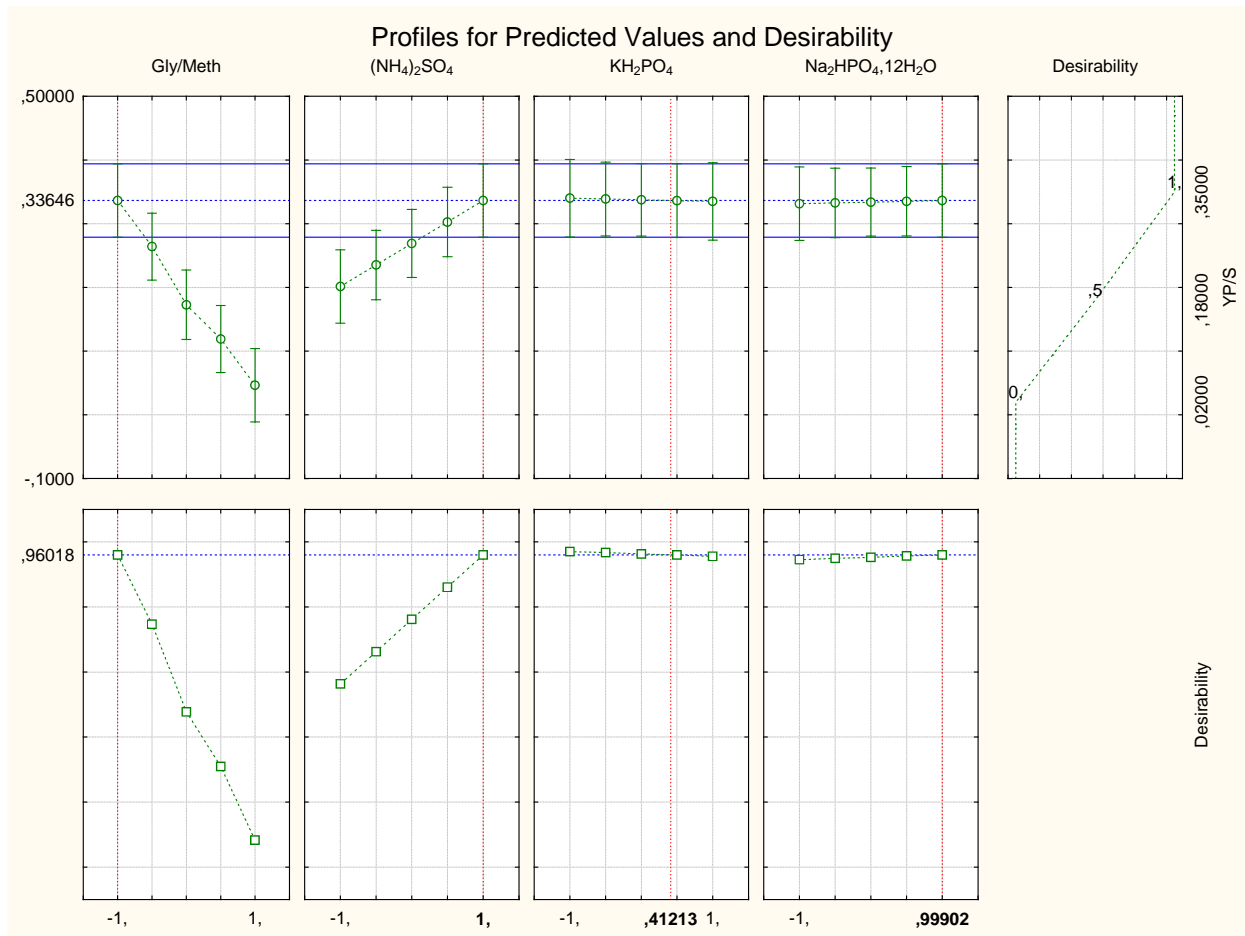


Figura 1. Perfiles de predicción YP/S

En la Tabla 20 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.


El modelo predice la maximización de YP/S utilizando los factores en los siguientes niveles codificados:

Tabla 20. Nivel Óptimo de YP/S *M. extorquens*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario metilo) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%PI	+95%PI
-1,	1,	,41213	,99902	0,336461	0,960179	0,278864	0,394058

4.2.3. Evaluación del rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido.

Tabla 21. Análisis estadístico de YX/S para *M. extorquens*.

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	YX/S	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos	
1	-1	-1	-1	-1	0,33	SG Media	0,335 ± 0,01	61,628	3E-04	1 234	
2	1	-1	-1	1	0,12	SG C1	-0,357 ± 0,01	27,961	0,001	2 134	
3	-1	1	-1	1	0,63	SG C2	0,185 ± 0,01	14,536	0,005	3 124	
4	1	1	-1	-1	0,40	C3	-0,037 ± 0,01	2,8763	0,103	4 123	
5	-1	-1	1	1	0,51	C4	-0,027 ± 0,01	2,1287	0,167	12 34	
6	1	-1	1	-1	0,08	C12	-0,032 ± 0,01	2,5134	0,128	13 24	
7	-1	1	1	-1	0,65	SG C13	-0,135 ± 0,01	10,557	0,009	14 23	
8	1	1	1	1	0,10	SG C14	-0,109 ± 0,01	8,517	0,014		
pc1	0	0	0	0	0,27	Nivel de significancia α: 0,050 					
pc2	0	0	0	0	0,31						
pc3	0	0	0	0	0,29						
					Media - pc	0,289					
					Varianza - pc	3E-04					
					Desviación std - pc	0,018					



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos positivos (un aumento en el factor aumenta la respuesta YX/S)

- C2, representando el factor X2 ((NH₄)₂SO₄)

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta YX/S)

- C1, representando el factor X1 (Glicerol/Metanol)
- C13, representando la interacción entre los factores X1 y X3 (Glicerol/Metanol, KH₂PO₄)
- C14, representando la interacción entre los factores X1 y X4 (Glicerol/Metanol, Na₂HPO₄.12H₂O).

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto) el efecto de mayor importancia es C1 (Glicerol/Metanol), seguido de C2 ((NH₄)₂SO₄), siendo los restantes efectos principales y los de interacción de menor importancia. Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado.

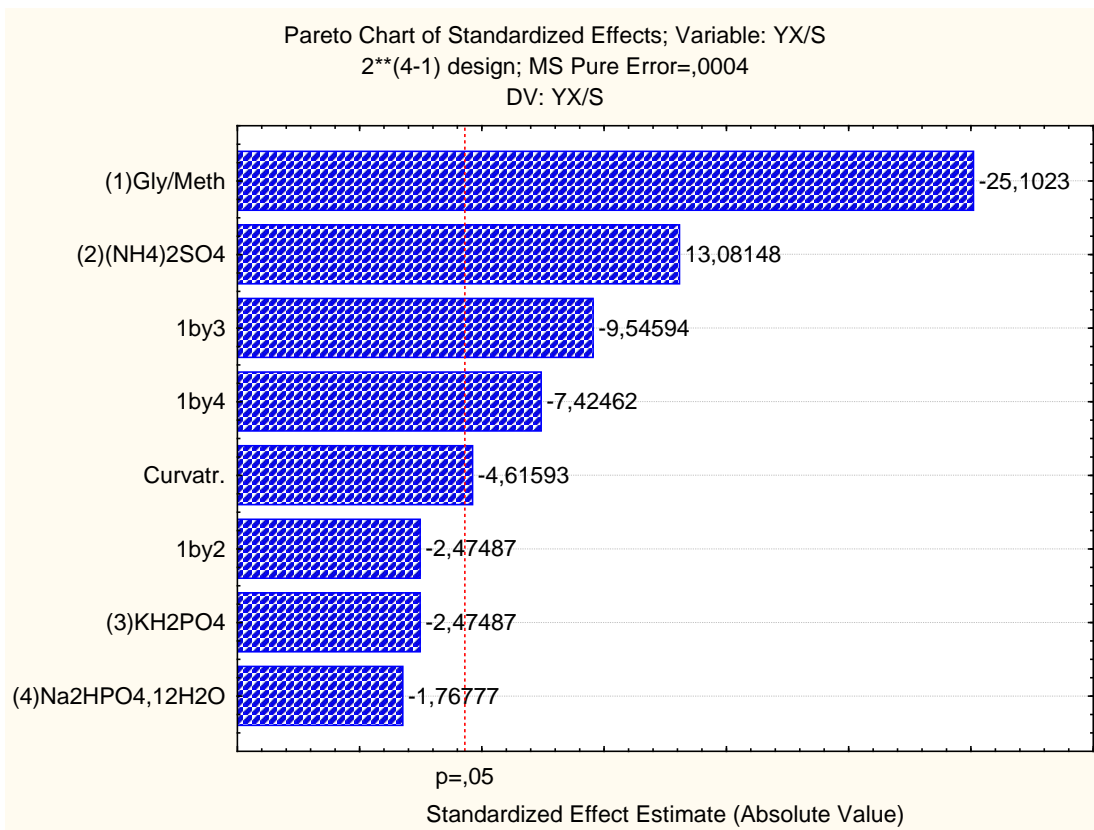


Figura 17. Gráfico de Pareto: YX/S *M. extorquens*

El ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher se presenta en el ANEXO Capítulo 5. El efecto de curvatura en el modelo es significativo estadísticamente. El gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales y el histograma de residuos se presentan en Anexo Capítulo 5

En la Figura 18. Gráfico de contorno YX/S *M. extorquens* se presentan los gráficos de contorno de respuesta. Los factores se grafican con su valores codificados (-1 a 1) tomados de a dos factores y tomando el restos de los factores en el nivel cero y constantes.

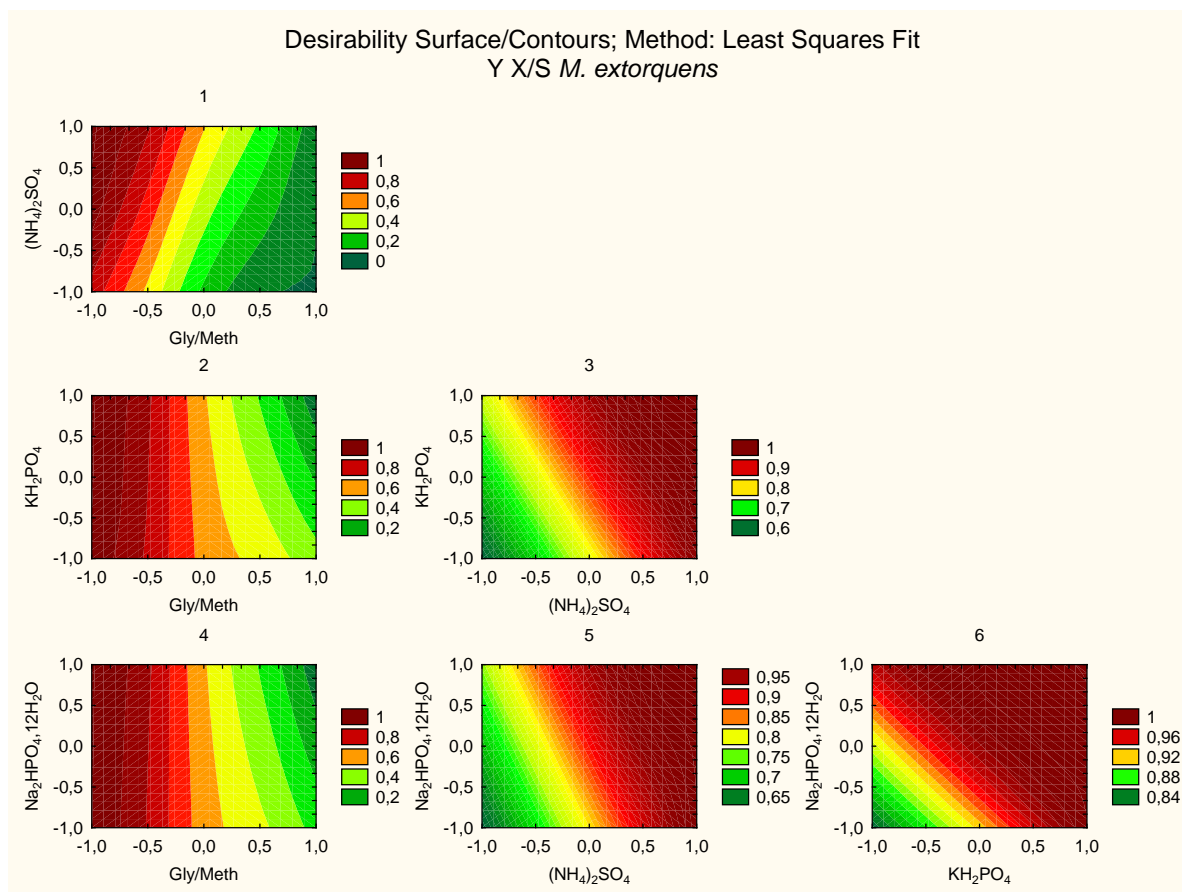


Figura 18. Gráfico de contorno YX/S *M. extorquens*

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a menores niveles de Glicerol/Metanol y mayor de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol disminuye y es independiente del nivel de KH_2PO_4 a partir del nivel cero de Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se obtiene mayor respuesta a altos niveles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y (KH_2PO_4)
- **Gráfico 4:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs Glicerol/Metanol, Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol disminuye y es independiente del nivel de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a partir del nivel cero de Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 5:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la respuesta aumenta a niveles altos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$
- **Gráfico 6:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs (KH_2PO_4) , se observa un aumento de la respuesta a niveles altos de KH_2PO_4 y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

A través de los perfiles de predicción se determina el óptimo nivel para cada uno de los factores, de forma de maximizar la respuesta.

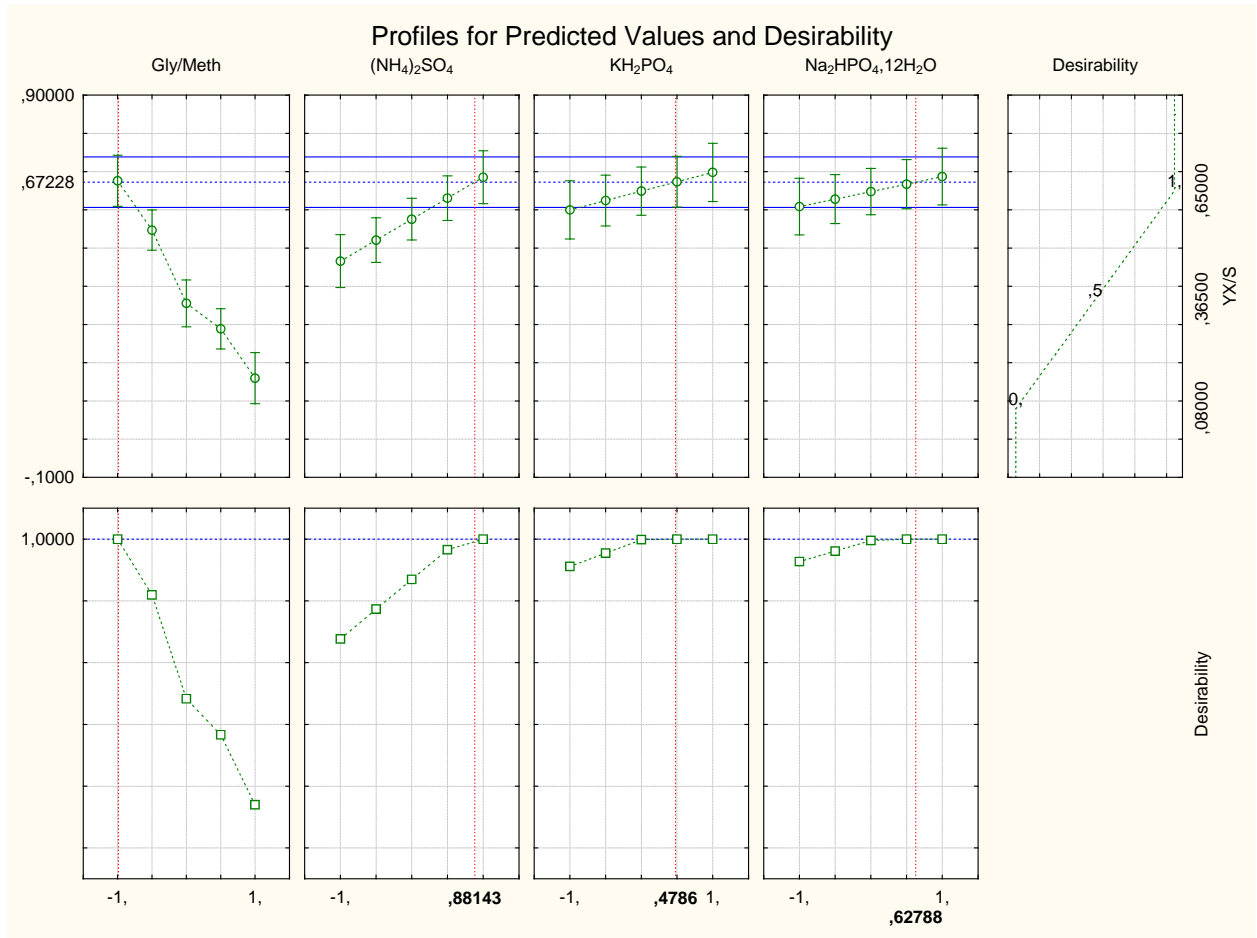


Figura 19. Perfiles de predicción para YX/S en *M. extorquens*

En la Tabla 22 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.

El modelo predice un valor óptimo de YX/S utilizando los factores en los siguientes niveles codificados:

Tabla 22. Nivel Óptimo de YX/S *M. extorquens*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario metilo) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
-,9856	,88143	,4786	,62788	0,672279	1,000000	0,606098	0,738459

4.2.4. Evaluación del rendimiento de producto en función de la biomasa generada.

En la Tabla 23. Análisis estadístico para YP/X *M. extorquens*, se resumen los resultados del análisis.

Tabla 23. Análisis estadístico para YP/X *M. extorquens*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y P/X	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos	
1	-1	-1	-1	-1	0,61	SG <i>Media</i> 0,455 ± 0	0	163,2	4E-05	1 234	
2	1	-1	-1	1	0,24	SG <i>C1</i> -0,167 ± 0,01	0,01	25,568	0,002	2 134	
3	-1	1	-1	1	0,54	SG <i>C2</i> 0,036 ± 0,01	0,01	5,4801	0,032	3 124	
4	1	1	-1	-1	0,50	SG <i>C3</i> -0,083 ± 0,01	0,01	12,724	0,006	4 123	
5	-1	-1	1	1	0,40	SG <i>C4</i> -0,153 ± 0,01	0,01	23,358	0,002	12 34	
6	1	-1	1	-1	0,41	<i>C12</i> 0,009 ± 0,01	0,01	1,442	0,286	13 24	
7	-1	1	1	-1	0,52	SG <i>C13</i> 0,038 ± 0,01	0,01	5,836	0,028	14 23	
8	1	1	1	1	0,24	SG <i>C14</i> -0,059 ± 0,01	0,01	9,0862	0,012		
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,51	Nivel de significancia α: 0,050					
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,52						
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,52						
					Media - <i>pc</i>	0,517					
					Varianza - <i>pc</i>	9E-05					
					Desviación std - <i>pc</i>	0,009					



De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos positivos (un aumento en el factor aumenta la respuesta YP/X)

- C2, representando el factor X2 ((NH₄)₂SO₄)
- C13, representando la interacción entre los factores X1 y X3 (Glicerol/Metanol, KH₂PO₄)

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta YP/X)

- C1, representando el factor X1 (Glicerol/Metanol).
- C3, factor X3. KH₂PO₄
- C4, factor X4 Na₂HPO₄.12H₂O
- C14, representando la interacción entre los factores X1 y X4 (Glicerol/Metanol, Na₂HPO₄.12H₂O).

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto) el efecto de mayor importancia es C1 (Glicerol/Metanol), seguido de C4 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y C3 (KH_2PO_4), siendo los restantes efectos principales y los de interacción de menor importancia. Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado.

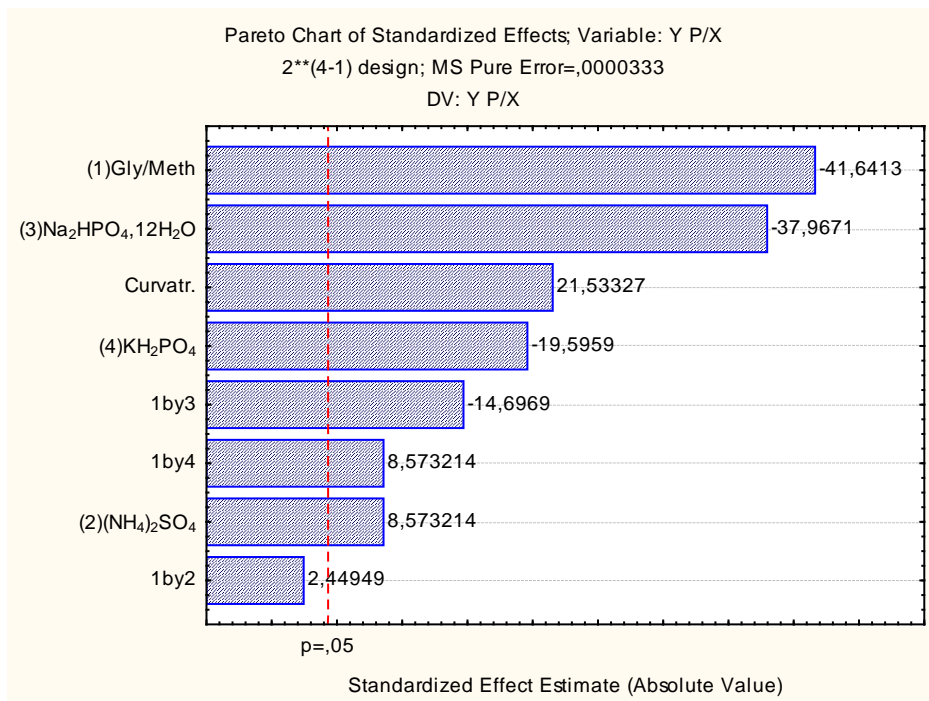


Figura 20. Gráfico de Pareto Y P/X *M extorquens*

En el ANEXO Capítulo 5 se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo es significativo estadísticamente. El gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales y el histograma de residuos se adjuntan en el ANEXO Capítulo 5. En la Figura 21 se presentan los gráficos de contorno de respuesta. Los factores se grafican con sus valores codificados (-1 a 1) tomados de a dos factores y tomando el resto de los factores en el nivel cero y constantes.

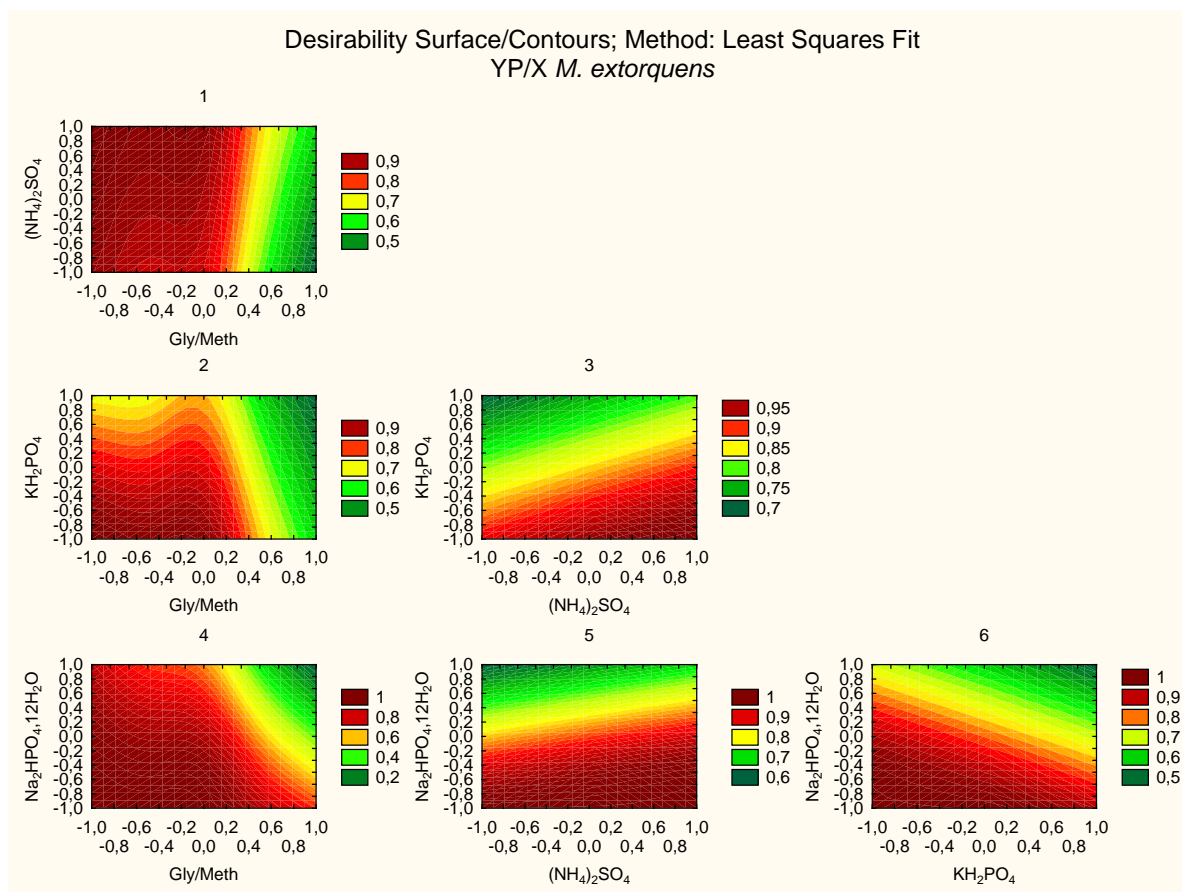


Figura 21. Gráfico de contorno YP/X *M. extorquens*.

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol es menor e independiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir del nivel cero de Glicerol/Metanol. Se observa efecto de curvatura.
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que el nivel de Glicerol/Metanol disminuye y KH_2PO_4 disminuye, con efecto de curvatura.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se obtiene mayor respuesta a altos niveles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y bajos de (KH_2PO_4)
- **Gráfico 4:** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) vs Glicerol/Metanol, Se observa que la respuesta es mayor a menores niveles de Glicerol/Metanol y menor de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.
- **Gráfico 5:** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la respuesta aumenta a niveles altos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y niveles bajos de ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), independizándose la respuesta a nivel cero.
- **Gráfico 6:** ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) vs (KH_2PO_4), se observa un aumento de la respuesta a niveles bajos de KH_2PO_4 y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

A través de los perfiles de predicción se determina el óptimo nivel para cada uno de los factores, de forma de maximizar la respuesta.

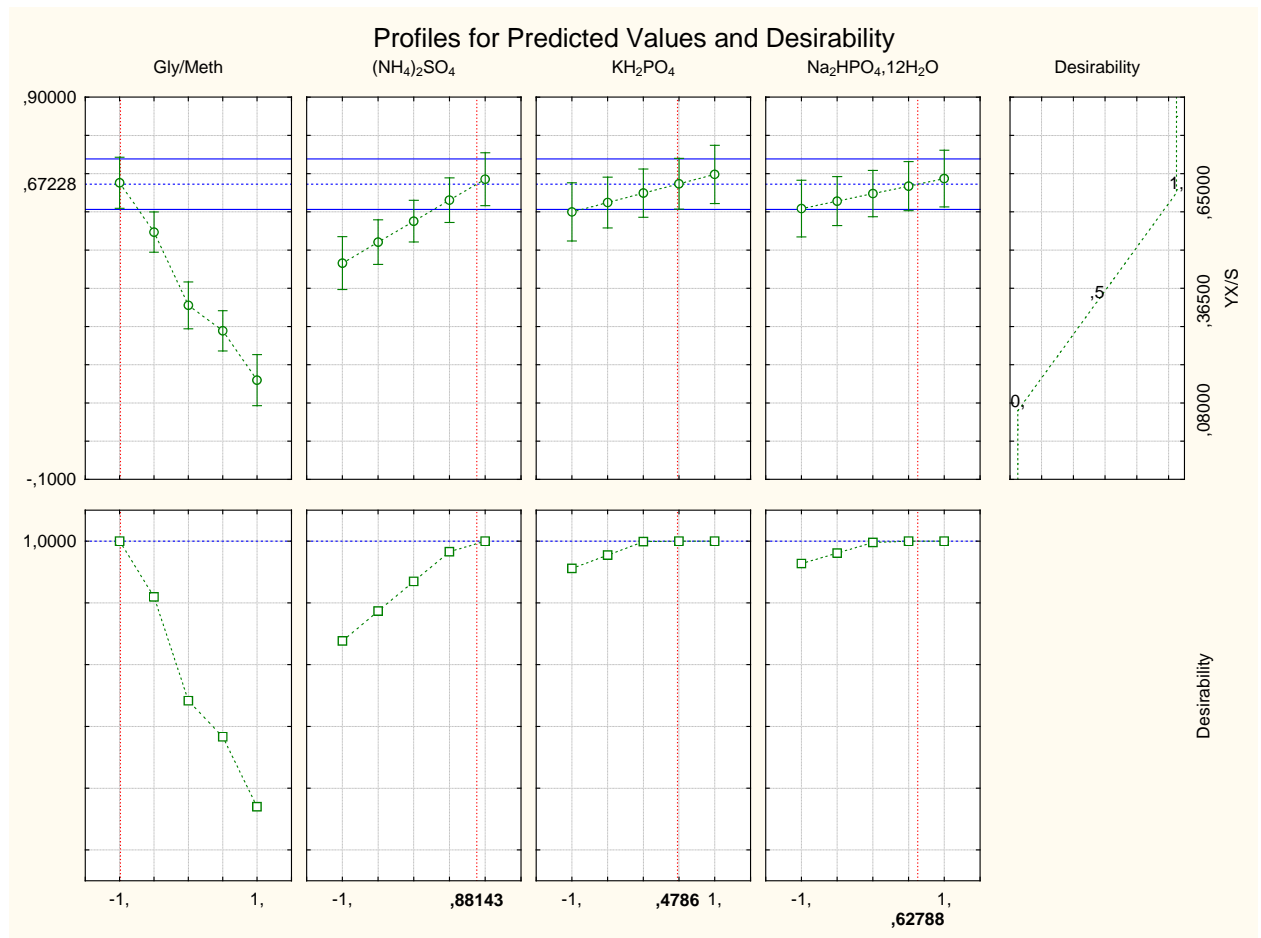


Figura 22. Perfiles de predicción Y P/X en *M. extorquens*

En la Tabla 24 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.

El modelo predice un valor óptimo de YP/X utilizando los factores en los siguientes niveles codificados:

Tabla 24. Nivel Óptimo de YP/X *M. extorquens*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario metilo) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
-,9856	,88143	,4786	,62788	0,672279	1,000000	0,606098	0,738459

4.2.5. Evaluación de la productividad volumétrica de producto

En la Tabla 25 se detallan los resultados del análisis realizado.

Tabla 25. Resultados de análisis de Qp en *M. extorquens*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	QP	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	-1	0,004	SG Media 0,004 ± 0	35,372	8E-04	1	234
2	1	-1	-1	1	0,003	C1 -5E-04 ± 0	2,1141	0,169	2	134
3	-1	1	-1	1	0,005	C2 5E-04 ± 0	1,9128	0,196	3	124
4	1	1	-1	-1	0,004	C3 -1E-04 ± 0	0,5034	0,665	4	123
5	-1	-1	1	1	0,004	C4 -1E-04 ± 0	0,5034	0,665	12	34
6	1	-1	1	-1	0,004	C12 8E-05 ± 0	0,302	0,791	13	24
7	-1	1	1	-1	0,004	C13 5E-04 ± 0	1,9128	0,196	14	23
8	1	1	1	1	0,003	C14 -5E-04 ± 0	2,1141	0,169		
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,004	Nivel de significancia α: 0,050				
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,005					
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,005					
Media - pc					0,005					
Varianza - pc					1E-07					
Desviación std - pc					4E-04					




El diseño experimental utilizado no puede describir las respuestas observadas. El único término con significancia estadística es la media, por lo que se asume un valor único promedio para todas las experiencias.

4.2.6. Evaluación de la productividad específica de producto

En la Tabla 26 se presentan los resultados para el diseño planteado

Tabla 26. Análisis de qp en *M. extorquens*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	qP	Efectos		Error	t (2)	p	Confundidos		
1	-1	-1	-1	-1	0,0064	SG	Media	0,005 ± 0	163,2	4E-05	1	234	
2	1	-1	-1	1	0,0025	SG	C1	-0,002 ± 0	25,568	0,002	2	134	
3	-1	1	-1	1	0,0057	SG	C2	4E-04 ± 0	5,4801	0,032	3	124	
4	1	1	-1	-1	0,0052	SG	C3	-9E-04 ± 0	12,724	0,006	4	123	
5	-1	-1	1	1	0,0041	SG	C4	-0,002 ± 0	23,358	0,002	12	34	
6	1	-1	1	-1	0,0043		C12	1E-04 ± 0	1,442	0,286	13	24	
7	-1	1	1	-1	0,0054	SG	C13	4E-04 ± 0	5,836	0,028	14	23	
8	1	1	1	1	0,0025	SG	C14	-6E-04 ± 0	9,0862	0,012			
<i>pc1</i>	0	0	0	0	0,0053	Nivel de significancia α: 0,050							
<i>pc2</i>	0	0	0	0	0,0054								
<i>pc3</i>	0	0	0	0	0,0054								
Media - pc					0,005								
Varianza - pc					9E-09								
Desviación std - pc					1E-04								



CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

De acuerdo a los resultados obtenidos resultan estadísticamente significativos los siguientes efectos:

Efectos positivos (un aumento en el factor aumenta la respuesta qP)

- C2, representando el factor X2 ((NH₄)₂SO₄)
- C13, representando la interacción entre los factores X1 y X3 (Glicerol/Metanol, KH₂PO₄)

Efectos negativos (un aumento en el factor disminuye la respuesta qP)

- C1, representando el factor X1 (Glicerol/Metanol).
- C3, factor X3. KH₂PO₄
- C4, factor X4 Na₂HPO₄.12H₂O
- C14, representando la interacción entre los factores X1 y X4 (Glicerol/Metanol, Na₂HPO₄.12H₂O).

De acuerdo a la magnitud de los efectos (valor absoluto) el efecto de mayor importancia es C1 (Glicerol/Metanol), seguido de C4 (Na₂HPO₄.12H₂O y C3 (KH₂PO₄), siendo los restantes efectos

principales y los de interacción de menor importancia. Esto se visualiza en el gráfico de Pareto estandarizado.

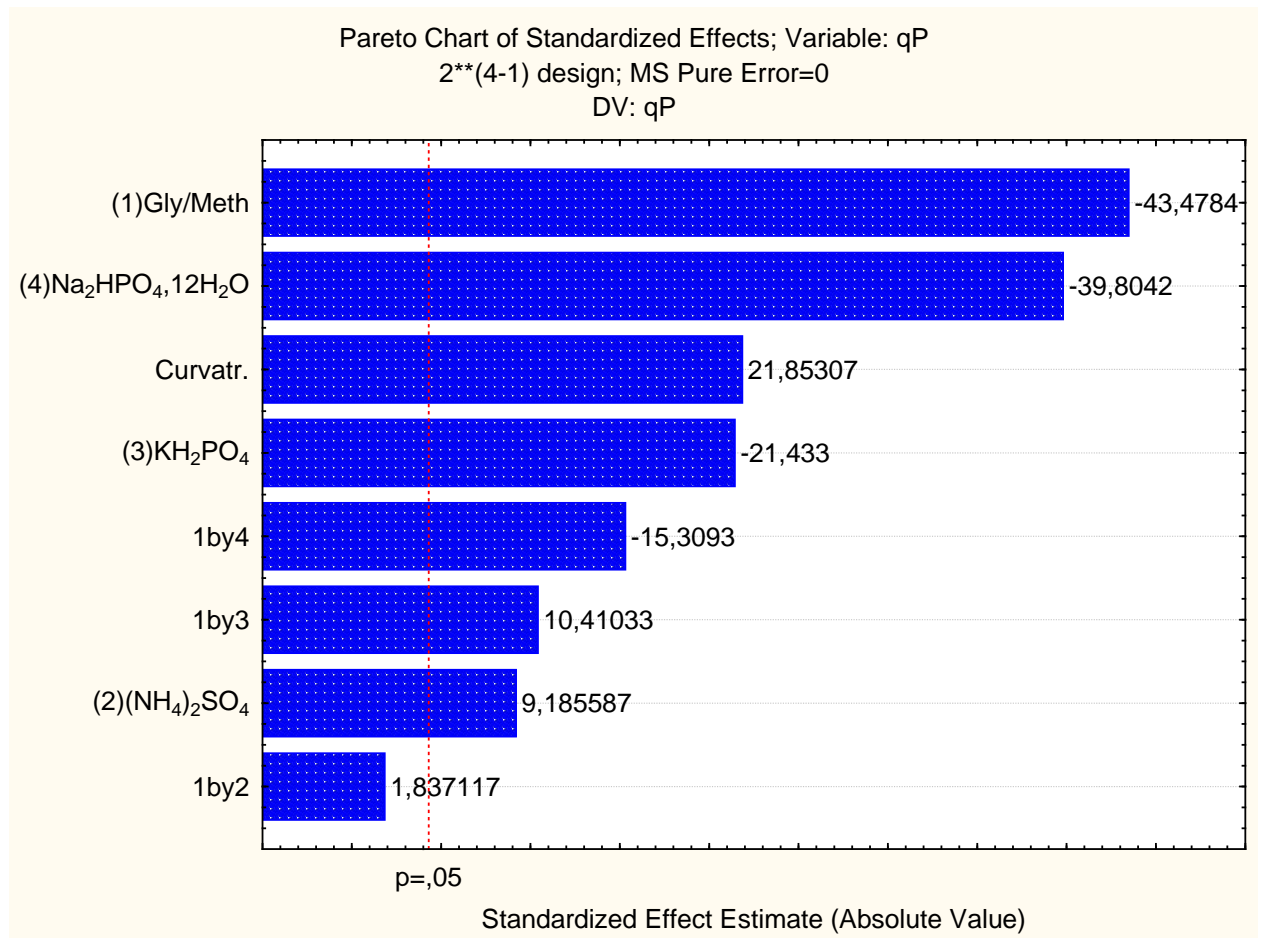


Figura 23. Gráfico de Pareto qP *M. extorquens*

Se presenta el ANOVA para el modelo presentado en ANEXO Capítulo 5, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher, en el ANEXO Capítulo 5. El efecto de curvatura en el modelo es significativo estadísticamente. La relación lineal entre los valores observados y los predichos por el modelo y el histograma de residuos se detallan en ANEXO Capítulo 5.

En la Figura 24 se presenta el análisis del gráfico de contorno para la respuesta evaluada. Los factores se grafican en niveles codificados (-1 a +1), tomados de a dos factores y manteniendo el resto de los factores constantes en el nivel codificado cero.

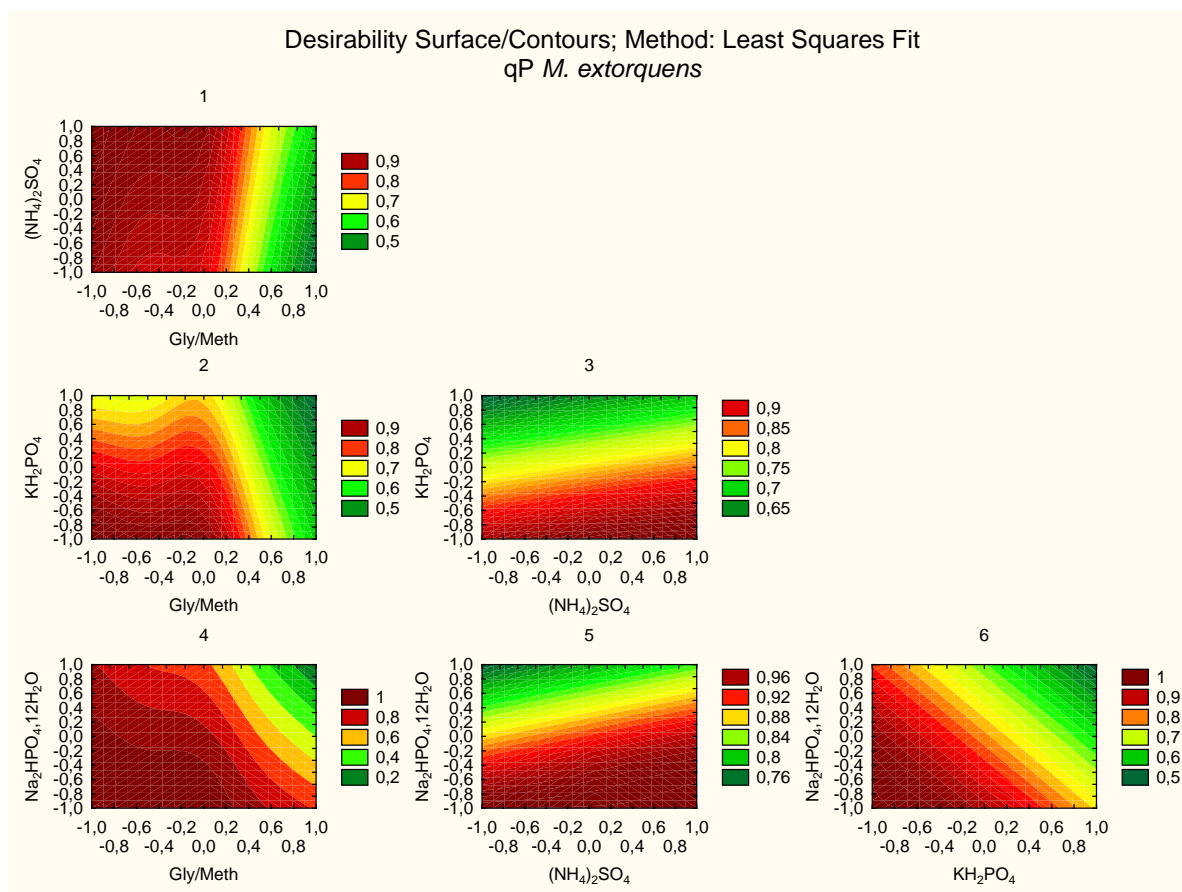


Figura 24. Gráfico de contorno qP para *M. extorquens*

Análisis de las superficies de respuesta

- **Gráfico 1:** Glicerol/Metanol vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol es menor e independiente para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir del nivel 0 de Gli/Met. La variación con respecto a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es positiva (mayor respuesta a mayor nivel) para el rango de nivel inferior de Glicerol/Metanol.
- **Gráfico 2:** KH_2PO_4 vs Glicerol/Metanol: Se observa que la respuesta es mayor a medida que Glicerol/Metanol disminuye y el nivel de KH_2PO_4 disminuye, con efecto de curvatura.
- **Gráfico 3:** (KH_2PO_4) vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se obtiene mayor respuesta a altos niveles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y bajos de (KH_2PO_4)
- **Gráfico 4:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs Glicerol/Metanol, Se observa que la respuesta es mayor a medida que disminuye tanto Glicerol/Metanol como el $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.
- **Gráfico 5:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la respuesta aumenta a niveles altos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$
- **Gráfico 6:** $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$ vs (KH_2PO_4) , se observa un aumento de la respuesta a niveles bajos de KH_2PO_4 y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

A partir del gráfico de predicción se determinan los valores óptimos de cada factor.

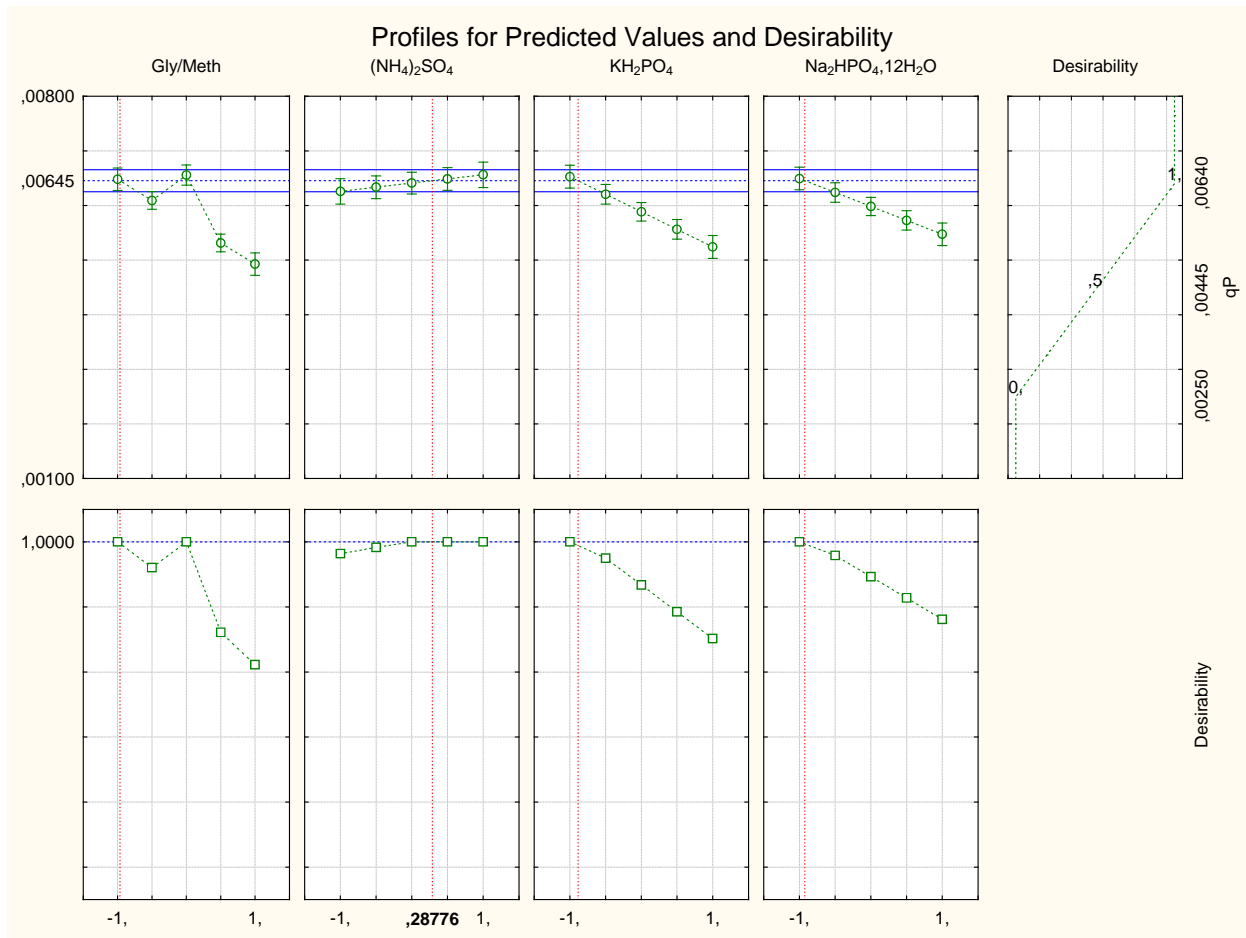


Figura 25. Perfiles de predicción de qP para *M. extorquens*

En la Tabla 27 se presentan los niveles optimizados codificados de los factores X1, X2, X3 y X4 que maximizan la respuesta (valor deseado codificado) junto con el valor predicho por el modelo y el intervalo de confianza.

Tabla 27. Nivel Óptimo de qP *M. extorquens*

Current factor settings and predicted responses (PHB fraccionario metilo) Predicted responses at the current level of each factor in the model							
X1	X2	X3	X4	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
-,9661	,28776	-,8858	-,9222	0,006454	1,000000	0,006252	0,006655

4.3. Selección de las condiciones de cultivo

Se propone la optimización del medio de cultivo para diferentes tipos de estrategia de producción de PHA. Según la estrategia a utilizar será la respuesta a tener en cuenta y la composición del medio de cultivo que la optimice.

- a. Cultivo batch: La producción se da en fase estacionaria, el medio de cultivo debe contener los nutrientes necesarios para obtener una cantidad de biomasa alta, al momento en cual se consuma todo el nutriente limitante (fuente de N o fuente de P) debe permanecer en el medio de cultivo un exceso de fuente de carbono. Se busca optimizar las productividades específicas y volumétricas, el porcentaje de acumulación de PHA en la célula (rendimiento de PHA con respecto a biomasa) y aprovechamiento de la fuente de carbono para generación de PHA (rendimiento de producto con respecto al sustrato consumido).
- b. Cultivo batch en dos etapas: En el primer batch, se optimiza la producción de biomasa con bajo consumo de sustrato (YX/S). En este tipo de producción la biomasa generada en el primer batch es separada del medio de cultivo e inoculada en su totalidad en un segundo medio de cultivo con exceso de fuente de carbono y limitación o (ausencia) de un nutriente (fuente de P ó fuente de N).
- c. Fedbatch: Se inicia como cultivo batch (igual estrategia que la detallada en el punto a), para luego agregar una alimentación en pulsos, continua o controlada para mantener una cierta concentración residual de fuente de carbono en el medio (Ver capítulo 6).

4.3.1. Selección de la composición del medio de cultivo para *R. eutropha*

En función del análisis realizado, se resumen la composición del medio de cultivo (nivel de factor codificado) que optimizan las diferentes respuestas seleccionadas.

Tabla 28. Niveles óptimos de factores *R. eutropha*

	QP	Y P/X	Y P/S	qP	Y X/S
Glicerol/Metanol	0	-1	-1	-1	nam
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	-1	-1	-1	Nam
KH ₂ PO ₄	0.5	-1	0.42	-1	Nam
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1	-1	1	-1	Nam

nam: no se ajusta al modelo

En función de la estrategia de producción a utilizar se pueden seleccionar diferentes parámetros para la optimización del medio de cultivo:

- a) Condiciones de cultivo para producción Batch

Se decide utilizar para la formulación del medio de cultivo, la optimización realizada para la respuesta QP, que optimiza la producción de biopolímero por unidad de volumen y de tiempo. Si bien la respuesta YP/X es importante, ya que representa el porcentaje de acumulación de PHAs en la célula, el nivel que optimiza esta respuesta (que coincide con otras respuestas), da como resultado un bajo nivel PHA en términos absolutos (ver Tabla 8), lo cual no lo hace atractivo desde el punto de vista de la producción.

La composición de los factores evaluados se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Composición de factores evaluados para una producción batch

Factor	Concentración (g/L)
Glicerol/Metanol	10,88/23.10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.25
KH_2PO_4	1.55
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10.0

b) Condiciones de cultivo para producción Batch en dos etapas

Primer batch

Dado que el modelo planteado para la respuesta Y X/S no resultó estadísticamente significativo, se decidió optimizar para esta primera etapa la producción de biomasa (g/L). (El estudio de optimización se detalla en el ANEXO Capítulo 5.

La composición del medio (factores evaluados) se presenta en la Tabla 30.

Tabla 30. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (primer batch)

Factor	Concentración (g/L)
Glicerol/Metanol	17.80/37.83
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0
KH_2PO_4	2.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10.0

Segundo batch

Se propone utilizar el medio de cultivo utilizado en el primer batch con ausencia (o limitación) de un nutriente, para generar las condiciones de stress necesarias para favorecer la producción y acumulación de PHAs.

Tabla 31. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (segundo batch)

Factor	Concentración (g/L)
Glicerol/Metanol	17.80/37.83
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0
KH_2PO_4	2.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10.0

4.3.2. Selección de la composición de medio de cultivo para *M. extorquens*

En función del análisis realizado, se resume la composición del medio de cultivo (nivel de factor codificado) que optimizan las diferentes respuestas seleccionadas.

Tabla 32. Niveles óptimos de factores *M. extorquens*

	QP	Y P/X	Y P/S	qP	Y X/S
Glicerol/Metanol	nam	-1	-1	-1	-1
(NH ₄) ₂ SO ₄	nam	0.9	1	0.3	0.9
KH ₂ PO ₄	nam	0.5	0.42	-0.9	0.5
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	nam	0.6	1	-0.9	0.6

nam: no se ajusta al modelo

a) Cultivo en dos etapas

Primer batch

En la primera etapa se prioriza la generación de biomasa con el menor consumo de sustrato y la formulación a partir de optimización de Y X/S (Tabla 33)

Tabla 33. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (primer batch)

Factor	Concentración (g/L)
Glicerol/Metanol	0.79/1.76
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.923
KH ₂ PO ₄	6
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.64

Segundo batch

Una segunda etapa de producción (acumulación de biopolímero), con el medio de cultivo formulado con ausencia (o limitado) de un nutriente para favorecer la acumulación.

Tabla 34. Composición de factores evaluados para producción en batch en dos etapas (primer batch)

Factor	Concentración (g/L)
Glicerol/Metanol	0.79/1.76
(NH ₄) ₂ SO ₄	0
KH ₂ PO ₄	6
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.64

b) Cultivo batch

Para maximizar la producción de bioplástico en menor tiempo y volumen de medio de cultivo, el parámetro más representativo es QP. En caso de *M. extorquens*, no se encontró un modelo que representara esta respuesta en función de los factores evaluados. En este caso, se considera para la formulación del medio de cultivo los niveles obtenidos en la optimización de qP e Y P/X. Dichos niveles de factores optimizados son muy similares a los obtenidos en la optimización de YP/S. De esta forma se utilizaría un medio de cultivo que favorece la acumulación de biopolímero producido por gramo de biomasa y hora de cultivo, teniendo en cuenta la eficiencia de consumo de sustrato.

Tabla 35. Composición de factores evaluados para una producción batch

Factor	Concentración (g/L)
Glicerol/Metanol	0.79/1.76
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.93
KH ₂ PO ₄	6.0
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.64

4.4. Comparación de *R. eutropha* DSM 545 y *M. extorquens* DSM 1430 como productoras de PHA.

Se presenta a continuación una tabla conteniendo los máximos valores de diferentes respuestas obtenidas en los ensayos realizados en ambas cepas.

Tabla 36. *M. extorquens* vs *R. eutropha*

	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	QP (g/Lh)	qP (g/gh)	YP/X (g/g)	YX/S (g/g)	YP/S (g/g)
<i>R. eutropha</i>	48	4.0	0.70	0.015	0.011	0.55	0.73	0.30
<i>M. extorquens</i>	96	1.36	0.49	0.0051	0.0064	0.61	0.51	0.34

Con respecto a la acumulación de PHA, *M. extorquens* acumula un porcentaje mayor de biopolímero, pero a mayor tiempo de incubación. Esto se ve reflejado en la respuesta QP y qP en la que la producción por litro y por hora de PHA y la productividad específica es un orden superior en *R. eutropha*. Por otra parte la generación de biomasa es ampliamente superior en *R. eutropha*, al igual que la producción absoluta de PHA. Con respecto al uso del sustrato evaluado en las respuestas YX/S e Y P/S, son del mismo orden para ambas cepas. En término absolutos *R. eutropha* es mejor candidata para utilizar en la producción de biopolímeros, en las condiciones ensayadas según lo expuesto anteriormente. Comparando los resultados obtenidos con los publicados en otros trabajos (Ver Capítulo 3) la productividad volumétrica obtenida para ambas cepas es menor al rango encontrado en la revisión bibliográfica (0.066-0.8 g/L h), pretendiéndose mejorar este parámetro mediante la optimización de la condiciones de operación en reactor de laboratorio (Capítulo 7).

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron las formulaciones del medio de cultivo para ambas cepas que optimizan la producción de PHAs mediante diferentes sistemas de producción, evaluando diferentes respuestas.

Se determinó que *R. eutropha* ofrece mejores características como productora de PHAs que *M. extorquens*, dado la productividad volumétrica de generación de PHAs obtenida es un orden superior.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Braunegg, G., G. Lefebvre, y K F Genzer. «Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects.» *J. of Biotechnol* 65 (1998): 127-161.
- Cavalheiro, J.M B.T, .C M.D De Almeida, C. Grandfils, y M.m R. Da Fonseca. «Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupravidus necator* using waste glycerol.» *Process Biochemistry* 44 (2009): 509-515.
- Fernandez Melcon, Carmen D., y Montserrat Piñeiro Barcia. «Superficie de respuesta: Métodos y Diseño.» Curso de Experimentos, Departamento de Estadística e Investigación Operativa y Didáctica de Matemática, Universidad de Oviedo, 2004.
- Lee, S Y. «Review Bacterial polyhydroxyalkanoates.» *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996): 1-14.
- Marangoni, C, A Furigo, y G M Aragao. «Production of Poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding.» *Process Biochemistry*, nº 38 (2002): 137-141.
- Martinez, Guadalupe Alejandra, Ignacio Laborda, María Inés Maisonneuve, y Hermosinda Varela. *Poliéster bacteriano: Desarrollo del medio de cultivo*. Montevideo: Departamento de Bioingeniería-IIQ-Fac. Ingeniería-UdelaR, 2009.
- Mokhtari-Hosseini, Zhara, Ebrahim Vasheghani-Farahani, Ali Heidarzadeh-Vazifekhoran, S.Abbas Shojaosadati, Ramin Karimzadeh, y Kianoush Khosravi Darani. «Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotropic bacterium.» *Bioresource Technology*, nº 100 (2009): 2436-2443.
- Naranjo Vasco, Javier Mauricio. *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. Tesis, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, 2010.
- Rodrigues, Maria Isabel, y Antonio Francisco Iemma. *Planejamento de experimentos e Otimização de processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos*. Campinas: Casa do Pao , 2005.
- Teófilo, Reinaldo, y Marcia Ferreira. «Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.» *Quim. Nova* 29, nº 2 (2006): 338-350.
- Volova, Tatiana. *Polyhydroxyalkanoates Plastic Material of the 21st Century*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2004.

Capítulo 6

Evaluación de cultivo mixto

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	125
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	125
2.1. Microorganismo	125
2.2. Medios de cultivo.....	125
2.3. Evaluación del crecimiento de <i>M. extorquens</i> en medio de cultivo para <i>R. eutropha</i> . 126	
2.4. Evaluación del crecimiento de <i>R. eutropha</i> en medio de cultivo para <i>M. extorquens</i> . 126	
2.5. Estudio de la concentración inicial de inóculo para el cultivo mixto	126
2.6. Métodos analíticos.....	127
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	127
3.1. Evaluación del crecimiento de <i>M. extorquens</i> en medio de cultivo para <i>R. eutropha</i> . 127	
3.2. Evaluación del crecimiento de <i>R. eutropha</i> en medio de cultivo para <i>M. extorquens</i> . 127	
3.3. Estudio de la concentración inicial de inóculo para el cultivo mixto	127
4. CONCLUSIONES	128
Tabla 1. Estudio de concentración inicial de inóculo	126
Tabla 2. Estudio de inóculo inicial en cultivo mixto	127
Tabla 3. Composición final de microorganismos.....	128
Tabla 4. Comparación de cultivos mixto y puro	128

1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 4 se seleccionaron dos cepas capaces de producir PHA: *M. extorquens* y *R. eutropha*. En el capítulo 5 se determina que *R. eutropha* no consume metanol y que *M. extorquens* algunas condiciones (formulaciones de medio de cultivo Capítulo 5) consume metanol sin utilización de glicerol. Se decide entonces, ensayar diferentes condiciones de cultivo mixto para mejorar el aprovechamiento del sustrato y producción de biopolímero.

Dado que el crecimiento de *R. eutropha* se ve afectado por la presencia de metanol en el medio de cultivo (Cavalheiro, y otros 2009), el consumo selectivo de metanol por parte de *M. extorquens*, podría mejorar la productividad de crecimiento y producción en *R. eutropha*, obteniéndose biopolímero por acumulación simultánea de ambas cepas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo

Ralstonia eutropha DSM 545 y *M. extorquens* DSM 1340 provenientes del stock de trabajo descrito en el Capítulo 4.

2.2. Medios de cultivo.

Ralstonia eutropha

Se utilizó la composición del medio de cultivo optimizada para cultivo batch en la etapa anterior, compuesta por: 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H_2BO_4 , 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.6 g/L KH_2PO_4 , 10.0 g/L Na_2HPO_4 . Como fuente de carbono se utilizó una dilución del efluente modelo para llegar a una concentración de 18.3 % v/v de glicerol y 13.7% de metanol.

M. extorquens

Se utilizó el medio determinado en el Capítulo 5, en el cual no se consume glicerol, con consumo de metanol, experiencias número 9, 10 y 11 (réplicas del punto central) Tabla 18, Capítulo 5, si bien existen otras condiciones en las cuales no se consume glicerol (experiencias 4 y 7), se seleccionó esta condición por ser en la que se obtuvo mayor productividad volumétrica de PHA.

La concentración de la fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el medio de cultivo fue de 1.25 g/L y de fósforo: 5 g/L KH_2PO_4 y 1.1 g/L Na_2HPO_4 Como fuente de carbono se utilizó una dilución del efluente modelo para llegar a una concentración de 7.98 % v/v de glicerol y 6% de metanol. Se utilizó 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mg/L, H_3BO_3 0.2 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L.

El pH se ajusta a 7.0 con 5.0 N NaOH/ 5.0 N HCl. El medio de cultivo fue esterilizado durante 15 min a 121°C.

2.3. Evaluación del crecimiento de *M. extorquens* en medio de cultivo para *R. eutropha*.

Se realizaron cultivos sólidos (placa) y líquido (tubo de ensayo) para evaluar el crecimiento de *M. extorquens* en el medio de cultivo para *R. eutropha* determinado en el Capítulo 5 para producción en batch.

Para evaluar la posible influencia de la composición de la solución de metales traza, se realiza el mismo ensayo, sustituyendo la composición de la solución de metales traza del medio de cultivo de *M. extorquens*.

Los cultivos fueron incubados en estufa a 37°C hasta observar crecimiento. Los cultivos fueron evaluados mediante inspección visual.

2.4. Evaluación del crecimiento de *R. eutropha* en medio de cultivo para *M. extorquens*.

Se realizaron cultivos sólidos (placa) y líquido (tubo de ensayo) para evaluar el crecimiento de *R. eutropha* en medio de cultivo para *M. extorquens* determinado en el Capítulo 5, en cual no se observó consumo de glicerol y se utilizó todo el metanol del medio de cultivo.

Para evaluar la posible influencia de la composición de la solución de metales traza, se realiza el mismo ensayo, sustituyendo la composición de la solución de metales traza por la del medio de cultivo de *R. eutropha*.

2.5. Estudio de la concentración inicial de inóculo para el cultivo mixto

Con el medio seleccionado, se realizan ensayos en escala de matraz de 500 mL, conteniendo 50 mL del medio de cultivo. Se evalúan diferentes concentraciones iniciales de inóculo de ambas cepas (Tabla 1).

Tabla 1. Estudio de concentración inicial de inóculo

Experiencia	<i>M. extorquens</i> (g/L)	<i>R. eutropha</i> (g/L)
1	0.7	0.7
2	1.14	0.29
3	0.29	1.14

El tiempo de incubación fue de 96 horas en shaker orbital a 35°C y 200 rpm. Las experiencias se realizaron por duplicado.

2.6. Métodos analíticos

En los cultivos en matraces, la concentración de biomasa se determinó por gravimetría. SE determinaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) mediante técnica de microgota, se diferencian las colonias de ambas cepas por características morfológicas (*R. eutropha* colonia color crema y *M. extorquens* colonias rosadas). Para la determinación del glicerol, metanol y amonio residual, las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm a 4°C durante 15 min. Se determinó la concentración de metanol y glicerol en HPLC Shimadzu equipado con una columna Shodex sugar KS-801 (8 mm x 300 mm) a 55°C, utilizando agua MilliQ como eluyente a 0.7 mL/min. La concentración de PHA se determinó con kit enzimático (Boehringer Mannheim) (Anexo técnicas analíticas). En todos los cultivos (líquido y sólido) se realizaron seguimientos mediante tinción de frotis con violeta cristal y Negro Sudan y tinción de Gram.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación del crecimiento de *M. extorquens* en medio de cultivo para *R. eutropha*.

No se observó crecimiento de *M. extorquens* en cultivos sólidos y líquidos, con medio de cultivo formulado para *R. eutropha*. Al sustituir la solución de metales traza en la composición del medio de cultivo, tampoco se observó crecimiento.

3.2. Evaluación del crecimiento de *R. eutropha* en medio de cultivo para *M. extorquens*.

Se observó crecimiento y acumulación de PHB en *R. eutropha* en los dos medios de cultivo evaluados y se selecciona el medio de *M. extorquens* en el que hubo consumo total de metanol para utilizar en el cultivo mixto.

3.3. Estudio de la concentración inicial de inóculo para el cultivo mixto

En la Tabla 2 se presentan los resultados promedio (duplicado) obtenidos en los ensayos.

Tabla 2. Estudio de inóculo inicial en cultivo mixto

M extorquens inicial (g/L)	R eutropha inicial(g/L)	Biomasa final total (g/L)	Glicerol consumido (g/L) %	Metanol consumido (g/L) %	PHA (g/L)	Qp (g/Lh)	YP/X (g/g)
0.7	0.7	2.52	1.33 12	1.35 27	0.20	2.08 E-3	0.07
1.14	0.29	3.92	3.85 35	1.38 28	0.06	6.24E-4	0.02
0.29	1.14	3.85	3.79 34	1.01 20	0.24	2.50E-3	0.06

La mayor producción de biomasa se produjo en la experiencia 2 (mayor concentración inicial de *M. extorquens*), mientras que la máxima concentración de PHAs se obtuvo en la experiencia 3 (mayor concentración inicial de *R. eutropha*).

En la Tabla 3, se presenta la composición final de microorganismos (UFC/mL) en las tres experiencias.

Tabla 3. Composición final de microorganismos.

Experiencia	<i>R. eutropha</i> (UFC/mL)	<i>M. extorquens</i> (UFC/mL)
1	8.3 E9	1.6E9
2	1.3 E10	1.6E9
3	1.4 E10	1.2E9

En todas las experiencias se verifica el crecimiento de ambas de cepas. La concentración final de *M. extorquens* fue similar en todas las experiencias, al igual que el consumo de metanol. En todos los casos la concentración de *R. eutropha* superó a la de *M. extorquens*. La mayor producción de PHAs se produjo en la experiencia con mayor concentración final de *R. eutropha* (experiencia 3).

Se comparan en la Tabla 4 la biomasa total obtenida, el rendimiento de PHA en función de la biomasa y la productividad volumétrica de generación de PHA de los cultivos mixtos con los cultivos puros de *R. eutropha* y *M. extorquens*, evaluados en el Capítulo 5.

Tabla 4. Comparación de cultivos mixto y puro

Cultivo	Biomasa (g/L)	Y P/X (g/g)	QP (g/Lh)
Mixto 1	2.52	0.07	2.08E-3
Mixto 2	3.92	0.02	6.24E-4
Mixto 3	3.85	0.06	2.50E-3
<i>R. eutropha</i>	4.0	0.55	0.02
<i>M. extorquens</i>	1.4	0.61	5E-3

Si bien la biomasa total obtenida en el cultivo mixto, es del orden de la obtenida en el cultivo puro de *R. eutropha* (experiencias 2 y 3), el porcentaje de acumulación y la productividad son inferiores a los obtenidos en los cultivos puros y en particular, con el cultivo de *R. eutropha* (pese a que esta cepa no consume metanol). Por estos motivos, se decide continuar el trabajo con *R. eutropha*.

4. CONCLUSIONES

La producción de PHA obtenida en el cultivo mixto es menor a la obtenida en los cultivos puros de *R. eutropha* y *M. extorquens*, se continua el trabajo con *R. eutropha* por ser la cepa con la cual se obtiene mayor productividad volumétrica de producción de PHAs.

5. BIBLIOGRAFÍA

Cavalheiro, J.M B.T, .C M.D De Almeida, C. Grandfils, y M.m R. Da Fonseca. «Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupravidus necator* using waste glycerol.» *Process Biochemistry* 44 (2009): 509-515.

Capítulo 7

Optimización de la producción

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	134
2. INTRODUCCIÓN.....	134
2.1. Modelado Matemático de Bioreactores.....	135
2.2. Cinética microbiana.....	135
2.2.1. Modelos de cinética microbiana.....	136
2.3. Modelado y Optimización de sistemas dinámicos.....	137
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	138
3.1. Microorganismo.....	138
3.2. Fermentación.....	138
3.3. Modelado de parámetros.....	139
3.3.1. Estudio de inhibición por metanol.....	139
3.3.2. Simulación de producción en batch de uso de glicerol crudo y glicerol sin metanol.	139
3.3.3. Simulación de producción en fed batch de uso del glicerol crudo y glicerol sin metanol.	140
3.4. Métodos analíticos.....	140
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	140
4.1. Cinética del crecimiento en batch.....	140
4.2. Modelo Matemático.....	141
4.2.1. Modelos para crecimiento con un sustrato limitante.....	142
4.2.1.1. Monod.....	142
4.2.1.2. Moser.....	142
4.2.1.3. Tessier.....	142
4.2.2. Modelos para crecimiento con un sustrato limitante e inhibición por sustrato.	142
4.2.2.1. Andrews modificado.....	142
4.2.2.2. Aiba.....	143
4.2.3. Modelo para crecimiento con doble limitación por fuente de carbono y fuente de nitrógeno.....	143
4.2.3.1. Mulchandani.....	143
4.2.3.2. Khanna <i>et al.</i>	143
4.2.3.3. Khanna, <i>et al.</i> (con inhibición).....	143
4.3. Resultados del modelado matemático.....	143
4.4. Estudio de inhibición por metanol.....	148

4.5. Simulación y comparación de producción en batch de uso de glicerol crudo y glicerol sin metanol como fuente de carbono.....	148
4.6. Simulación y comparación de producción en fedbatch del uso de glicerol crudo y glicerol sin metanol como fuente de carbono.	149
4.6.1. Modelo matemático.....	149
4.6.2. Diseño de simulación	151
4.6.3. Resultados de la optimización de la producción de PHA en modalidad fed-batch utilizando glicerol como fuente de carbono (sin metanol).....	152
4.6.4. Resultados de la optimización de la producción de PHA en modalidad fed-batch utilizando glicerol como fuente de carbono (sin metanol).....	154
4.7. Comparación de sistemas batch y fedbatch.	156
5. CONCLUSIONES.....	157
6. BIBLIOGRAFÍA.....	158

Figura 1. Monod.....	145
Figura 2. Moser	146
Figura 3. Andrews	146
Figura 4. Khanna	147
Figura 5. Khanna con inhibición	147
Figura 6. Simulación de producción en modalidad batch utilizando glicerol crudo y glicerol como fuente de carbono	149
Figura 7. Superficie de respuesta QP <i>R.eutropha</i> en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono.	153
Figura 8. Perfiles de predicción <i>R.eutropha</i> en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono....	154
Figura 9. Superficie de respuesta <i>R. eutropha</i> en modalidad fedbatch utilizando glicerol crudo como fuente de carbono.....	155
Figura 10. Perfiles de predicción para <i>R. eutropha</i> en modalidad fedbatch utilizando glicerol crudo como fuente de carbono.....	156

Tabla 1. Resultados fermentación batch <i>R.eutropha</i> DSM 545.....	140
Tabla 2. Parámetros modelados	144
Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento en <i>R. eutropha</i> con diferentes concentraciones de metanol	148
Tabla 4. Comparación de producción batch utilizando glicerol con y sin metanol	149
Tabla 5. Niveles codificados utilizados en la simulación con glicerol	151
Tabla 6. Niveles codificados utilizados en la simulación con glicerol crudo.....	151
Tabla 7. Diseño de optimización de producción en modalidad Fed-batch.....	152
Tabla 8.Niveles optimizados para la producción de PHA utilizando glicerol como fuente de carbono	154
Tabla 9. Niveles optimizados para la producción fedbatch de PHA en <i>R. eutropha</i> utilizando glicerol crudo como fuente de carbono.....	156
Tabla 10. Comparación modalidad batch y fedbatch.....	156

Figura 1. Monod.....	145
Figura 2. Moser	146
Figura 3. Andrews	146
Figura 4. Khanna	147

Figura 5. Khanna con inhibición 147
Figura 6. Simulación de producción en modalidad batch utilizando glicerol crudo y glicerol como fuente de carbono 149
Figura 7. Superficie de respuesta QP *R.eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono. 153
Figura 8. Perfiles de predicción *R.eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono.... 154
Figura 9. Superficie de respuesta *R. eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol crudo como fuente de carbono 155
Figura 10. Perfiles de predicción para *R. eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol crudo como fuente de carbono 156

1. OBJETIVO

Modelado, simulación y optimización de las condiciones y modalidad de producción de PHAs a partir de *R. eutropha* utilizando glicerol crudo como sustrato.

2. INTRODUCCIÓN

El principio fundamental de la producción de un producto de interés en biorreactores es aprovechar la ruta metabólica del microorganismo para producirlo. Para esto, el microorganismo es cultivado en el biorreactor en donde se deben encontrar todos los nutrientes esenciales para su crecimiento y expresión del producto de interés. Deben asegurarse las condiciones adecuadas de temperatura, presión, pH y en algunos casos el suministro adecuado de oxígeno.

Existen diferentes modos de operación de biorreactores: cultivo discontinuo, semicontinuo y continuo

El cultivo por lotes, batch o discontinuo es una modalidad de fermentación por el cual el medio de cultivo esterilizado en el fermentador, es inoculado con microorganismos, y los mismos crecen en las condiciones fisico-químicas adecuadas para el proceso. Las únicas entradas y salidas del sistema son los gases (aire, CO₂, etc) y si es necesario, se agrega antiespumante y ácido o base para control del pH. Al terminar la fermentación se descarga el medio fermentado y se realizan los tratamientos finales. El fermentador se lava, esteriliza y se carga para el siguiente lote o tachada. Se considera que el volumen de medio en el fermentador permanece constante y no deberían ser significativas las variaciones de volumen por el agregado de sustancias o la toma de muestras. En el biorreactor batch, las células crecen y utilizan los nutrientes, la composición del medio de cultivo va cambiando con el tiempo, lo que puede alterar las reacciones químicas que ocurren en las células, la operación del biorreactor es un sistema interactuante entre el medio intra y extracelular (Bailey y Ollis, 1996). Las reacciones ocurren de manera simultánea pero son reguladas por controles celulares internos. Estos controles habilitan a la célula a modificar las velocidades de las reacciones de su ruta metabólica y sus capacidades de producción dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales presentes en el medio.

Los procesos discontinuos pueden generar bajos rendimientos cuando el sustrato en altas concentraciones (a tiempo inicial), inhibe, reprime o desvía el metabolismo celular a productos que no interesan. (Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdeLaR 2009)

En el cultivo semicontinuo uno o más nutrientes se adicionan durante la operación al fermentador, mientras que los productos permanecen hasta el final. El flujo de alimentación del medio de cultivo, puede variar con el tiempo y su adición puede ser de forma continua o intermitente. Con esta forma de operación es posible controlar la concentración del sustrato en el fermentador de forma de favorecer una determinada vía metabólica, provocando la acumulación de un determinado producto. A pesar de que la masa celular en el fermentador

umenta, la concentración de microorganismo puede descender debido a la adición de medio. (Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdelaR 2009)

El cultivo continuo se caracteriza por poseer una alimentación continua y constante de medio de cultivo y el volumen en el reactor se mantiene invariable al retirarse continuamente cultivo. Las células se mantienen en un mismo estado fisiológico lo que posibilita estudios de regulación metabólica u optimización del medio de cultivo. Es posible asociar este proceso de producción con otras operaciones continuas en la línea de producción (upstream y downstream). Es ampliamente utilizado en la producción de productos asociados al crecimiento. (Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdelaR 2009)

2.1. Modelado Matemático de Bioreactores

El modelado matemático de la operación de un bioreactor pretende mediante una representación matemática, interpretar las relaciones entre entradas, estados y salidas del sistema bajo estudio (Soni 2000) (Velez 2005) (Oberkampff, y otros 2002). Luego de obtenido el modelo que representa el sistema en estudio, es posible predecir su comportamiento frente a variaciones en los factores que afectan al sistema, minimizando así el número de experiencias a realizar y los costos asociados.

Para modelar un biorreactor se deben estudiar:

- (i) Los procesos físico-químicos en el biorreactor.
- (ii) La cinética microbiana, también conocida como modelo biológico.

De los procesos fisicoquímicos se estudian los aspectos de la transferencia de masa (nutrientes, oxígeno, dióxido de carbono, etc.), los patrones de flujo tanto en la fase líquida como gaseosa y la transferencia de calor. En los modelos biológicos se estudia la cinética de las células tanto a nivel individual como de toda la población celular. (Velez 2005).

2.2. Cinética microbiana

La cinética microbiana refleja los aspectos relacionados con la velocidad a la cual ocurren las diversas etapas del metabolismo microbiano durante el desarrollo del cultivo,

El conocimiento de dicha cinética es una herramienta importante en biotecnología, ya que permite relacionar la velocidad de crecimiento microbiano con la población de microorganismos, concentración de sustrato u otros productos de interés en un instante dado.

En general, para describir la cinética microbiana se utilizan modelos matemáticos que permiten predecir en un cultivo, la cantidad de sustrato o compuesto químico remanente luego de cierto tiempo, calcular el tiempo requerido para alcanzar cierta concentración de compuestos de interés, así como la cantidad de microorganismos o producto formado luego de cierto intervalo de tiempo (Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdelaR 2009).

Existen varias formas de clasificación de la cinética de producción en los procesos fermentativos. Una de ellas es la *clasificación de Gaden*: es una clasificación clásica que

relaciona la cinética de crecimiento celular con la cinética de formación de productos y la biomasa presente en procesos discontinuos (batch). La relación cinética entre crecimiento y formación de producto depende del papel del producto en el metabolismo microbiano. Se distinguen así tres clases de fermentaciones (Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdelAR 2009) (Velez 2005):

a. Fermentaciones tipo I: Formación de producto asociada al crecimiento. Los productos se forman durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo (metabolitos primarios).

b. Fermentaciones tipo II ó mixtas: Los productos se forman a partir de la mitad de la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria del cultivo

c. Fermentaciones tipo III: Formación de producto no asociado al crecimiento. Los productos se forman durante la fase estacionaria del cultivo (metabolitos secundarios, no esenciales para el crecimiento celular).

2.2.1. Modelos de cinética microbiana

Los modelos de cinética microbiana permiten predecir el comportamiento del cultivo y simular el efecto de variar las condiciones de operación dentro de su rango de validez. La formulación de un modelo puede ser experimental, teórica o mixta. Los modelos pueden ser segregados o no segregados y estructurados o no estructurados.

Cuando la población es *segregada* en células individuales que son diferentes unas de otras (en términos de algunas características distinguibles), el modelo es *segregado*. Los modelos no-segregados consideran la población como un todo (caja negra) en una "biofase" la cual interactúa con el ambiente externo, y puede verse como una especie en solución; la concentración celular puede ser descrita con una sola variable. Los modelos *no segregados* tiene la ventaja que ellos son matemáticamente simples.

Los modelos *estructurados* consideran las reacciones individuales o grupos de reacciones ocurrentes en la célula. La biomasa es subdividida dentro de un número de componentes como DNA, RNA proteínas, etc., y las reacciones que ocurren entre esos componentes son descritas. El ambiente externo puede influenciar la respuesta de la célula en una variedad de modos. Los modelos *no estructurados* simplemente ven la célula como una entidad en una solución la cual interactúa con el ambiente.

Los modelos más simples idealizan a la población celular como:

- No estructurada
- No segregada

Los modelos no estructurados y no segregados, representan el comportamiento promedio de las poblaciones de células a través de la cuantificación de propiedades del cultivo, tales como X , S , P , μ , q_s , q_p .

Uno de los modelos más utilizados es el modelo de *Monod*, el cual establece una relación funcional entre μ , el número de microorganismos y la concentración de un único nutriente

esencial “limitante” en el medio de cultivo (por ejemplo fuente de carbono, nitrógeno, fósforo u otro nutriente necesario para el crecimiento). Es un modelo sencillo de dos parámetros: $\mu_{m\acute{a}x}$ (velocidad específica de crecimiento máxima) y K_s (constante media de saturación). Se aplica básicamente para el cultivo de microorganismos que crecen formando células aisladas (separadas) sobre un sustrato simple y cuando no hay inhibidores del crecimiento. Es un modelo relativamente flexible, que ha mostrado predecir adecuadamente el crecimiento de cultivos que no cumplen totalmente los requisitos anteriores (células separadas, sustrato simple, sin inhibición). (Departamento de Bioingeniería - IIQ - Udelar 2009)

Si bien el modelo de Monod se basa en las isotermas de adsorción de Langmuir y en la cinética enzimática de Michaelis & Menten, es un modelo de base esencialmente empírica. (Departamento de Bioingeniería - IIQ - Udelar 2009)

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S}$$

Existen variaciones al modelo de Monod como son Teissier, Contois, Blackam, Tsao y Hansen, etc. (Nielsen y Villadsen, 1994; Bailey y Ollis, 1996). Estos modelos difieren en su dependencia al sustrato y algunos incluyen términos que tienen en cuenta la saturación (inhibición) debido a grandes concentraciones de sustrato e inhibición debido a producto o alguna otra sustancia (Soni 2000) (Velez 2005)

2.3. Modelado y Optimización de sistemas dinámicos.

La optimización puede definirse como: Dado un sistema o un proceso, encontrar la mejor solución a este proceso teniendo en cuenta las restricciones del sistema (Bielger, et al., 1997). Para llevar a cabo una optimización se requiere identificar las variables de decisión, fijar las restricciones, definir los objetivos y analizar la información disponible. Los problemas de optimización pueden ser clasificados, independientemente del método de solución, en continuos o discretos según el tipo de variables manejadas. Los problemas de optimización con variables continuas se clasifican en dos grupos: programación lineal y programación no lineal. Los de variables discretas se clasifican en programación lineal de enteros mezclados y programación no lineal de enteros mezclados. (Biegler, L., Grossmann, I. 2004). Como caso aparte, se han llamado problemas de optimización dinámica a los relacionados con los procesos variables en el tiempo, modelados usando ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento dinámico del sistema como balances de materia y de energía, y ecuaciones que aseguren relaciones físicas y termodinámicas (Biegler, L., Grossmann, I. 2004).

En los problemas de optimización de sistemas dinámicos se desea optimizar una función objetivo $J(u(t),x(t))$ que es función de variables de decisión $u(t)$ y de las variables de estado $x(t)$ del proceso, que a su vez evolucionan en el tiempo. Las restricciones de un problema de optimización dinámica incluyen las ecuaciones diferenciales del modelo junto a otras como los límites inferior y superior de las variables de decisión, u otras particulares de cada problema.

Cuando las variables de decisión son de tipo real, los problemas resultantes se denominan de programación no-lineal dinámica. Un problema general de este tipo con restricciones de igualdad y desigualdad se formula habitualmente del siguiente modo:

$$\begin{aligned}
 &\text{minimizar } J(\mathbf{u}, \mathbf{x}) \\
 &\text{respecto a } \mathbf{u} \\
 &\text{sujeto a:} \\
 &\quad g_m(\mathbf{x}, \mathbf{u}) \geq 0 \quad m = 1, 2, \dots, m \\
 &\quad h_k(\mathbf{x}, \mathbf{u}) = 0 \quad k = 1, 2, \dots, k \\
 &\quad \mathbf{u}_{inferior} \leq \mathbf{u} \leq \mathbf{u}_{superior} \\
 &\quad \frac{d\mathbf{x}(t)}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), t) \\
 &\quad \hat{\mathbf{y}}(t) = \mathbf{g}(\mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), t)
 \end{aligned}$$

donde $\mathbf{x}(t)$ son los estados del sistema, $\hat{\mathbf{y}}(t)$ son las predicciones del modelo para las respuestas medibles del sistema y $\mathbf{u}(t)$ es un vector de variables de decisión que puede variar en función del tipo de problema considerado. (Velez 2005)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismo

Ralstonia eutropha DSM 545, se utiliza el stock de trabajo generado, descrito en el Capítulo 4. La cepa fue mantenida en tubos inclinados de agar nutriente con glicerol (1 %) a 4 °C hasta ser utilizados.

3.2. Fermentación

Los datos experimentales utilizados para la simulación fueron tomados de experiencias en reactor de laboratorio operado en modalidad batch. El inóculo se preparó en Erlenmayer de 1 L conteniendo 200 mL de medio de cultivo, en shaker orbital durante 24 h a 200 rpm y 35°C.

Las experiencias se realizaron en fermentador Sartorius Stedim Biotech. BIostat® A Plus a 35°C y pH 7, conteniendo 2 L de medio de cultivo. La concentración del inóculo fue la necesaria para obtener aproximadamente 0.2 g/L de biomasa al comienzo de la fermentación. Se tomaron muestras a intervalos irregulares para determinación de: biomasa, glicerol, metanol, PHB y sulfato de amonio. El oxígeno disuelto en el medio se mantuvo constante a 30% de saturación, mediante regulación automática de la agitación, la aireación se mantuvo constante a 1 vvm.

Se utilizó la composición del medio de cultivo optimizada para cultivo batch en Capítulo 5, compuesta por: 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O; 1.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L CaCl₂·2H₂O y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H₂BO₄, 0.2 g/L CaCl₂·6H₂O, 0.1 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.03 g/L NaMoO₄·2H₂O, 0.2 g/L NiCl₂·2H₂O, 0.01 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.03 g/L MnCl₂·6H₂O, 0.6 g/L KH₂PO₄, 10.0 g/L Na₂HPO₄.

Como fuente de carbono se utilizó una dilución del subproducto modelo para llegar a una concentración de 18.3 % v/v de glicerol y 13.7% de metanol.

El pH se ajusta a 7.0 con 5.0 N NaOH/ 5.0 N HCl. El medio de cultivo fue esterilizado durante 15 min a 121°C. El metanol se esterilizó mediante filtración (0.2 μm).

3.3. Modelado de parámetros

Para determinar los parámetros de los modelos cinéticos propuestos, se tomaron los valores promedio de concentración de biomasa, PHB, glicerol y sulfato de amonio, obtenidas en las fermentaciones descritas anteriormente. Los parámetros fueron determinados mediante una regresión no lineal, que minimiza las diferencias entre las predicciones del modelo y los datos experimentales. El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió utilizando un programa basado en el método de Runge Kutta de cuarto orden. El sistema multivariado se resuelve de forma iterativa, minimizando la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor predicho por el modelo y los datos experimentales (Cutlip y Shacham 2008). El programa de cálculo se realizó en Matlab (Anexo Capítulo 7). Luego de obtenido todos los parámetros del proceso es posible realizar simulaciones para diferentes condiciones de operación.

3.3.1. Estudio de inhibición por metanol

Se realizaron ensayos en escala de matraces de 1 L conteniendo 200 mL de medio de cultivo por triplicado. Los matraces se incubaron en shaker orbital durante 48 h a 200 rpm y 35°C. El medio de cultivo se compone de: 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H_2BO_4 , 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.6 g/L KH_2PO_4 , 10.0 g/L Na_2HPO_4 . Como fuente de carbono se utilizó una concentración de 1,83 % v/v de glicerol y se ensayaron 3 concentraciones de metanol 0, 1, 3 y 4 % v/v.

El pH se ajustó a 7.0 con 5.0 N NaOH/ 5.0 N HCl. El medio de cultivo se esterilizó durante 15 min a 121°C en soluciones separadas de fuente de carbono, fuente fósforo y fuente de nitrógeno y sales. El metanol se esterilizó mediante filtración con jeringa con filtro de 0.2 μm .

El inóculo se preparó en Erlenmeyers de 1 L conteniendo 200 mL del medio descrito anteriormente, en shaker orbital durante 24 h a 200 rpm y 35°C.

3.3.2. Simulación de producción en batch de uso de glicerol crudo y glicerol sin metanol.

A partir de las cinéticas encontradas, se resuelven las ecuaciones diferenciales (balances de masa) en modalidad batch, para comparar la producción de PHA en un medio de cultivo con y sin metanol. El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió utilizando en Matlab una función basada en el método de Runge Kutta de cuarto orden.

3.3.3. Simulación de producción en fed batch de uso del glicerol crudo y glicerol sin metanol.

A partir de las cinéticas encontradas, se resuelven las ecuaciones diferenciales (balances de masa) en modalidad fed-batch, para comparar la producción de PHA en un medio de cultivo con y sin metanol (modelado como subproducto de biodiesel con recuperación de metanol). El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió utilizando en Matlab una función basada en el método de Runge Kutta de cuarto orden. Se realizan simulaciones en Matlab y optimización de la productividad volumétrica de producción de PHAs utilizando metodología de superficie de respuesta. Los factores a evaluar son: Concentración de fuente de carbono y nitrógeno (por su incidencia en la producción de PHA) en la alimentación y caudal de entrada al reactor, para una fermentación de 48 horas. Como condiciones iniciales dentro del reactor, se utiliza una composición del medio de cultivo hallada en la optimización realizada en el capítulo anterior con una concentración inicial de 0.5 g/L de biomasa y un volumen de medio de cultivo de 0.5 L.

3.4. Métodos analíticos

La densidad óptica de la suspensión del cultivo se determinó a 600 nm en espectrofotómetro UNICAM UV/VIS. Para la determinación del glicerol, metanol y amonio residual, las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm a 4°C durante 15 min. Se determinó la concentración metanol y glicerol en HPLC Shimadzu equipado con una columna Shodex sugar KS-801 (8 mm x 300 mm) a 55°C, utilizando agua MilliQ como eluente a 0.7 mL/min. La concentración de PHA se determinó con kit enzimático (Boehringer Mannheim). La concentración de amonio residual se determinó con electrodo de amonio ORION. Se verificó el exceso de fuente fósforo mediante tiras QuantoFix (Anexo técnicas analíticas).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cinética del crecimiento en batch

En la siguiente tabla se presentan los resultados promedio obtenidos en dos réplicas.

Tabla 1. Resultados fermentación batch *R.eutropha* DSM 545

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	Glicerol (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)
0	0,2	0	26,45	1,71
7,5	0,4	0	25,47	0,92
12	0,5	0	21,50	0,58
18	1,2	0	19,28	0,67
24	2,6	0	18,28	0,39
32	8,6	0,52	13,00	0,37
38	12,8	1,00	8,42	0,30
43	16,5	1,35	7,74	0,20
48	19,5	1,42	6,39	0,08
56	19,6	2,44	4,68	0
60	19,2	3,35	0,27	0

En 60 horas de fermentación se produjeron 19 g/L de biomasa. En este período, se consumieron 1.7 g/L de fuente de nitrógeno y se metabolizaron 26.2 g/L de glicerol, manteniéndose el metanol presente en el medio, constante. La síntesis de PHB, producto de interés, comenzó a las 32 horas y llegó a una concentración final de 3.3 g/L. Se mantuvo un exceso de fuente de fósforo durante toda la corrida. El metanol presente en el medio de cultivo no fue consumido. Se determina que el nutriente limitante es la fuente de nitrógeno, que se agota luego de 48 horas de fermentación.

4.2. Modelo Matemático

El crecimiento del microorganismo y la acumulación de PHA, se describe en términos de biomasa producida, PHA acumulado, sulfato de amonio consumido y glicerol consumido.

La concentración de biomasa total (g/L) consiste de dos partes: PHA (P) y biomasa residual (R), en donde R se calcula como la diferencia entre la biomasa total y PHA. R es la fracción de la biomasa total catalíticamente activa, e incluye proteínas y ácidos nucleicos.

La síntesis de R se describe como:

$$\frac{dR}{dt} = \mu R$$

En donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

El producto PHA (P [g/L]) se produce y acumula principalmente en fase estacionaria (verificado en experiencias anteriores), por lo que la cinética de producción se modela únicamente con un término de producción no asociado al crecimiento (β [g/g.h]).

$$\frac{dP}{dt} = \beta \times R$$

El consumo de glicerol (S_1) se derivó en crecimiento celular y formación de producto. Basado en experiencias previas se desprecia el término mantenimiento celular.

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{GS1}} \times R - \frac{\beta}{Y_{P/S1}} \times R$$

Siendo Y_{GS1} , el rendimiento de biomasa activa (R) basado en el consumo de glicerol utilizado para crecimiento y Y_{PS1} , el rendimiento de PHB basado en glicerol utilizado para la formación de producto. Se desprecia el término de mantenimiento celular.

La fuente de nitrógeno (S_2) es consumida para la formación de biomasa activa (R), y mantenimiento celular.

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{R/S_2}} \times R$$

Siendo Y_{R/S_2} , el rendimiento de biomasa activa basado en consumo total de fuente de nitrógeno.

Se plantean las siguientes cinéticas para modelar el crecimiento celular.

4.2.1. Modelos para crecimiento con un sustrato limitante

El sustrato limitante del sistema fue la fuente de amonio y fue considerada en el planteo de las cinéticas.

4.2.1.1. Monod

$$\mu = b_1 \frac{S_2}{S_2 + b_2}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}) y b_2 (g/L) constante de saturación.

4.2.1.2. Moser

$$\mu = b_1 \frac{S_2^{b_2}}{S_2^{b_2} + b_3}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 : constante adimensional y b_3 (g/L) constante de saturación.

4.2.1.3. Tessier

$$\mu = b_1 \left(1 - e^{-\frac{S_2}{b_2}} \times S_2 \right)$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 : constante adimensional.

4.2.2. Modelos para crecimiento con un sustrato limitante e inhibición por sustrato.

4.2.2.1. Andrews modificado

$$\mu = \frac{b_1}{\left(\frac{1 + b_2}{S_2} \right) \times \left(\frac{1 + S_2}{b_3} \right)}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 (g/L): constante del sustrato limitante y b_3 (g/L) constante de inhibición.

4.2.2.2. Aiba

$$\mu = b_1 \times \left(\frac{S_2}{b_2 + S_2} \right) \times e^{-\frac{S_2}{b_3}}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 (g/L) constante de saturación y b_3 (g/L) constante de inhibición.

4.2.3. Modelo para crecimiento con doble limitación por fuente de carbono y fuente de nitrógeno.

4.2.3.1. Mulchandani

$$\mu = b_1 \times \frac{\frac{S_2}{S_1}}{\frac{S_2}{S_1} + b_2} \left[1 - \left[\frac{\frac{S_2}{S_1}}{b_3} \right]^{b_4} \right]$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 (g/L) constante de saturación, b_3 cociente entre las concentraciones de glicerol y sulfato de amonio en la que la velocidad específica de crecimiento es cero y b_4 constante adimensional.

4.2.3.2. Khanna et al.

$$\mu = b_1 \left(\frac{S_1^{b_2}}{S_1^{b_2} + b_3 b_2} \right) * \left(\frac{S_2^{b_4}}{S_2^{b_4} + b_5 b_4} \right)$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_3 (g/L) y b_5 : constantes de saturación de glicerol y sulfato de amonio respectivamente; b_2 y b_4 constantes adimensionales.

4.2.3.3. Khanna, et al. (con inhibición)

$$\mu = b_1 \left(\frac{S_1^{b_2}}{S_1^{b_2} + b_3 b_2} \right) * \left(\frac{S_2^{b_4}}{S_2^{b_4} + b_5 b_4} \right) * \left(1 - \left(\frac{S_1}{b_7} \right)^{b_6} \right) * \left(1 - \left(\frac{S_2}{b_9} \right)^{b_8} \right)$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_3 (g/L) y b_5 : constantes de saturación de glicerol y sulfato de amonio; b_2 , b_4 , b_6 y b_8 constantes adimensionales; b_7 (g/L) y b_9 (g/L) representan la concentración mínima de fuente de carbono y fuente de nitrógeno respectivamente para que ocurra inhibición.

4.3. Resultados del modelado matemático

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada una de las cinéticas planteadas.

Tabla 2. Parámetros modelados

	Monod	Moser	Andrews	Khanna	Khanna c/inhibición.
β	0.004	0.005	0.002	0.006	0.007
Y_{GS1}	1.01	0.88	0.98	0.83	0.83
Y_{PS1}	0.34	1.99	0.17	12.5	6.3
Y_{RS1}	14.29	16.75	14.56	14.03	14.02
b_1	0.13	0.13	1.29	0.63	0.62
b_2	0.07	3.24	5.69	1.39	1.38
b_3		0.07	1.65	61.04	61.55
b_4				0.56	0.58
b_5				0.0063	0.0053
b_6					11.82
b_7					144.19
b_8					2.3
b_9					17.9
r^2	0.9320	0.9771	0.9704	0.9745	0.9747
Sumsqr	76.52	51	64.9	31	32.9

Las cinéticas de Tessier y Mulchandani no se ajustaron a los datos experimentales y no se presentan en la Tabla 2.

Para cada modelo se presenta el coeficiente de correlación (r^2) y la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor predicho por el modelo y los datos experimentales (SumSqr). El coeficiente r^2 suele utilizarse para juzgar si un modelo representa un conjunto de datos. Sin embargo no es condición suficiente obtener r^2 cercano a 1 para asegurar la representatividad del modelo. Por ello, para evaluar los modelos se toma en cuenta, además, la distribución de los residuos (Anexo Capítulo 7) y el valor obtenido Sumsqr de la regresión. Teniendo en cuenta estos elementos se obtiene que el modelo que mejor representa los datos experimentales es el modelo de Khanna (limitación dual) sin inhibición. En las Figuras 1-5 se presentan las gráficas correspondientes al modelo ajustado para cada cinética y los valores experimentales obtenidos. (Punteado datos experimentales y línea continua modelo ajustado)

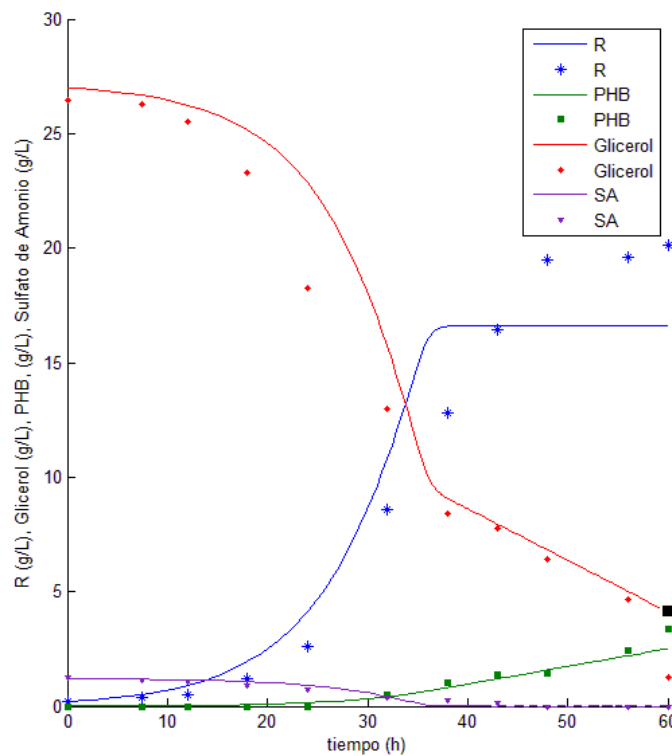


Figura 1. Monod

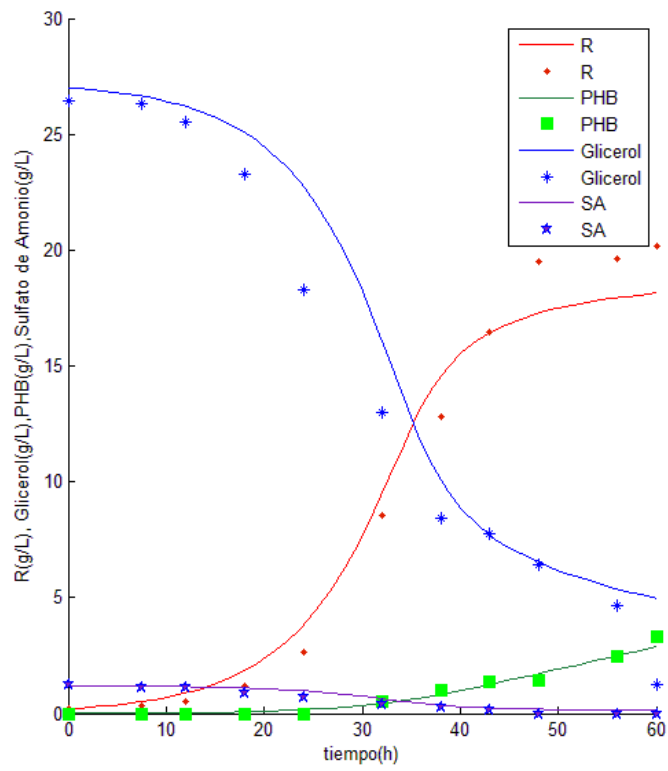


Figura 2. Moser

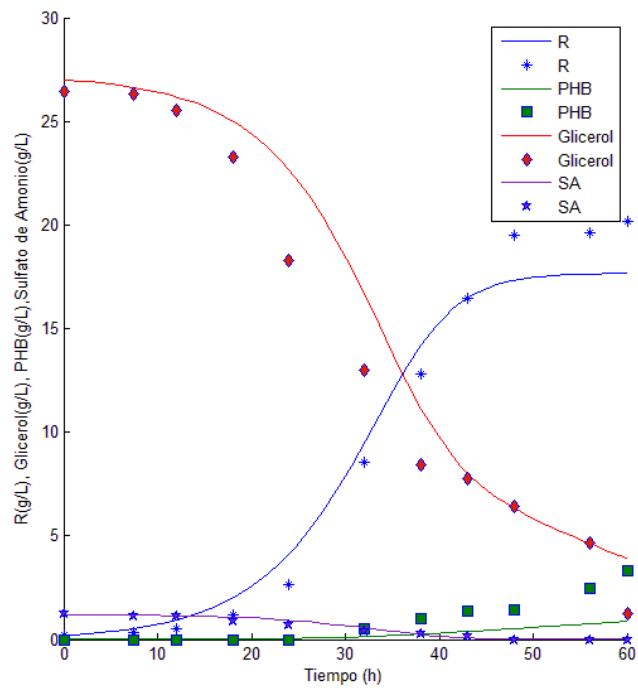


Figura 3. Andrews

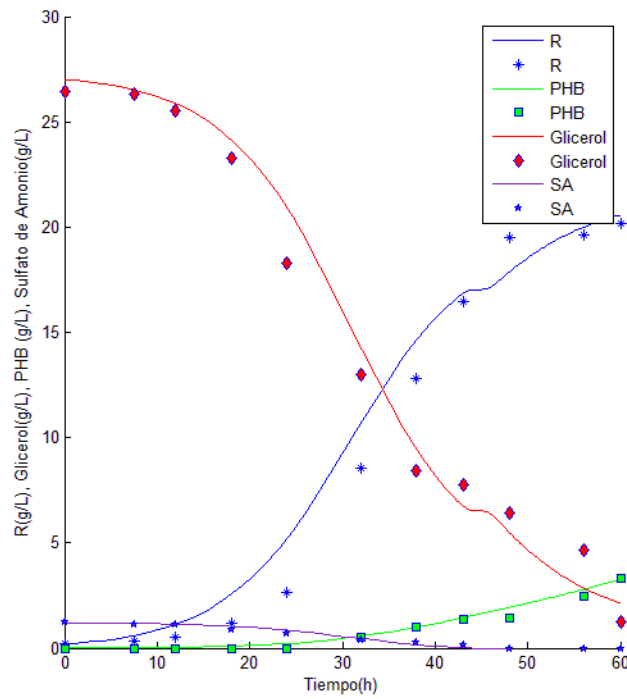


Figura 4. Khanna

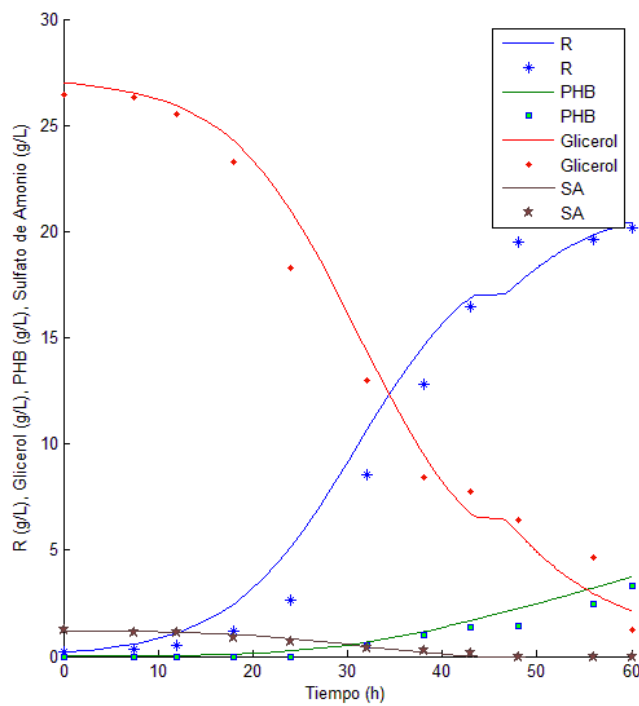


Figura 5. Khanna con inhibición

La limitación de crecimiento dual (por dos nutrientes, modelo de Khanna) se detecta en microorganismos que muestran variación en los rendimientos de biomasa bajo diferentes

limitaciones de nutrientes heterólogos (no interactúan entre sí, como la fuente carbono y fuente de nitrógeno). Esta variación es causada, en *R. eutropha* por cambios fisiológicos debido a la acumulación del compuesto de reserva PHA. La acumulación y reserva de PHA responde a la deficiencia de un nutriente en el medio, en este caso la fuente de nitrógeno, que detiene el crecimiento exponencial. El exceso de carbono remanente se almacena como compuesto de reserva (PHA) predominantemente en la fase estacionaria de crecimiento. La relación entre fuente de carbono y fuente de nitrógeno en el medio, determina, en concordancia con el modelo matemático descrito (Khanna y Srivastava 2006), si el flujo de carbono se destina a producir biomasa o PHA.

4.4. Estudio de inhibición por metanol

Se calcularon para cada cultivo de *R. eutropha* a diferentes concentraciones de metanol, la velocidad específica de crecimiento máxima. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento en *R. eutropha* con diferentes concentraciones de metanol

% v/v Metanol	$\mu_{m\acute{a}x}$
0	0.050
1	0.045
3	0.026
4	0

Se determinó un modelo para ajustar la cinética de inhibición que se presenta a continuación:

$$\mu_{m\acute{a}x} = 0.05[1 - 0.024 \times M]$$

Siendo M: Concentración de Metanol expresado en g/L.

Incluyendo la cinética de inhibición por metanol, en la cinética de Khanna obtenida en el punto anterior, se obtiene la siguiente expresión:

$$\mu = 0.85 \times (1 - 0.024 \times M) \times \left[\frac{S_1^{1.39}}{S_1^{1.39} + 61^{1.39}} \right] \times \left[\frac{S_2^{0.56}}{S_2^{0.56} + 0.0063^{0.56}} \right]$$

4.5. Simulación y comparación de producción en batch de uso de glicerol crudo y glicerol sin metanol como fuente de carbono.

Con la cinética hallada se simula la producción de PHA en fermentación batch a partir de diferentes concentraciones de metanol en el medio de cultivo, comenzando por la concentración del glicerol crudo y terminando con concentración de metanol cero al inicio del cultivo (Figura 6). Los resultados se presentan a continuación.

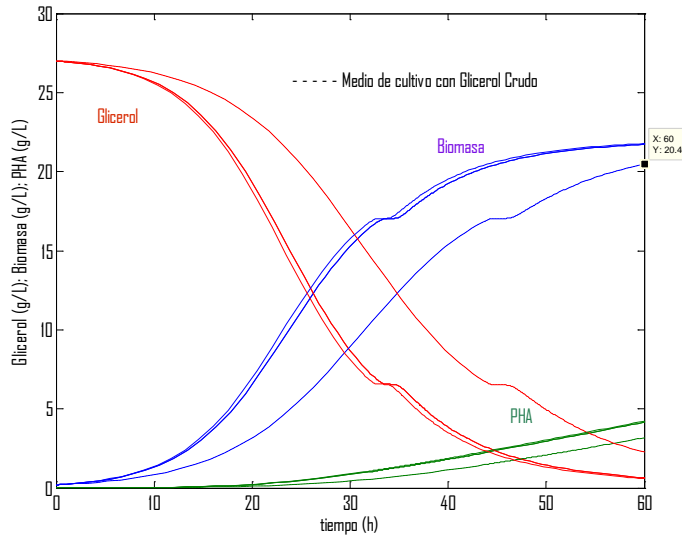


Figura 6. Simulación de producción en modalidad batch utilizando glicerol crudo y glicerol como fuente de carbono

De la simulación se obtiene que para un medio de cultivo sin metanol, las concentraciones finales de las variables evaluadas fueron: Biomasa residual 21.78 g/L, glicerol residual, 0.58 g/L y PHA, 4.23 g/L.

En la Tabla 4 se comparan los resultados obtenidos para el medio de cultivo con y sin metanol:

Tabla 4. Comparación de producción batch utilizando glicerol con y sin metanol

Fuente de Carbono	Glicerol residual (g/L)	Biomasa residual (R) (g/L)	PHA (g/L)
Glicerol crudo (modelo)	2.26	20.46	3.18
Glicerol sin metanol	0.58	21.78	4.23

Se observa que se produce un aumento del 2.5 % en la producción de PHA utilizando como fuente de carbono glicerol sin metanol.

Dado que el glicerol crudo con recuperación de metanol tiene un precio de mercado superior al glicerol crudo, se deberá realizar un estudio económico para determinar cuál de las dos fuentes de carbono resulta más rentable a nivel económico.

4.6. Simulación y comparación de producción en fedbatch del uso de glicerol crudo y glicerol sin metanol como fuente de carbono.

4.6.1. Modelo matemático

Se presentan a continuación los balances de masa para un reactor fed-batch utilizados en la simulación.

Alimentación de glicerol en fase inicial (g/L): GP

Alimentación de biomasa residual en fase inicial (g/L): RP

Alimentación de sulfato de amonio en fase inicial (g/L): NP

Alimentación de metanol en fase inicial (g/L): MP

Caudal (L/h): FP

Concentración de glicerol (g/L): $G = N_g / V$;
 Siendo N_g , la masa en gramos de glicerol

Concentración de biomasa residual (g/L): $R = N_r / V$;
 Siendo N_r , la masa en gramos de biomasa residual

Concentración de sulfato de amonio (g/L): $N = N_n / V$;
 Siendo N_n , la masa en gramos de sulfato de amonio

Concentración de metanol (g/L): $M = N_m / V$;
 Siendo N_m , la masa en gramos de metanol

Concentración de PHA (g/L): $P = N_p / V$;
 Siendo N_p , la masa en gramos de PHA

Cinética:

$$\mu = 0.85 \times (1 - 0.024M) \times \left(\frac{G^{1.39}}{G^{1.39} + 61^{1.39}} \right) \times \left(\frac{N^{0.56}}{N^{0.56} + 0.0063^{0.56}} \right)$$

Balance de biomasa residual (g/h):

$$dN_r dt = FP * RP + \mu * V * R$$

Balance de glicerol (g/h)

$$dN_g dt = FP * GP - 1.2 * \mu * V * R - 0.000448 * R * V$$

Balance de sulfato de amonio (g/h):

$$dN_n dt = FP * NP - 0.07 * \mu * V * R$$

Balance de metanol (g/h):

$$dN_m dt = FP * MP$$

Balance de PHA (g/h)

$$dN_p dt = 0.0056 * R * V;$$

Variación de Volumen (L/h):

$$dV dt = FP;$$

4.6.2. Diseño de simulación

Para realizar la optimización, se realizan simulaciones de fermentaciones en modalidad fed-batch (Matlab). Los factores seleccionados para la optimización fueron, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y caudal de entrada.

Los niveles codificados utilizados para cada uno de los factores para el medio de cultivo con glicerol (sin metanol) como fuente de carbono fueron los siguientes:

Tabla 5. Niveles codificados utilizados en la simulación con glicerol

Factor	-1.68	-1	0	1	1.68
Glicerol (g/L)	63.2	70	80	90	113.6
Sulfato de Amonio (g/L)	1.4	15	35	55	68.6
Caudal (L/h)	0.13	0.2	0.3	0.4	0.47

Los niveles codificados utilizados para cada uno de los factores para el medio de cultivo con glicerol crudo (se mantiene la relación glicerol/metanol del subproducto modelo) como fuente de carbono fueron los siguientes:

Tabla 6. Niveles codificados utilizados en la simulación con glicerol crudo

Factor	-1.68	-1	0	1	1.68
Glicerol (g/L)/Metanol	16.4/8.5	30/15.5	50/26	70/32.3	83.6/43.31
Sulfato de Amonio (g/L)	1.52	9	20	31	38.5
Caudal (L/h)	0.13	0.2	0.3	0.4	0.47

El diseño utilizado para la optimización se describe en la Tabla 7:

Tabla 7. Diseño de optimización de producción en modalidad Fed-batch

	Glicerol (g/L) ó Glicerol/Metanol X1	Sulfato de Amonio (g/L) X2	F (L/h) X3
1	-1,00000	1,00000	1,00000
2	1,00000	-1,00000	1,00000
3	1,68179	0,00000	0,00000
4	-1,68179	0,00000	0,00000
5	1,00000	1,00000	-1,00000
6	0,00000	0,00000	0,00000
7	0,00000	1,68179	0,00000
8	1,00000	1,00000	1,00000
9	0,00000	-1,68179	0,00000
10	-1,00000	-1,00000	1,00000
11	-1,00000	-1,00000	-1,00000
12	0,00000	0,00000	-1,68179
13	-1,00000	1,00000	-1,00000
14	1,00000	-1,00000	-1,00000
15	0,00000	0,00000	0,00000
16	0,00000	0,00000	1,68179

Se realizaron en total 16 simulaciones en Matlab, para cada una de las condiciones descritas anteriormente para las dos fuentes de carbono.

4.6.3. Resultados de la optimización de la producción de PHA en modalidad fed-batch utilizando glicerol como fuente de carbono (sin metanol).

Luego de realizadas las simulaciones, se realizaron las superficies de respuesta en software Statistica. La productividad volumétrica (QP g/Lh), se grafica como variable codificada, tomando valor 1 para el máximo observado. Los factores se grafican de a pares, tomando el tercer factor fijo en el nivel central. (Figura 7)

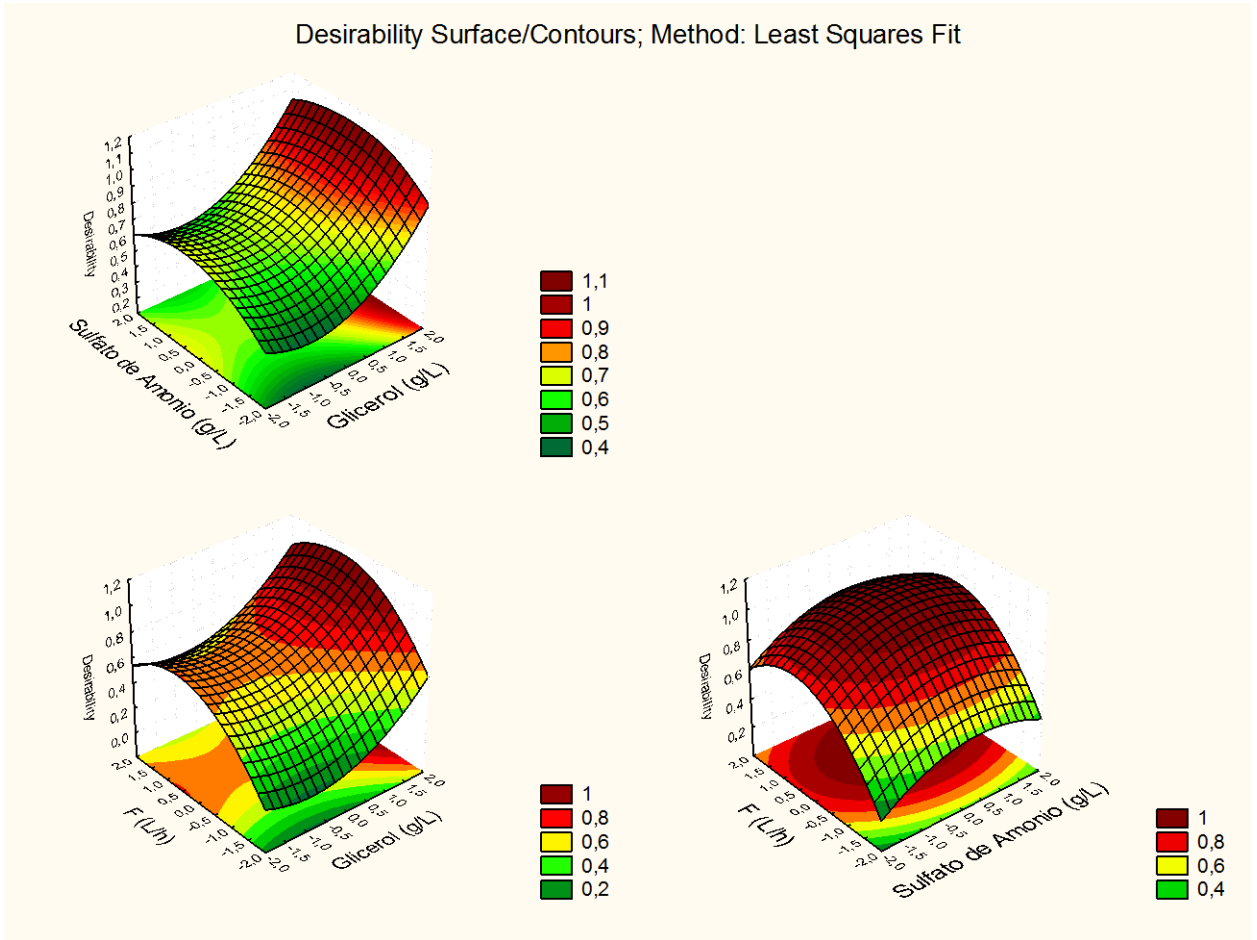


Figura 7. Superficie de respuesta QP *R.eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono.

Análisis de las superficies de respuesta

Sulfato de Amonio vs Glicerol: Se observa mayor respuesta a mayor nivel de Glicerol y nivel central de Sulfato de Amonio.

Glicerol vs Caudal: Se observa mayor respuesta a mayor nivel de Glicerol y nivel central de caudal de entrada.

Sulfato de Amonio vs Caudal: La mayor respuesta se encuentra en niveles centrales de ambos factores.

Para hallar los niveles de los factores que maximicen la productividad volumétrica, se realiza un perfil de predicción. Los niveles hallados se presentan a continuación, junto con el valor predicho de productividad volumétrica e intervalo de confianza. (Tabla 8)(Figura 8)

Tabla 8. Niveles optimizados para la producción de PHA utilizando glicerol como fuente de carbono

Current factor settings and predicted responses (Spreadsheet3) Predicted responses at the current level of each factor in the model						
X1	X2	X3	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
1,6818	,8409	,8409	0,227514	1,000000	0,153141	0,301886

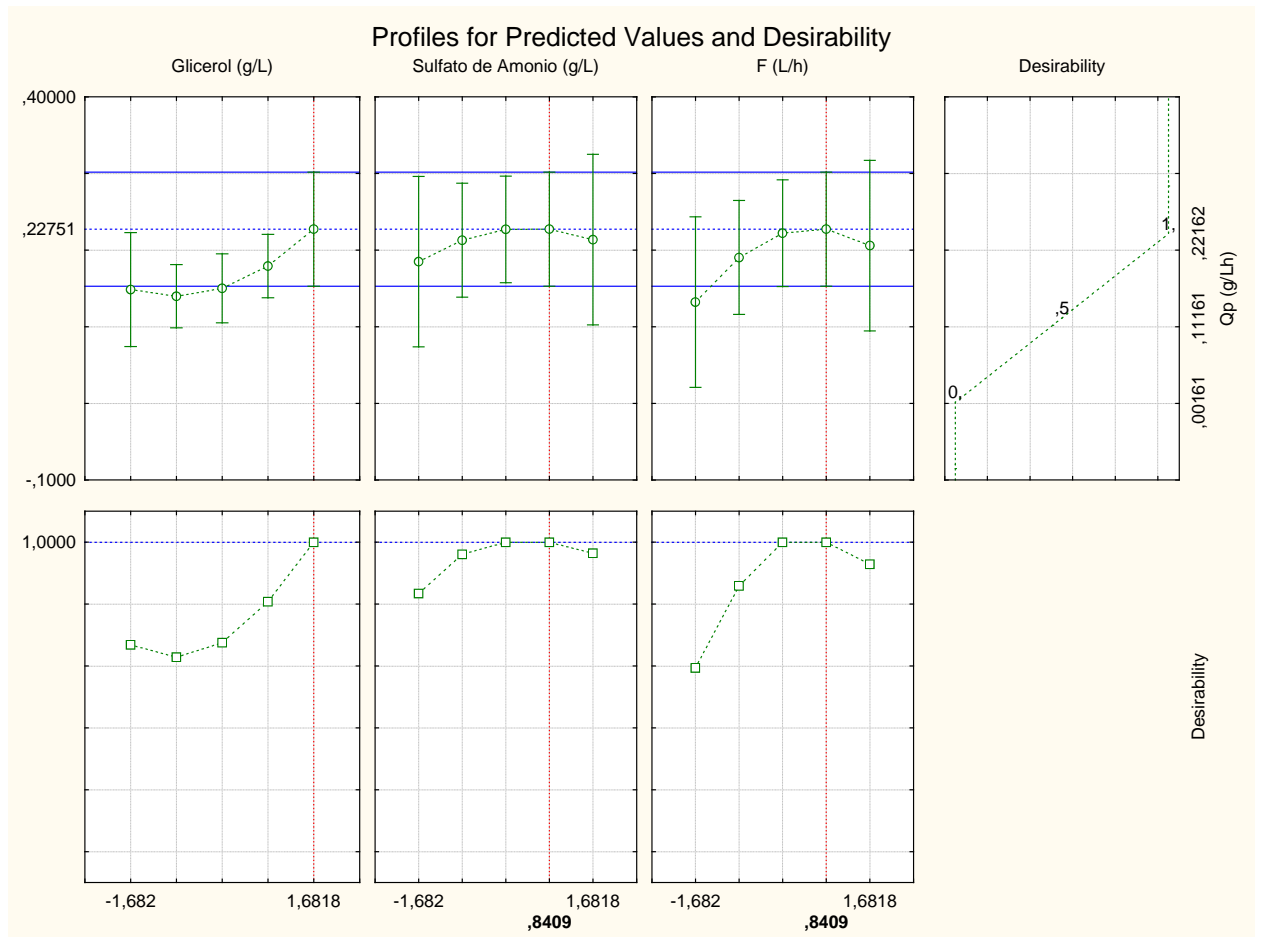


Figura 8. Perfiles de predicción *R.eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono

4.6.4. Resultados de la optimización de la producción de PHA en modalidad fedbatch utilizando glicerol como fuente de carbono (sin metanol).

Luego de realizadas las simulaciones, se realizaron las superficies de respuesta en software Statistica. La productividad volumétrica (QP g/Lh), se grafica como variable codificada, tomando valor 1 para el máximo observado. Los factores se grafican de a pares, tomando el tercer factor fijo en el nivel central. (Figura 9)

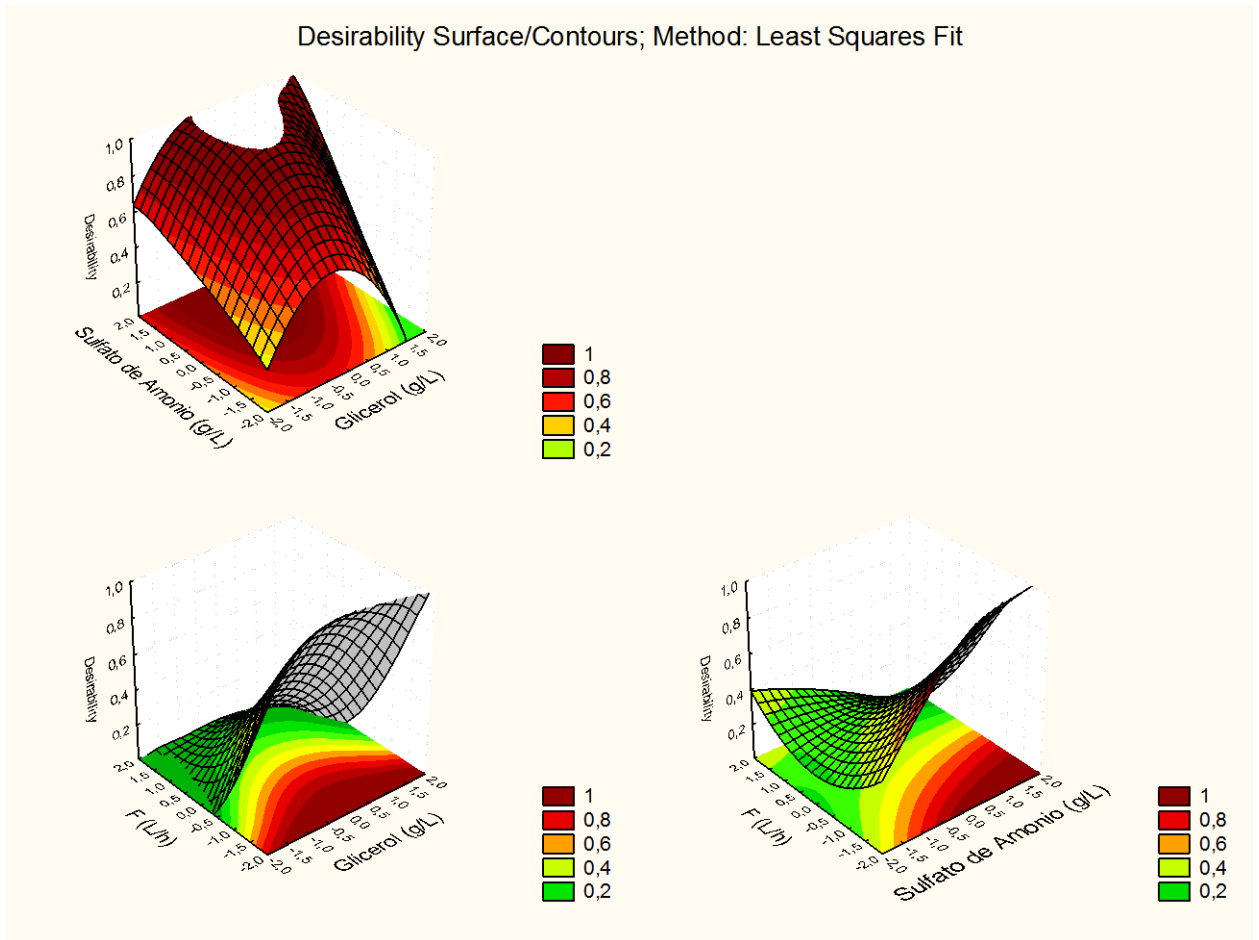


Figura 9. Superficie de respuesta *R. eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol crudo como fuente de carbono

Análisis de las superficies de respuesta

Sulfato de Amonio vs Glicerol: Se observa mayor respuesta a nivel central de Glicerol y nivel central/superior de Sulfato de Amonio.

Glicerol vs Caudal: Se observa mayor respuesta a nivel central de Glicerol y nivel inferior de caudal de entrada.

Sulfato de Amonio vs Caudal: La mayor respuesta se encuentra en niveles altos de sulfato de amonio y bajos de caudal.

Para hallar los niveles de los factores que maximicen la productividad volumétrica, se realiza un perfil de predicción. Los niveles hallados se presentan a continuación, junto con el valor predicho de productividad volumétrica e intervalo de confianza. (Figura 10) (Tabla 9)

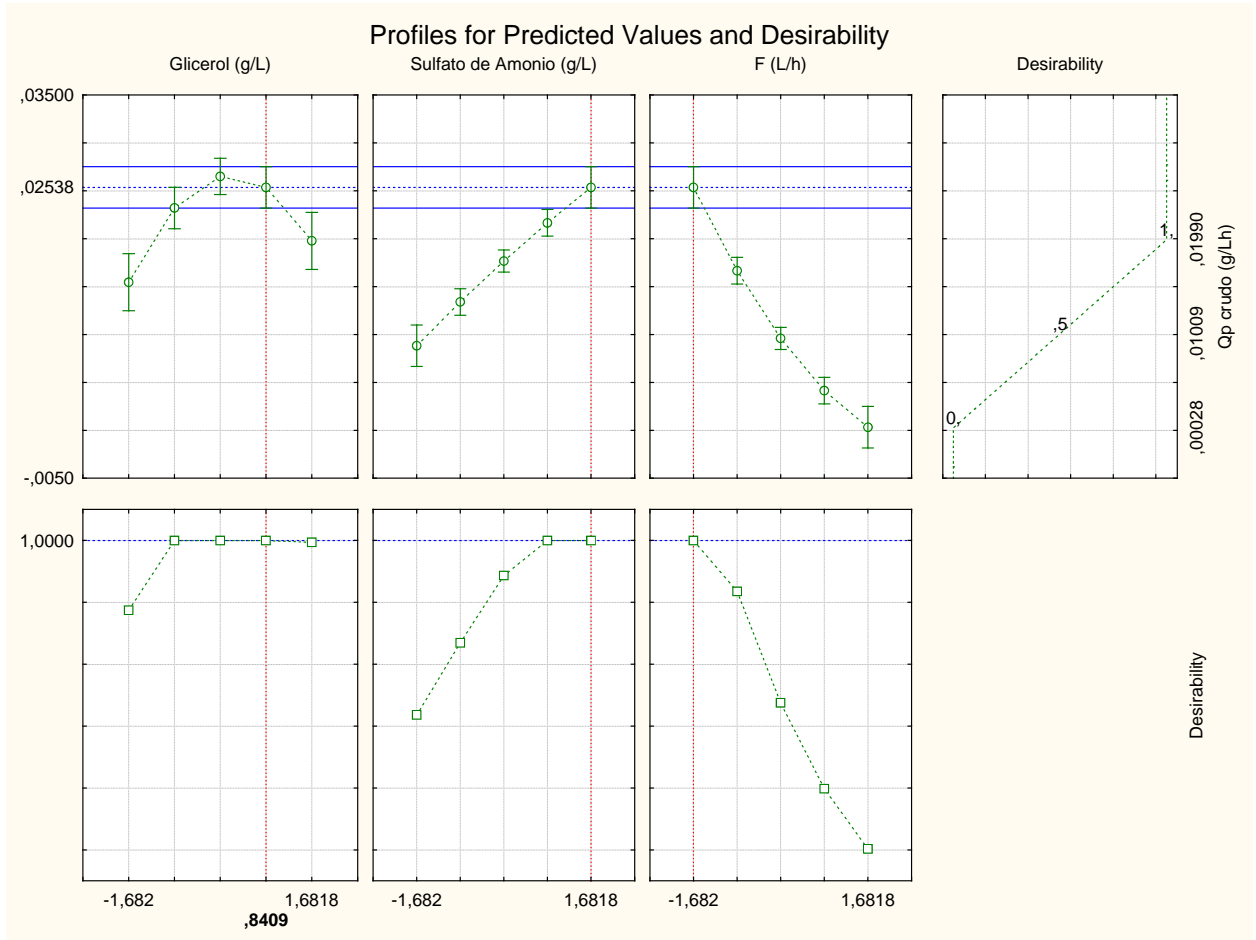


Figura 10. Perfiles de predicción para *R. eutropha* en modalidad fedbatch utilizando glicerol crudo como fuente de carbono

Tabla 9. Niveles optimizados para la producción fedbatch de PHA en *R. eutropha* utilizando glicerol crudo como fuente de carbono.

Current factor settings and predicted responses (Spreadsheet3) Predicted responses at the current level of each factor in the model						
X1	X2	X3	Predictd	Desirbty	-95%CI	+95%CI
,8409	1,6818	-1,682	0,025383	1,000000	0,023219	0,027548

4.7. Comparación de sistemas batch y fedbatch.

En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos para ambas modalidades de fermentación. La respuesta evaluada es la productividad volumétrica de PHA (QP g/Lh)

Tabla 10. Comparación modalidad batch y fedbatch

Fuente de Carbono	Batch	Fedbatch
Glicerol crudo	0.066	0.025
Glicerol sin metanol	0.088	0.23

Los valores de productividad volumétrica para modalidad batch (con ambas fuentes de carbono) y en modalidad fedbatch (utilizando glicerol sin metanol) se encuentran dentro del rango encontrado en la revisión bibliográfica en el Capítulo 3 (0.066-0.8 g/Lh).

La productividad volumétrica del sistema en el cual se simuló la utilización de glicerol crudo fue menor con respecto a la productividad del sistema simulado con un medio de cultivo con glicerol sin metanol. Esto está de acuerdo a la inhibición por presencia de metanol detectada en *R. eutropha*.

Se observa una disminución de la productividad para el sistema simulado con glicerol crudo como fuente de carbono, comparando una modalidad de producción batch contra una modalidad de operación fedbatch. Esto puede deberse a la acumulación de metanol en el sistema fedbatch, en el cual de forma continua se agrega metanol al sistema. Al aumentar la concentración de metanol en el medio, aumenta el nivel de inhibición de *R. eutropha*, traduciéndose en una menor productividad.

Para el sistema simulado con glicerol sin metanol presente en el medio de cultivo, se observó una mejora de aproximadamente un orden al pasar del sistema de operación batch a fedbatch.

5. CONCLUSIONES

El crecimiento en batch de *R.eutropha* DSM 545 en un medio de cultivo utilizando un subproducto modelo de glicerol crudo como fuente de carbono puede ser descrito por el modelo de doble limitación de Khanna sin inhibición por sustrato y con inhibición por metanol. Se realizaron simulaciones de producción batch y fedbatch, con dos fuentes de carbono: glicerol crudo y glicerol sin metanol.

En la simulación de producción batch de PHA, con glicerol crudo y glicerol sin metanol, no se aprecian diferencias significativas entre las productividades volumétricas generadas al utilizar una u otra fuente de carbono.

Para la producción fedbatch, donde se optimizaron las condiciones de entrada al reactor (Flujo, fuente de carbono y fuente de nitrógeno). Se observa una fuerte inhibición en el sistema que utiliza glicerol crudo, por acumulación de metanol. Utilizando glicerol sin metanol como fuente de carbono se obtiene una productividad de aproximadamente un orden mayor que con glicerol crudo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bailey J., Ollis, D. *Biochemical engineering fundamentals*. Ed. McGraw-Hill. 2da Edición, 1992.
- Bielger, L., Grossman, I., Westerberg, A. *Systematic methods of chemical process design*. Ed. Prentice Hall Inc., 1997.
- Cutlip, M., y M. Shacham. *Problem solving in chemical and biochemical engineering with Polymath, Excel and Matlab*. Second Edition. Prentice Hall Pearson Education, 2008.
- Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdelaR. «Cinética microbiana.» 2009.
- Departamento de Bioingeniería - IIQ - UdelaR. «Tecnología de Fermentaciones.» 2009.
- Khanna, S, y A. Srivastava. «Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB. A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen.» *Biochemical Engineering Journal* 27 (2006): 197-203.
- Nielsen, J. «Simulation of bioreactors.» *Computers and chemical engineering*, 18 (1994):615-620
- Oberkampf, W, S Delang, B Rutherford, K Diegert, y K Alvin. «Error and uncertainty in modeling and simulation.» *Reliability engineering and system safety* 75 (2002): 333-357.
- Soni, A. *A multiscale approach to fed-batch bioreactor control*. Tesis de Maestría - Universidad de Pittsburgh, 2000.
- Velez, José Gabriel. *Contribución a la optimización de bioreactores semicontínuos - Aplicación a la producción de Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia, 2005.

Capítulo 8

Perspectivas

El glicerol crudo, residuo procedente de la producción de biodiesel, está siendo estudiado para la utilización en procesos biotecnológicos como reemplazo de las fuentes de carbono más costosas tales como glucosa y sacarosa. En la producción de polihidroxicanoatos, la materia prima puede llegar a tener una implicancia del 50 % en el total de costos de producción. Por este motivo un descenso en el precio de la materia prima empleada tiene una repercusión importante en el precio final del producto.

Ha sido reportado por Yu y otros (2013)¹ que el costo de producción de PHB, para una planta de 15000 Ton/año es de 6 USD/kg si se utiliza glucosa como sustrato y entre 1.15-2.38 USD/kg, utilizando glicerol residual (con recuperación de metanol) como fuente de carbono. Esta estimación se obtuvo mediante simulación para productividades volumétricas de entre 0.23-1.1 g/L.h de PHA, y se encuentra dentro del rango de productividad obtenido en esta tesis (0.23 g/Lh para el sistema fedbatch con subproducto modelado con recuperación de metanol). El valor de costo reportado es prometedor, por lo cual como continuación del trabajo se plantea verificar experimentalmente las condiciones de operación encontradas en las simulaciones fedbatch (para ambos modelos de subproducto con y sin recuperación de metanol) y posteriormente realizar un análisis económico y financiero del proceso.

¹ Yu, A. S., y otros. «Influência de parâmetros de processo na viabilidade econômica do processo de produção de PHB a partir de resíduo da produção de biodiesel.» Foz de Iguaçu: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos-SINAFERM, 30 de julho-02 de agosto 2013.

Anexo

Técnicas Analíticas y Tinciones

TABLA DE CONTENIDO

1. DETERMINACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL PESO SECO DE BIOMASA Y LA MEDIDA DE ABSORBANCIA DE LA MUESTRA.....	164
1.1. Objetivo	164
1.2. Definición	164
1.3. Campo de Aplicación.....	164
1.4. Principio.....	164
1.5. Materiales	164
1.5.1. Reactivos	164
1.5.2. Soluciones.....	164
1.5.3. Equipos Y Accesorios	165
1.6. Procedimiento	166
1.6.1. Medida de peso seco.....	166
1.6.2. Medida Espectrofotométrica	166
1.7. Expresión De Los Resultados.....	166
1.7.1. Método Y Fórmula De Cálculo.....	166
1.7.2. Incertidumbre.....	167
2. DETERMINACIÓN DE METANOL Y GLICEROL POR HPLC	168
2.1. Principio y Aplicación	168
2.2. Equipos y Materiales:.....	168
2.3. Reactivos y Soluciones	168
2.3.1. Soluciones Stock de estándares para calibración	168
2.4. Procedimiento	169
2.4.1. Pre-tratamiento de la muestra.....	169
2.4.2. Condiciones Instrumentales.....	169
3. BIOANÁLISIS ENZIMÁTICO DE ÁCIDO D-3-HIDROXIBUTIRICO.....	170
3.1. Fundamento	170
3.2. Pretratamiento de la muestra.....	170
3.3. Digestión propanólica.	170
3.4. Test enzimático Boehringer Mannheim	171
3.4.1. Contenido	171
3.4.2. Procedimiento	171
3.4.3. Cálculo	172
3.4.4. Instrucciones para realizar el análisis.....	173

3.4.5.	Información técnica.....	173
3.4.5.1.	Especificidad.....	173
3.4.5.2.	Sensibilidad y límite de detección.....	173
3.4.5.3.	Linealidad	174
3.4.5.4.	Precisión	174
3.4.5.5.	Interferencia/fuentes del error	174
3.4.5.6.	Reconocimiento de interferencia durante el procedimiento de análisis..	174
3.5.	Seguridad.....	175
4.	TINCIONES Y BAÑOS.....	176
4.1.	Tinción de PHA con Negro Sudán B.....	176
4.2.	Tinción con violeta cristal.....	176
4.3.	Baño azul nilo	176

1. DETERMINACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL PESO SECO DE BIOMASA Y LA MEDIDA DE ABSORBANCIA DE LA MUESTRA.

1.1. Objetivo

Se hallará una correlación lineal entre el peso seco y la medida turbidimétrica.

1.2. Definición

La propiedad a determinar es la pendiente que correlaciona peso seco (g/L de biomasa) con turbidimetría (Absorbancia).

1.3. Campo de Aplicación

La técnica turbidimétrica no es útil si existen cantidades significativas de sólidos en el medio. Cuando este método se utiliza para estimar una masa de microorganismos micelares, es necesario homogeneizar la muestra. Es importante al utilizar este método que los componentes del medio o los productos de fermentación no absorban la luz a la longitud de onda utilizada. La correlación hallada es válida para el medio de cultivo y el microorganismo estudiados.

1.4. Principio

Un cultivo bacteriano actúa como una suspensión coloidal bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él. Dentro de ciertos límites la luz absorbida o reflejada por una suspensión bacteriana, es directamente proporcional a la concentración de células que hay en el cultivo. Por lo tanto aplicar nefelometría, es decir la medida de la reflexión de los rayos de luz o bien turbidimetría, es decir la medida del porcentaje de absorción de luz, a la suspensión bacteriana se puede estimar la masa de células presentes y en algunos casos, el número de microorganismos.

1.5. Materiales

1.5.1. Reactivos

No corresponde.

1.5.2. Soluciones

- Se preparan 90 mL del medio de cultivo estéril¹.

¹ Esterilizar en autoclave por separado: solución de azúcares, solución con fuente de nitrógeno y solución mineral; la solución de vitaminas se esteriliza por filtración. El medio se compone uniendo todas las soluciones en condiciones asépticas.

- Se separan 30 mL en un Erlenmeyer de 100 mL y se etiqueta como B, los 60 mL restantes se colocan en un Erlenmeyer de 500 mL y se etiqueta como M.
- La muestra B se guarda en la heladera a 4°C, hasta el momento de preparar las diluciones.
- La muestra M se inocula con el microorganismo de interés y se desarrolla el cultivo en condiciones adecuadas según el microorganismo. El cultivo obtenido se divide en dos partes iguales y se las etiqueta como M₁ y M₂.
- Se preparan diluciones de M₁, M₂, B, utilizando agua destilada, midiendo el volumen con macro o micropipeta según Tabla 1 (se debe preparar las diluciones antes de realizar la medida).

Tabla 1. . Detalle de la preparación de diluciones para las muestras M₁, M₂ y B

<i>Dilución</i>	<i>mL de muestra original (t₁)</i>	<i>mL de agua (t₂)</i>
S/D	10 (macropipeta)	0
1/2	5 (macropipeta)	5 (macropipeta)
1/5	2 (macropipeta)	8 (macropipeta)
1/10	1 (micropipeta)	9 (macropipeta)
1/20	0.5 (micropipeta)	9.5 (macropipeta)
1/50	0.2 (micropipeta)	9.8 (macropipeta)
1/100	0.1 (micropipeta)	9.9 (macropipeta)

1.5.3. Equipos Y Accesorios

- Estufa a 80 o 110 °C.
- Espectrofotómetro.
- Micropipeta (hasta 1000 µL) y Macropipeta (hasta 10 mL).
- 30 tubos de vidrio.
- Agitador vortex.
- Balanza analítica.
- Equipo de filtración por membrana.
- 3 membranas de 0.2 µm.
- 3 placas de Petri.
- 1 pipeta aforada de 10.00 mL.

- Desecador

1.6. Procedimiento

1.6.1. Medida de peso seco.

Se identifica con un número tres placas de Petri. Se coloca en ellos, las tres membranas de 0.2 μm . Las placas con las membranas se colocan en estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, se retira de la estufa, se deja enfriar en desecador y se pesan² los filtros en balanza analítica. Se toman con pipeta aforada muestras de 10 mL del medio de cultivo y se filtran a través de las membranas. Se coloca en estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas o a 110 $^{\circ}$ C durante 8 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se retira de la estufa, se deja enfriar en desecador y se pesa³. Se coloca en estufa por media hora más y se repite el proceso hasta peso constante.

1.6.2. Medida Espectrofotométrica

Las muestras a medir son las preparadas según la tabla 1. Las medidas se realizan por triplicado⁴ a $\lambda = 600 \text{ nm}$, utilizando como blanco la muestra B con igual dilución.

1.7. Expresión De Los Resultados

1.7.1. Método Y Fórmula De Cálculo

Se calcula los gramos por litro de biomasa de la siguiente forma:

$$g_{\text{iniciales}} = g(\text{membrana})$$

$$g_{\text{finales}} = g(\text{membrana} + \text{biomasa})$$

$$g_{\text{biomasa}} = g_{\text{finales}} - g_{\text{iniciales}}$$

$$g / L_{\text{Biomasa}} = \frac{g_{\text{biomasa}}}{10\text{mL}} \times 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}}$$

Se calculan los gramos por litro de cada dilución según:

$$g / L_{\text{Dilución}} = \left(\frac{g / L_{\text{biomasa}} \times t_1}{t_1 + t_2} \right)$$

$$t_1 = \text{mL}_{\text{demuestraoriginal}}$$

$$t_2 = \text{mL}_{\text{deagua}}$$

Finalmente se halla la correlación entre g/L de biomasa para distintas diluciones y la absorbancia.

² Se realizan 5 medidas consecutivas, se toma el promedio.

³ Se realizan 5 medidas consecutivas, se toma el promedio.

⁴ Se toma el promedio de las tres mediciones.

1.7.2. Incertidumbre

Se realiza el cálculo de errores utilizando el método de propagación:

$$\Delta g_{\text{iniciales}} = 1E - 4g$$

$$\Delta g_{\text{finales}} = 1E - 4g$$

$$\Delta g_{\text{biomasa}} = \Delta g_{\text{finales}} + \Delta g_{\text{iniciales}} = 2E - 4g$$

$$\Delta g / L_{\text{biomasa}} = \left(\frac{\Delta g / L_{\text{biomasa}}}{g_{\text{biomasa}}} + \frac{\Delta V}{V} \right) \times g / L_{\text{biomasa}}$$

Para las diluciones:

$$\Delta g / L_{\text{dilución}} = \left(\frac{\Delta g / L_{\text{biomasa}}}{g / L_{\text{biomasa}}} + \frac{2\Delta t_1}{t_1} + \frac{\Delta t_2}{t_2} \right) \times (g / L_{\text{dilución}})$$

Error en la pendiente:

$$\Delta P = \left(\frac{(\Delta g / L_{\text{dilución}})_1 + (\Delta g / L_{\text{dilución}})_2}{(g / L_{\text{dilución}})_1 + (g / L_{\text{dilución}})_2} + \frac{\Delta A_1 + \Delta A_2}{A_1 - A_2} \right) \times P$$

Donde los subíndices 1 y 2 refieren a los extremos del intervalo de medida.

El error en la ordenada en el origen se puede estimar por propagación a partir de la ecuación de la curva de calibración:

$$\Delta \text{ordenada} = \Delta A_i + (g / L_{\text{dilución}})_i \times \Delta P + P \times (\Delta g / L_{\text{dilución}})_i$$

Dónde:

$(g / L_{\text{dilución}})_i$ - Son los g/L correspondientes a una de las diluciones realizadas identificadas con el subíndice i

A_i - Es la absorbancia medida para la muestra $(g / L_{\text{dilución}})_i$

2. DETERMINACIÓN DE METANOL Y GLICEROL POR HPLC

2.1. Principio y Aplicación

La determinación de carbohidratos y algunos alcoholes se realiza mediante separación por cromatografía líquida de alta presión de intercambio iónico y posterior detección con detector de índice de refracción.

Para ello se utiliza una columna con un gel de intercambio catiónico consistente en un copolímero de estireno-divinilbenceno sulfonado en el cual es posible separar monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y alcoholes derivados de carbohidratos utilizando agua Milli-Q como fase móvil.

2.2. Equipos y Materiales:

Equipo HPLC Shimadzu compuesto por:

- 2 Bombas LC 10 AD VP
- Horno CTO-10 AC VP
- Detector RID – 10 A
- Controlador del sistema SCL – 10 AVP
- Inyector automático SIL 10 AD VP
- Software: Class VP 5.032
- Columna Shodex Sugar KS – 801 (8mm x 300mm)
- Precolumna: Shodex Sugar KS-G
- Matraz Kitasato y embudo con soporte (47 mm de diámetro)
- Trampa de vacío o bomba
- Membranas compatibles con fase acuosa 0,22 μ m o 0,45 μ m de 47 mm de diámetro
- Filtros compatibles con fase acuosa de 0,22 μ m , 13 mm de diámetro
- Jeringa para filtración de muestras
- Equipo para obtención de agua Milli-Q
- Viales

2.3. Reactivos y Soluciones

Nota: Utilizar reactivos de la mayor calidad disponible (p.p.a o ultra puro)

Fase Móvil: Filtrar el agua Milli-Q por vacío antes de usar utilizando las membranas de 0,22 o 0,45 μ m, de 47 mm de diámetro.

2.3.1. Soluciones Stock de estándares para calibración

Preparar soluciones stock de los analitos a determinar de 20 g/L (evaluar estabilidad a 4°C).

Preparar por dilución de las soluciones stock, soluciones de concentración adecuada a los efectos de cubrir el rango de trabajo. Realizar una curva de calibración con 5 puntos.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Pre-tratamiento de la muestra

Dilución adecuada (de acuerdo a curva de calibración) y filtración por membrana 0,22 m.

2.4.2. Condiciones Instrumentales

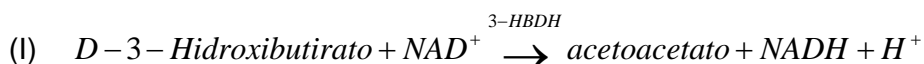
Temperatura: 55 °C

Flujo: 0,7 mL/min

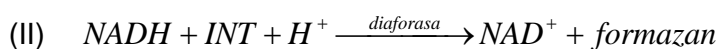
3. BIOANÁLISIS ENZIMÁTICO DE ÁCIDO D-3-HIDROXIBUTIRICO.

3.1. Fundamento

En presencia de la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH), el ácido D-3-Hidroxiacetato es oxidado por la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) a acetoacetato.



En la reacción catalizada por diaforasa, el NADH formado convierte el cloruro de iodonitrotetrazolio (INT) en formazan que es medido en su máximo en el rango visible a 492 nm.



La reoxidación del NADH es necesaria para desplazar el equilibrio a favor de la formación de acetoacetato.

3.2. Pretratamiento de la muestra.

Una muestra de 1 mL de cultivo es tratado a 85°C 15 min, para desnaturalizar el material proteico y genético y desestabilizar la membrana externa. En el caso de *Ralstonia eutropha* DSM 545, este tratamiento también desnaturaliza la PHB depolimerasa, una enzima de la pared del granulo de PHB, capaz de degradar el biopolímero⁵

Centrifugar a 15000 rpm durante 15 min a 4°C. Descartar el sobrenadante y conservar el sedimento en tubo rotulado a 4°C para determinación de PHB.

3.3. Digestión propanólica.

Resuspender el pellet con 0.8 mL de propanol y 0.2 mL de H₂SO₄. En tubo cerrado calentar por 60 min a 90°C para transformar el PHB en una mezcla de ácidos monoméricos y propionilésteres. Agregar 9.0 mL de agua destilada y agitar.

A 1 mL de ésta solución agregar 80 µL de KOH 10M y mantener a temperatura ambiente durante 10 min, para hidrolizar los propionilésteres.

Para ajustar el pH se utilizan 100 µL de Tris-HCl (4M, pH 7.8). La alícuota neutralizada es centrifugada (2 min 21000g) y el sobrenadante es utilizado para la determinación enzimática.⁶

⁵ Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*, Kapritchkoff, F.; Viotti, A.; Alli, R.; Zuccolo, M.; Pradella, J.; Maiorano, A.; Miranda, E.; Bonomi, A.; Journal of Biotechnology 122 (2006) 453-462.

⁶ Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. Heddelman, R.; Fleischmann, T.; Hany, R.; Zehnder, A. Journal of microbiological methods 35 (1999) 111-119.

3.4. Test enzimático Boehringer Mannheim

3.4.1. Contenido

- Botella 1 con 25 mL de solución del buffer: fosfato de potasio/trietanolamina, pH 8.6; Triton X-100.
- Tres botellas 2 cada una con 35 mg liofilizados de diaforasa, aprox 4U; NAD aprox 28 mg.
- Botella 3 con cloruro de idonitrotetrazolio, aprox 2.5 mL.
- Botella 4 con aprox. 1.8 mL de suspensión de 3-hidroxybutirato deshidrogenasa, aprox. 27 U.

3.4.2. Procedimiento

Longitud de onda: (Hg) 492 nm

Cubetas: 1.00 cm

Temperatura 20-25°C

Volumen final: 3.050 mL

Lectura contra aire (sin cubeta de blanco) o contra agua o blanco.

Muestras: 0.4-12 µg D-3-hidroxybutirato en 0.100-2.000 mL de muestra.

<i>Pipetear en cubetas</i>	<i>Blanco</i>	<i>Muestra</i>
Solución 1 ⁷	0.600 mL	0.600 mL
Solución 2	0.200 mL	0.200 mL
Solución 3	0.200 mL	0.200 mL
Solución muestra	-	0.100 mL
Agua bidestilada	2.000 mL	1.900 mL
Mezclar ^{**} , luego de 2 min medir la absorbancia de las soluciones (A ₁). Repetir la medida luego de 2 min. Si el cambio en la absorbancia es mayor a 0.010, la muestra debe ser pretratada (remoción de sustancias reductoras). Si el cambio en la absorbancia es menor a 0.010, el pretratamiento no es necesario, la reacción comienza inmediatamente luego de la medida anterior mediante el agregado de:		
Suspensión 4	0.050 mL	0.050 mL
Mezclar ^{**} , medir la absorbancia de las soluciones exactamente 20 min luego de la adición de la suspensión 4 (A ₂). Repetir la lectura luego de 10 min exactamente (A ₃).		

⁷ Para análisis en serie se puede preparar una solución stock mezclando las soluciones 1,2 y 3. Esta solución stock es estable por una hora guardada en la oscuridad a 20-25 °C

Diferencia de la absorbancia para el en blanco:

$$\Delta A_{\text{blanco}} = (A_2 - A_1)_{\text{blanco}} - 2 \times (A_3 - A_2)_{\text{blanco}}$$

Diferencia de la absorbancia para la muestra:

$$\Delta A_{\text{muestra}} = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - 2 \times (A_3 - A_2)_{\text{muestra}}$$

Restar la diferencia de la absorbancia del blanco a la diferencia de la absorbancia de la muestra.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{muestra}} - \Delta A_{\text{blanco}}$$

Para acelerar de la medida y simplificar el cálculo, la medida de A3 se puede rechazar con poca incidencia en el resultado. En este caso se calcula la diferencia de la absorbancia de la siguiente manera:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

Las diferencias en las medidas de la absorbancia deben, en general, ser por lo menos 0.100 unidades de la absorbancia para alcanzar resultados suficientemente exactos (véase: “instrucciones para realizar del análisis” y “de la sensibilidad y del límite de detección”).

3.4.3. Cálculo

Según la ecuación general para calcular la concentración:

$$C(g/L) = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

V = volumen final [mL]

v = volumen de muestra [mL]

MW = peso molecular de la sustancia [g/mol]

d = camino óptico [centímetro]

ϵ coeficiente de extinción de formazan en 492 nanómetro = 19.9 [l × cm⁻¹ del × mmol⁻¹]

$$C(g/L) = \frac{3.050 \times 104.1}{19.9 \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A = 0.1596 \times \Delta A$$

Si la muestra se ha diluido en la preparación, el resultado debe ser multiplicado por el factor F. de la dilución.

3.4.4. Instrucciones para realizar el análisis

La cantidad de ácido de D-3-hidroxi-butírico presente en el análisis tiene que ser entre 0.4-12 µg. La solución de la muestra se diluye hasta que una concentración ácida de D-3-hidroxi-butírico de no más que 0.12 g/L.

Tabla de diluciones

Cantidad estimada de ácido D-3-hidroxi-butírico (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución F
< 0.12g	-	1
0.12-1.2g	1+9	10
1.2-12g	1+99	100
>12g	1+999	1000

Si la diferencia medida en la absorbancia (ΔA) es demasiado baja (por ej, 0.100), la solución de la muestra se debe preparar otra vez (dilución menor).

3.4.5. Información técnica

1. Para análisis en serie, una solución stock puede ser preparada mezclando las soluciones 1, 2 y 3. Esta solución stock es estable para 1 h cuando está almacenada en la oscuridad. Utilizar 1.000 mL para cada análisis.
2. El sistema de reacción es sensible a la luz (luz del día o luz artificial) después de la adición de el INT (la solución 3 o mezcla de reacción), la incubación debe realizarse en la oscuridad:
 - a) si incuba en el espectrofotómetro, cerrar el compartimiento de la cubeta fuera del alcance de la luz.
 - b) Cubrir las cubetas o almacenarlas en un armario oscurecido.
3. Al realizar el cálculo, los resultados se expresan como ácido D-3-hidroxi-butírico (masa molar 104.1 g/mol).
4. El ácido hidroxi-butírico libre no se puede utilizar en soluciones de control porque la reacción no es cuantitativa. La razón de esto puede ser, (similar al ácido láctico) la formación de ésteres los cuáles no se convierten en la reacción enzimática. Se recomienda utilizar D, L-3-hidroxi-butirato de sodio para la preparación del control del análisis (ver preparación de soluciones).

3.4.5.1. Especificidad

El método es específico para el D-3-hidroxi-butírico.

En el análisis del mono-sodio-L-D-hidroxi-butirato (PM 126.1), resultados del aproximadamente 50% tienen que ser esperados (Solamente la forma D se mide enzimáticamente).

3.4.5.2. Sensibilidad y límite de detección

La absorbancia mínima que distingue el procedimiento es 0.005 unidades de la absorbancia. Esto corresponde a un volumen de muestra máximo $v = 2.000$ mL de una concentración de ácido D-3-hidroxi-butírico de la solución de muestra de 0.04 mg/L. El límite de detección de 0.2

mg/L se deriva de la diferencia de la absorbancia de 0.020 y de un volumen de muestra máximo $v = 2.000$ mL.

3.4.5.3. Linealidad

La linealidad de la determinación existe a partir de $0.4 \mu\text{g}$ de ácido D-3-hydroxybutyrico/muestra ($0.2 \mu\text{g}$ ácido D-3-hydroxybutyrico/ L de muestra; volumen de muestra $v=2.000$ mL) hasta $12 \mu\text{g}$ de ácido D-3-hydroxybutyrico/muestra ($0.12 \mu\text{g}$ ácido D-3-hydroxybutyrico/ L de muestra; volumen de muestra $v=0.100$ mL).

3.4.5.4. Precisión

En una determinación doble, usando una solución de muestra, puede ocurrir una diferencia de 0.005 a 0.010 unidades de la absorbancia. Con un volumen de muestra de $v = 0.100$ ml y medido a longitud de onda 340 nanómetros, éste corresponde a una concentración ácido D-3-hydroxybutyrico de aproximadamente 0.8 - 1.5 mg/L (si la muestra se diluye durante la preparación de la muestra, el resultado tiene que ser multiplicado por el factor F. de la dilución). Si la muestra se pesa para la preparación de la muestra, por ejemplo. con 1 g muestra/100 mL = 10 g/L, se puede esperar una diferencia de aproximadamente 0.01-0.015 g/100 g.

3.4.5.5. Interferencia/fuentes del error

- a) Soluciones que se utilizan después de la fecha de la expiración indicada, o mezclas el reactivo del bifásico, NAD, y de INT almacenado para más de una hora a 20-25°C antes de ser utilizado, da lugar a una reacción retrasada que se debe considerar en cálculo de A2 por extrapolación al tiempo de adición de la suspensión 4 (3-HBDH).

- b) Altas concentraciones de sustancias reductoras, como el ácido L-ascórbico o ácido sulfuroso, interfieren en el análisis debido a su reacción con INT. Esta interferencia es eliminada por el tratamiento precedente de la muestra con H_2O_2 :

Pesar la muestra o medir con una pipeta la solución de muestra diluida (en caso de necesidad), en un frasco volumétrico de 50 mL. Llenar con agua hasta un volumen de cerca de 40 mL, agregar 0.5 mL de KOH (2 M) y 0.01 mL de H_2O_2 . (peso/volumen del 30%), incubar minutos en 70°C, ajustar el pH a 7-8 con H_2SO_4 (1 M). Permitir que la solución se enfríe hasta 20-25°C. Completar los 50 mL; mezclar la solución y filtrar si es necesario. Utilizar el líquido filtrado para el análisis.

3.4.5.6. Reconocimiento de interferencia durante el procedimiento de análisis

Si la conversión del ácido D-3-hidroxibutírico se ha terminado según el tiempo dado bajo "**procedimiento**", puede ser concluir en general que no ha ocurrido ninguna interferencia.

- Para verificar que no existan interferencias, se puede realizar el siguiente ensayo: luego de culminada la reacción, agregar D, L-3-hidroxibutirato monosódico: si la absorbancia es alterada luego de la adición del estándar, esto es una indicación que no han ocurrido interferencias.
- El error del operador o interferencia de la determinación debido a la presencia de sustancias contenidas en la muestra se puede reconocer realizando una determinación

doble, usando dos diversos volúmenes de muestra (por ejemplo. 0.100 mL y 0.200 mL): las diferencias medidas en absorbancia debe ser proporcional a los volúmenes de muestra usados. Al analizar muestras sólidas, se recomienda que las diferentes cantidades (1 g y 2 g) se pesen en frascos volumétricos de 100 mL. Las diferencias de la absorbancia medidas y los pesos de la muestra usados debe ser proporcional para los volúmenes de muestra.

- Posible interferencia causada por las sustancias contenidas en la muestra puede ser reconocidas usando un estándar interno como control.
- Posibles pérdidas durante la determinación pueden ser reconocidas realizando pruebas de recuperación: la muestra se debe preparar y analizar con y sin material estándar agregado. El añadido debe ser recuperado cuantitativamente dentro del rango de error del método.

3.5. Seguridad

Los reactivos usados en la determinación del ácido de D-3-hidroxibutirico no son materiales peligrosos de acuerdo a la EC Regulation 67/548/EEC.

4. TINCIONES Y BAÑOS

4.1. Tinción de PHA con Negro Sudán B

Cubrir el frotis con gotas de solución Negro Sudán B (300 mg de Negro Sudán B en 100 mL de Etanol 70%) y dejar durante 15 minutos.

Se escurre el exceso de colorante se decolora con agua, secar al aire

Contrastar con Safranina (Solución acuosa al 0,5 %) durante 10 seg. Lavar con agua y secar al aire.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los gránulos de PHA se tiñen de azul oscuro y el resto de la célula de color rosado.

4.2. Tinción con violeta cristal

- Preparar un frotis del cultivo.
- Cubrir el frotis con violeta cristal. Dejar actuar durante 1 min.
- Lavar con agua y secar al aire.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión. La célula se tiñe de violeta mientras que los gránulos de PHB no se tiñen.

4.3. Baño azul nilo

Las colonias de cultivos en placas, son bañadas con una solución al 0.1 % de azul nilo en acetona. La presencia de PHAs se revela (coloración naranja) a una longitud de onda de 300 nm en transiluminador.

ANEXO

Capítulo 5

TABLA DE CONTENIDO

1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA <i>R. EUTROPHA</i>	179
1.1.	Evaluación del rendimiento de producto en función de biomasa	179
1.2.	Análisis del rendimiento de producto basado en sustrato consumido	180
1.3.	Análisis de la productividad específica de producto.....	182
1.4.	Análisis de la productividad volumétrica de producto	183
1.5.	Análisis de la producción de biomasa	186
2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA <i>M. EXTORQUENS</i>	188
2.1.	Evaluación del rendimiento de producto en función del sustrato consumido.....	188
2.2.	Evaluación del rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido.....	190
2.3.	Evaluación del rendimiento de producto en función de la biomasa generada.....	191
2.4.	Evaluación de la productividad específica de producto.....	193
	Tabla 1. ANOVA YP/X <i>R. eutropha</i>	179
	Tabla 2. ANOVA Y P/S <i>R. eutropha</i>	180
	Tabla 3. ANOVA qP <i>R.eutropha</i>	182
	Tabla 4. ANOVA QP <i>R.eutropha</i>	184
	Tabla 5. Análisis estadístico de la producción de biomasa en <i>R. eutropha</i>	186
	Tabla 6. ANOVA para la producción de biomasa en <i>R. eutropha</i>	186
	Tabla 7. ANOVA YP/S en <i>M. extorquens</i>	188
	Tabla 8. ANOVA YX/S en <i>M. extorquens</i>	190
	Tabla 9. ANOVA YP/X en <i>M. extorquens</i>	191
	Tabla 10. ANOVA qP <i>M. extorquens</i>	193
	Figura 1. Valores observados vs predichos por modelo YP/X <i>R. eutropha</i>	179
	Figura 2. Gráfico de Residuos Y P/X <i>R. eutropha</i>	180
	Figura 3. Valores observados vs predichos por modelo YP/S <i>R. eutropha</i>	181
	Figura 4. Histograma de distribución de residuos Y P/S <i>R. eutropha</i>	181
	Figura 5. Valores observados vs predichos qP <i>R.eutropha</i>	182
	Figura 6. Histograma de residuos qP <i>R.eutropha</i>	183
	Figura 7.Gráfico de valores predichos y observados QP	185
	Figura 8. Histograma QP <i>R. eutropha</i>	185
	Figura 9. Gráfico de valores predichos y observados producción de biomasa.....	187
	Figura 10. Histograma de residuos para producción de biomasa en <i>R.eutropha</i>	187
	Figura 11. Perfiles de predicción para la formación de biomasa en <i>R. extorquens</i>	188
	Figura 12. Valeres predichos vs valores observados en <i>M. extorquens</i>	189
	Figura 13. Histograma YP/S <i>M. extorquens</i>	189
	Figura 14. Gráfico de valores predichos vs observados Y X/S en <i>M. extorquens</i>	190
	Figura 15. Histograma YX/S <i>M. extorquens</i>	191
	Figura 16. Gráfico valores predichos vs valores observados Y P/X en <i>M. extorquens</i>	192
	Figura 17. Histograma Y P/X en <i>M. extorquens</i>	192
	Figura 18. Gráfico de valores predichos vs valores observados qP <i>M. extorquens</i>	194
	Figura 19. Histograma de residuos estandarizados qP <i>M. extorquens</i>	194

1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA *R. eutropha*

1.1. Evaluación del rendimiento de producto en función de biomasa

A continuación se presenta el ANOVA para los modelos presentados, validando los coeficientes analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente.

Tabla 1. ANOVA YP/X *R. eutropha*

Regr. Coefficients; Var.:Y P/X; R-sqr=,99106; Adj:,95532 (PHB fraccionario ralstonia) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,0006333 DV: Y P/X

	Regressn	Std.Err.	t(2)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,273750	0,008898	30,7668	0,001055	0,235467	0,312033
Curvatr.	-0,057083	0,017038	-3,3504	0,078709	-0,130390	0,016223
(1)Gly/Meth	-0,016250	0,008898	-1,8263	0,209333	-0,054533	0,022033
(2)(NH₄)₂SO₄	-0,103750	0,008898	-11,6605	0,007275	-0,142033	-0,065467
(3)KH₂PO₄	-0,051250	0,008898	-5,7600	0,028843	-0,089533	-0,012967
(4)Na₂HPO₄,12H₂O	-0,038750	0,008898	-4,3551	0,051000	-0,077033	-0,000467
1 by 2	0,016250	0,008898	1,8263	0,209333	-0,022033	0,054533
1 by 3	0,023750	0,008898	2,6693	0,116359	-0,014533	0,062033
1 by 4	0,026250	0,008898	2,9502	0,098250	-0,012033	0,064533

Se observa linealidad entre los datos observados y los predichos por el modelo del diseño.

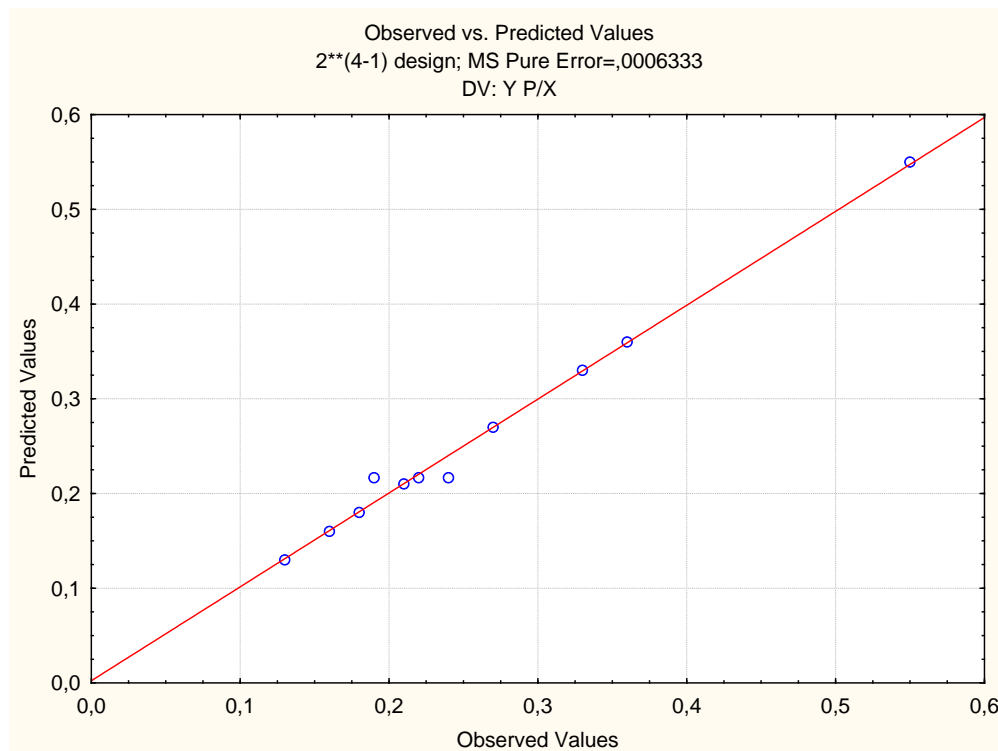


Figura 1. Valores observados vs predichos por modelo YP/X *R. eutropha*

Para culminar con la validación se presenta el histograma de los residuos con distribución de tipo normal.

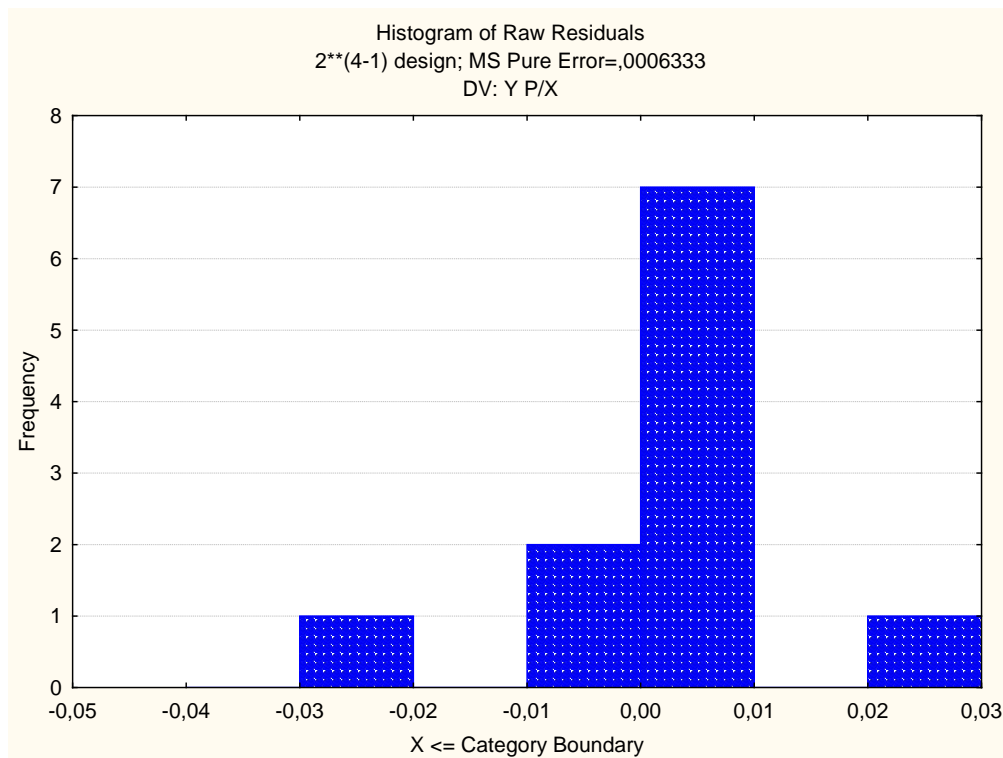


Figura 2. Gráfico de Residuos Y P/X *R. eutropha*

1.2. Análisis del rendimiento de producto basado en sustrato consumido

Tabla 2. ANOVA Y P/S *R. eutropha*

Regr. Coefficients; Var.:YP/S; R-sqr=,99833; Adj:,99166 (PHB fraccionario ralstonia) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,0001 DV: YP/S

	Regressn	Std.Err.	t(2)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,168750	0,003536	47,7297	0,000439	0,153538	0,183962
Curvatr.	-0,018750	0,006770	-2,7696	0,109391	-0,047879	0,010379
(1)Gly/Meth	-0,098750	0,003536	-27,9307	0,001279	-0,113962	-0,083538
(2)(NH₄)₂SO₄	0,053750	0,003536	15,2028	0,004299	0,038538	0,068962
(3)KH₂PO₄	-0,023750	0,003536	-6,7175	0,021450	-0,038962	-0,008538
(4)Na₂HPO₄,12H₂O	-0,021250	0,003536	-6,0104	0,026583	-0,036462	-0,006038
1 by 2	-0,013750	0,003536	-3,8891	0,060207	-0,028962	0,001462
1 by 3	-0,021250	0,003536	-6,0104	0,026583	-0,036462	-0,006038
1 by 4	-0,023750	0,003536	-6,7175	0,021450	-0,038962	-0,008538

Se validan todos los coeficientes de los efectos encontrados en el análisis anterior ($p < 0.05$). El efecto de curvatura no es significativo estadísticamente ($p > 0.05$).

En el siguiente gráfico se observa la linealidad entre los datos experimentales y los predichos por el modelo.

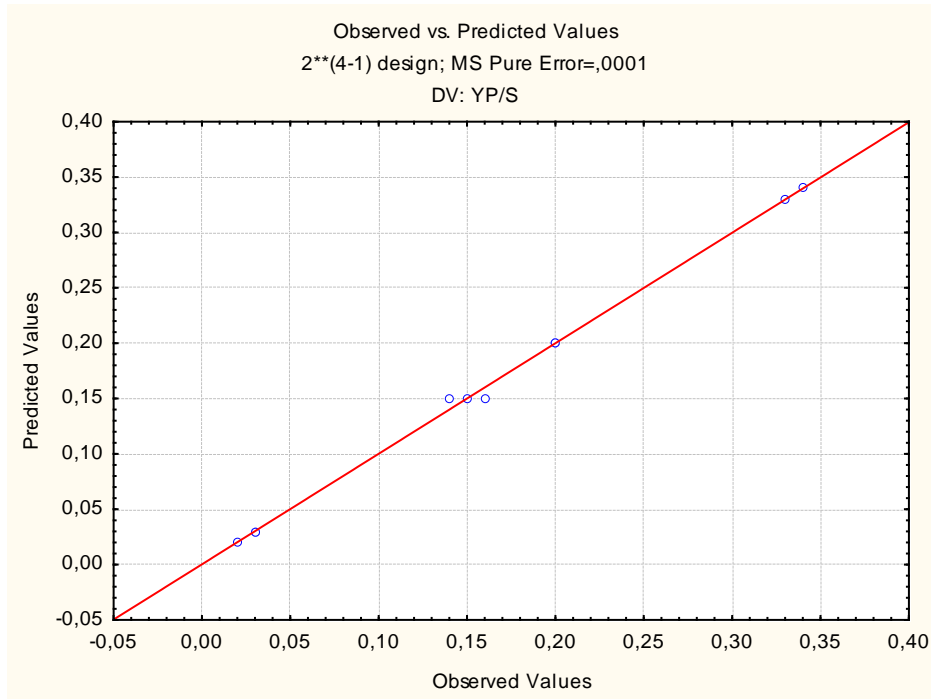


Figura 3. Valores observados vs predichos por modelo YP/S *R. eutropha*

El histograma de los residuos, presenta una distribución normal, validando el modelo.

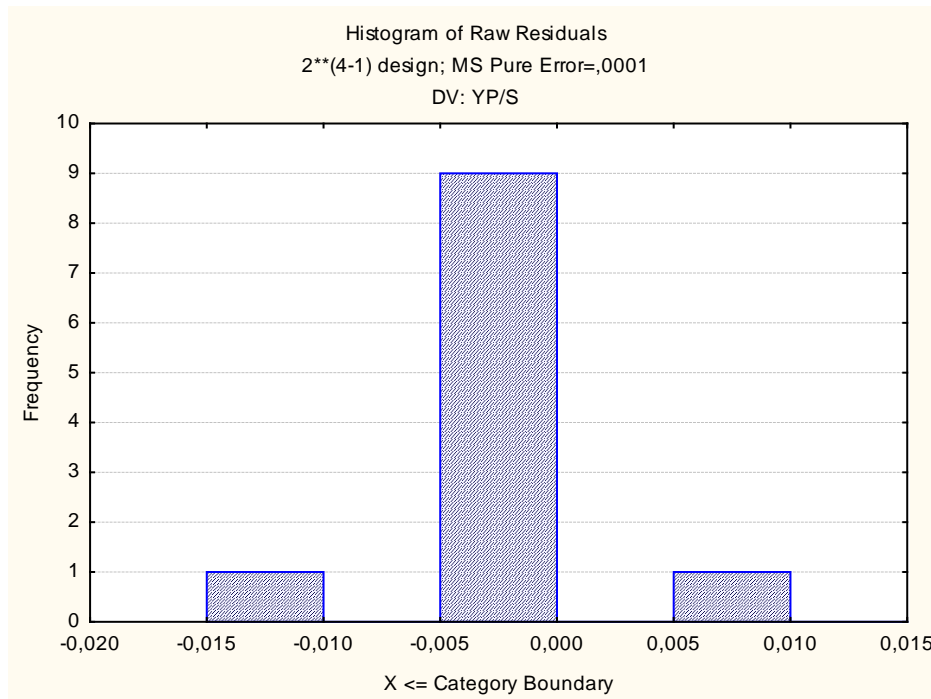


Figura 4. Histograma de distribución de residuos Y P/S *R. eutropha*

1.3. Análisis de la productividad específica de producto

En la Tabla 3 se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente.

Tabla 3. ANOVA qP *R.eutropha*

Regr. Coefficients; Var.:qP; R-sqr=,98865; Adj.,94324 (PHB fraccionario ralstonia) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,0000003 DV: qP

	Regressn	Std.Err.	t(2)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,005750	0,000204	28,1691	0,001258	0,004872	0,006628
Curvatr.	-0,001083	0,000391	-2,7716	0,109255	-0,002765	0,000598
(1)Gly/Meth	-0,000250	0,000204	-1,2247	0,345346	-0,001128	0,000628
(2)(NH₄)₂SO₄	-0,002250	0,000204	-11,0227	0,008130	-0,003128	-0,001372
(3)KH₂PO₄	-0,001000	0,000204	-4,8990	0,039231	-0,001878	-0,000122
(4)Na₂HPO₄,12H₂O	-0,000500	0,000204	-2,4495	0,133975	-0,001378	0,000378
1 by 2	0,000250	0,000204	1,2247	0,345346	-0,000628	0,001128
1 by 3	0,000500	0,000204	2,4495	0,133975	-0,000378	0,001378
1 by 4	0,000500	0,000204	2,4495	0,133975	-0,000378	0,001378

Se verifica la linealidad entre los valores observados y los predichos por el modelo, en el siguiente gráfico.

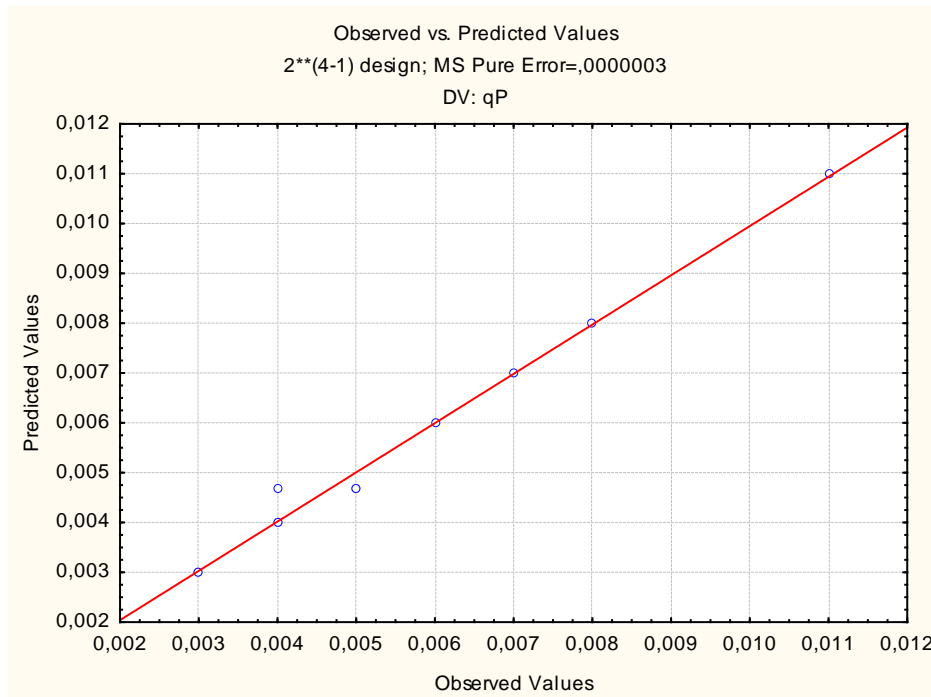


Figura 5. Valores observados vs predichos qP *R.eutropha*

El histograma de residuos verifica una distribución de tipo normal en los mismos.

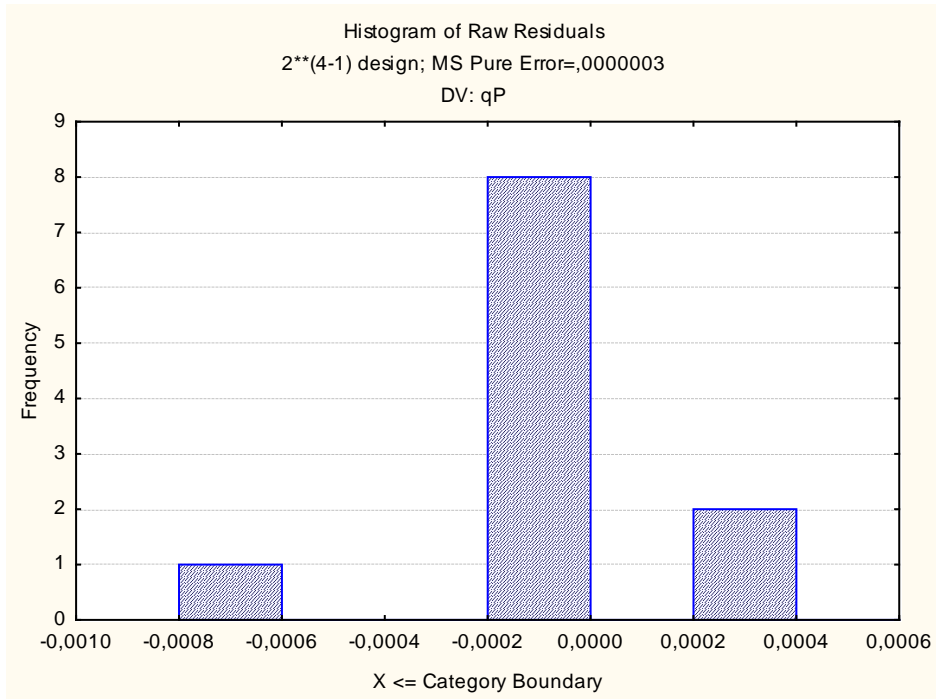


Figura 6. Histograma de residuos qP *R.eutropha*

1.4. Análisis de la productividad volumétrica de producto

En la Tabla 4 se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente.

Tabla 4. ANOVA QP *R.eutropha*

Effect Estimates; Var.:QP; R-sqr=,99939; Adj:,99696 (PHB fraccionario ralstonia) 2**(4-1) design; MS Pure Error=0 DV: QP										
	Effect	Std.Er r.	t(2)	p	-95,%	+95,%	Coeff.	Std.Er r.	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,0102 13	0,000 054	189,0 988	0,000 028	0,0099 80	0,0104 45	0,0102 13	0,000 054	0,0099 80	0,0104 45
Curvatr.	0,0083 08	0,000 207	40,17 03	0,000 619	0,0074 18	0,0091 98	0,0041 54	0,000 103	0,0037 09	0,0045 99
(1)Gly/Meth	- 0,0019 75	0,000 108	- 18,28 49	0,002 978	- 0,0024 40	- 0,0015 10	- 0,0009 87	0,000 054	- 0,0012 20	- 0,0007 55
(2)(NH₄)₂SO₄	- 0,0006 75	0,000 108	- 6,249 3	0,024 663	- 0,0011 40	- 0,0002 10	- 0,0003 38	0,000 054	- 0,0005 70	- 0,0001 05
(3)KH₂PO₄	- 0,0022 25	0,000 108	- 20,59 95	0,002 348	- 0,0026 90	- 0,0017 60	- 0,0011 13	0,000 054	- 0,0013 45	- 0,0008 80
(4)Na₂HPO₄, 12H₂O	0,0015 75	0,000 108	14,58 17	0,004 670	0,0011 10	0,0020 40	0,0007 87	0,000 054	0,0005 55	0,0010 20
1 by 2	0,0015 25	0,000 108	14,11 88	0,004 979	0,0010 60	0,0019 90	0,0007 62	0,000 054	0,0005 30	0,0009 95
1 by 3	0,0020 75	0,000 108	19,21 08	0,002 699	0,0016 10	0,0025 40	0,0010 37	0,000 054	0,0008 05	0,0012 70
1 by 4	0,0010 75	0,000 108	9,952 6	0,009 945	0,0006 10	0,0015 40	0,0005 37	0,000 054	0,0003 05	0,0007 70

A continuación se presenta el gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales.

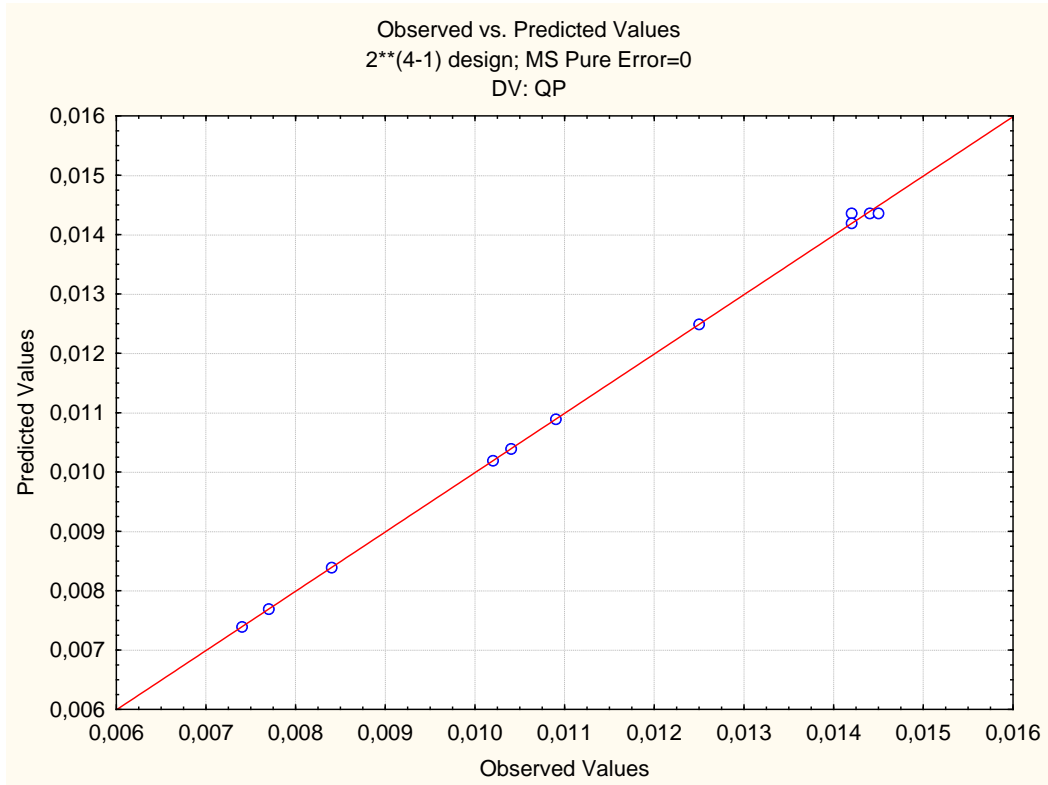


Figura 7. Gráfico de valores predichos y observados QP
 Haciendo un análisis del histograma de residuos, presentan una distribución normal.

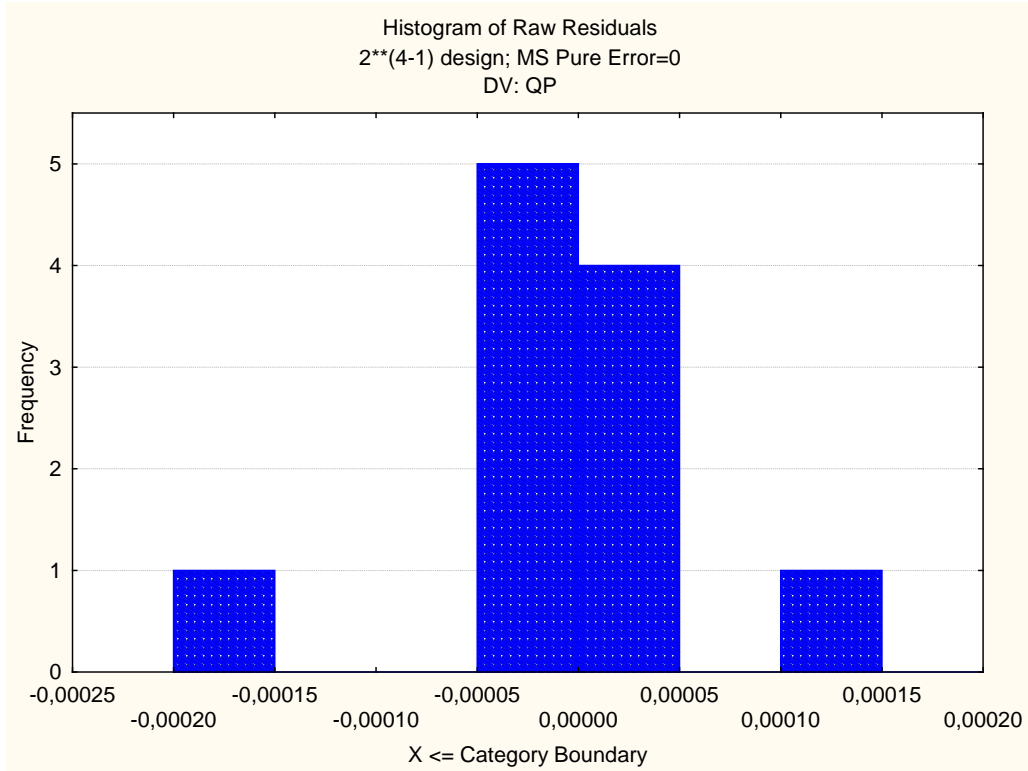


Figura 8. Histograma QP R. eutropha

1.5. Análisis de la producción de biomasa

Tabla 5. Análisis estadístico de la producción de biomasa en *R. eutropha*

Ensayos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X(g/L)	Efectos	Error	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	-1	1,24	SG Media	2,443 ± 0,13	19,527	0,003	1 234
2	1	-1	-1	1	1,35	C1	-0,061 ± 0,29	0,2074	0,855	2 134
3	-1	1	-1	1	3,27	SG C2	1,529 ± 0,29	5,2124	0,035	3 124
4	1	1	-1	-1	1,95	C3	0,389 ± 0,29	1,3265	0,316	4 123
5	-1	-1	1	1	1,85	C4	0,979 ± 0,29	3,3376	0,079	12 34
6	1	-1	1	-1	1,09	C12	0,261 ± 0,29	0,8891	0,468	13 24
7	-1	1	1	-1	2,35	C13	0,541 ± 0,29	1,8435	0,207	14 23
8	1	1	1	1	4,07	C14	0,211 ± 0,29	0,7187	0,547	
pc1	0	0	0	0	2,85	Nivel de significancia α:			0,050	
pc2	0	0	0	0	3,15					
pc3	0	0	0	0	3,67					
					Media - pc	3,227				
					Varianza - pc	0,172				
					Desv. Std - pc	0,415				

50 2

Tabla 6. ANOVA para la producción de biomasa en *R. eutropha*

ANOVA; Var.:Biomasa; R-sqr=,9675; Adj:,.83752 (biomasa ralstonia) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,1721333 DV: Biomasa					
	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	2,53506	1	2,535064	14,72733	0,061685
(1)Glicerol/Metanol	0,00740	1	0,007401	0,04300	0,854926
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄	4,67670	1	4,676701	27,16906	0,034892
(3)Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	0,30290	1	0,302901	1,75969	0,315865
(4)KH ₂ PO ₄ KH ₂ PO ₄	1,91753	1	1,917535	11,13982	0,079244
1 by 2	0,13607	1	0,136068	0,79048	0,467762
1 by 3	0,58500	1	0,585001	3,39854	0,206571
1 by 4	0,08890	1	0,088901	0,51647	0,546971
Pure Error	0,34427	2	0,172133		
Total SS	10,59384	10			

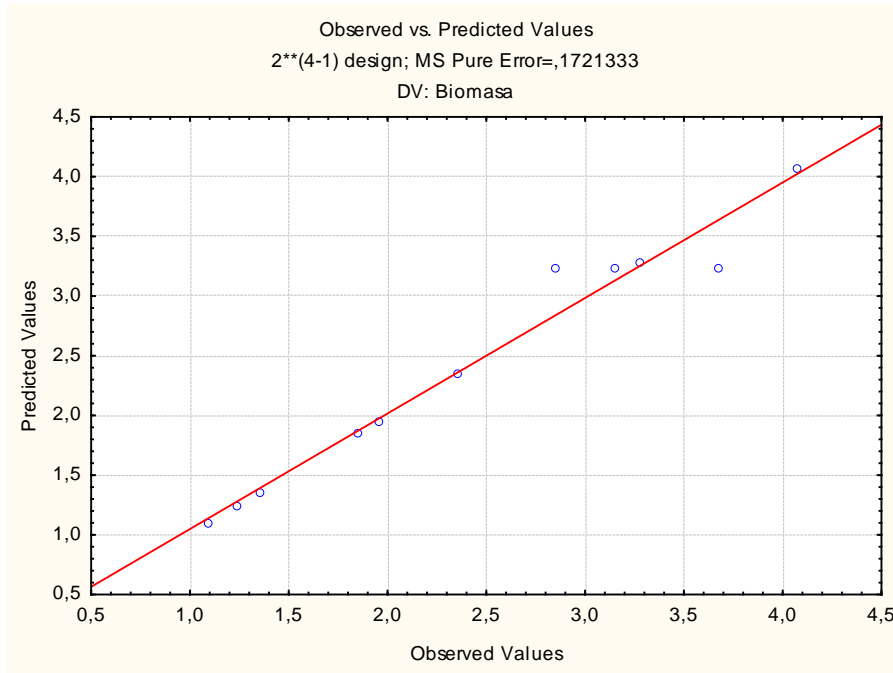


Figura 9. Gráfico de valores predichos y observados producción de biomasa

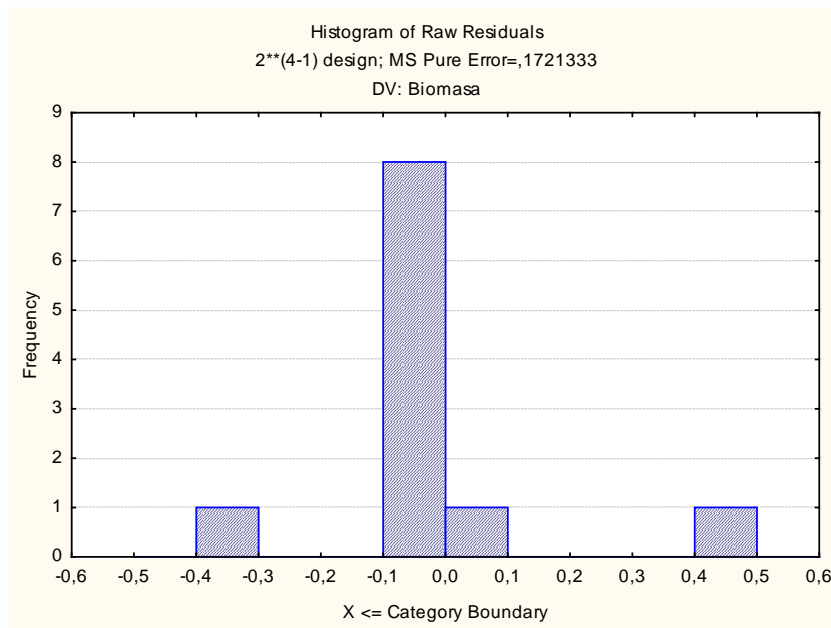


Figura 10. Histograma de residuos para producción de biomasa en *R.eutropha*

Se determinan los niveles de los factores que maximizan la producción de biomasa (nivel +1, en todos los factores) (Figura 11).

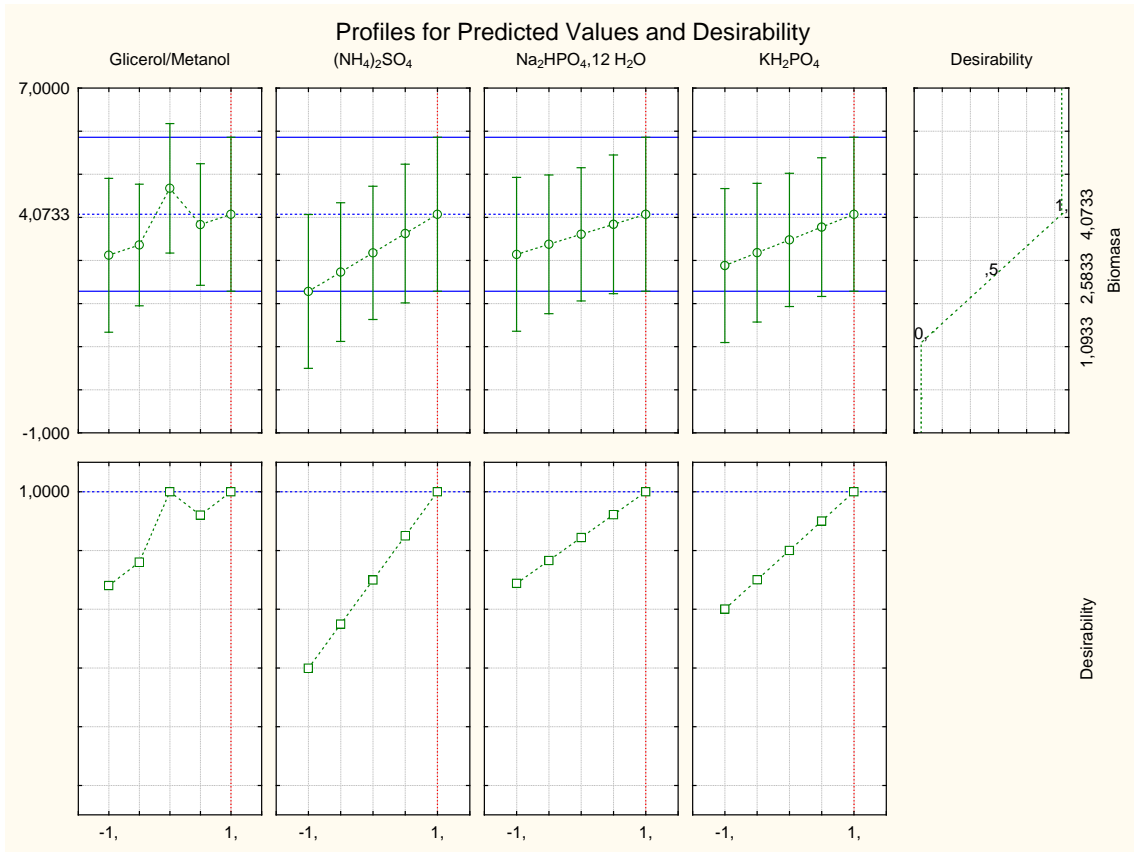


Figura 11. Perfiles de predicción para la formación de biomasa en *R. extorquens*

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA *M. extorquens*.

2.1. Evaluación del rendimiento de producto en función del sustrato consumido

En la Tabla 7 se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo no es significativo estadísticamente.

Tabla 7. ANOVA YP/S en *M. extorquens*

ANOVA; Var.:YP/S; R-sqr=,99833; Adj: ,99166 (PHB fraccionario metilo) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,0001 DV: YP/S

	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0,000767	1	0,000767	7,6705	0,109391
(1)Gly/Meth	0,078013	1	0,078013	780,1250	0,001279
(2)(NH4)2SO4	0,023113	1	0,023113	231,1250	0,004299
(3)KH2PO4	0,004513	1	0,004513	45,1250	0,021450
(4)Na2HPO4,12H2O	0,003612	1	0,003612	36,1250	0,026583
1 by 2	0,001513	1	0,001513	15,1250	0,060207
1 by 3	0,003612	1	0,003612	36,1250	0,026583
1 by 4	0,004513	1	0,004513	45,1250	0,021450
Pure Error	0,000200	2	0,000100		
Total SS	0,119855	10			

A continuación se presenta el gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales.

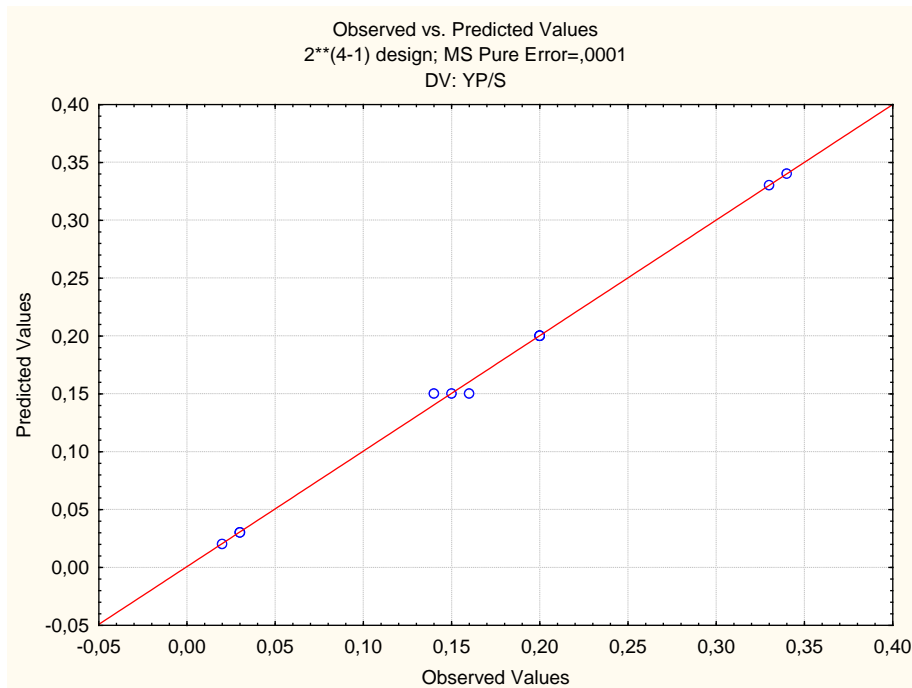


Figura 12. Valeres predichos vs valores observados en *M. extorquens*

Para culminar la validación del modelo se presenta el histograma de los residuos, en que se observa una distribución normal.

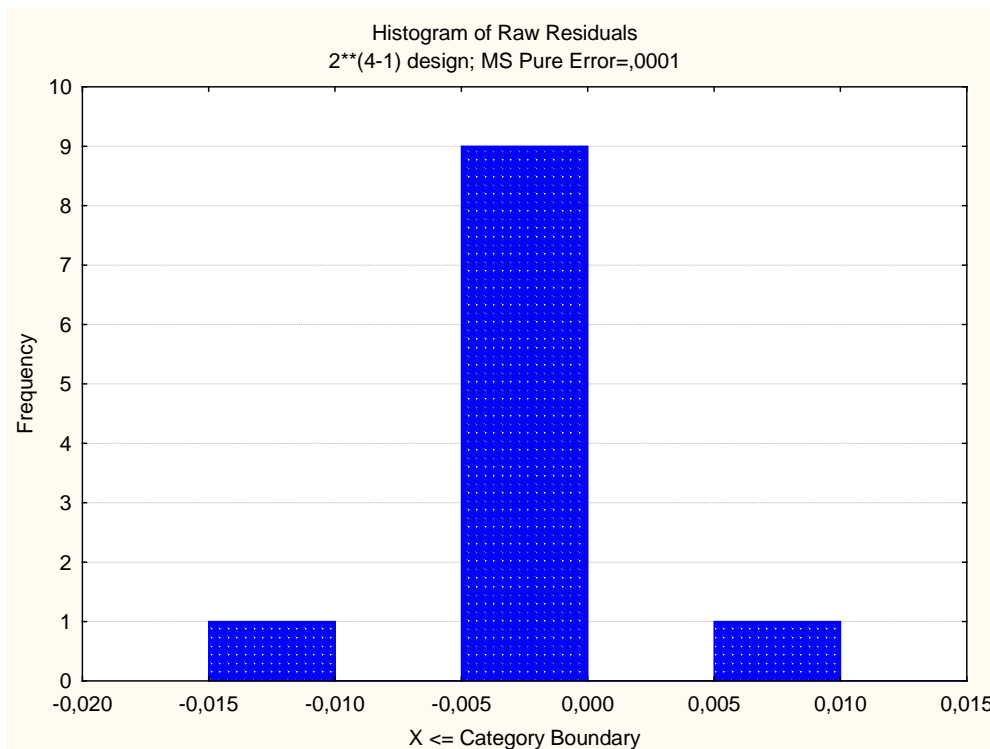


Figura 13. Histograma YP/S *M. extorquens*

2.2. Evaluación del rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido.

En la Tabla 8 se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo es significativo estadísticamente.

Tabla 8. ANOVA YX/S en *M. extorquens*

Regr. Coefficients; Var.:YX/S; R-sqr=,99797; Adj:,98986 (PHB fraccionario metilo) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,0004 DV: YX/S						
	Regressn	Std.Err.	t(2)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,352500	0,007071	49,8510	0,000402	0,322076	0,382924
Curvatr.	-0,062500	0,013540	-4,6159	0,043868	-0,120758	-0,004242
(1)Gly/Meth	-0,177500	0,007071	-25,1023	0,001583	-0,207924	-0,147076
(2)(NH4)2SO4	0,092500	0,007071	13,0815	0,005793	0,062076	0,122924
(3)KH2PO4	-0,017500	0,007071	-2,4749	0,131757	-0,047924	0,012924
(4)Na2HPO4,12H2O	-0,012500	0,007071	-1,7678	0,219131	-0,042924	0,017924
1 by 2	-0,017500	0,007071	-2,4749	0,131757	-0,047924	0,012924
1 by 3	-0,067500	0,007071	-9,5459	0,010797	-0,097924	-0,037076
1 by 4	-0,052500	0,007071	-7,4246	0,017661	-0,082924	-0,022076

A continuación se presenta el gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales.

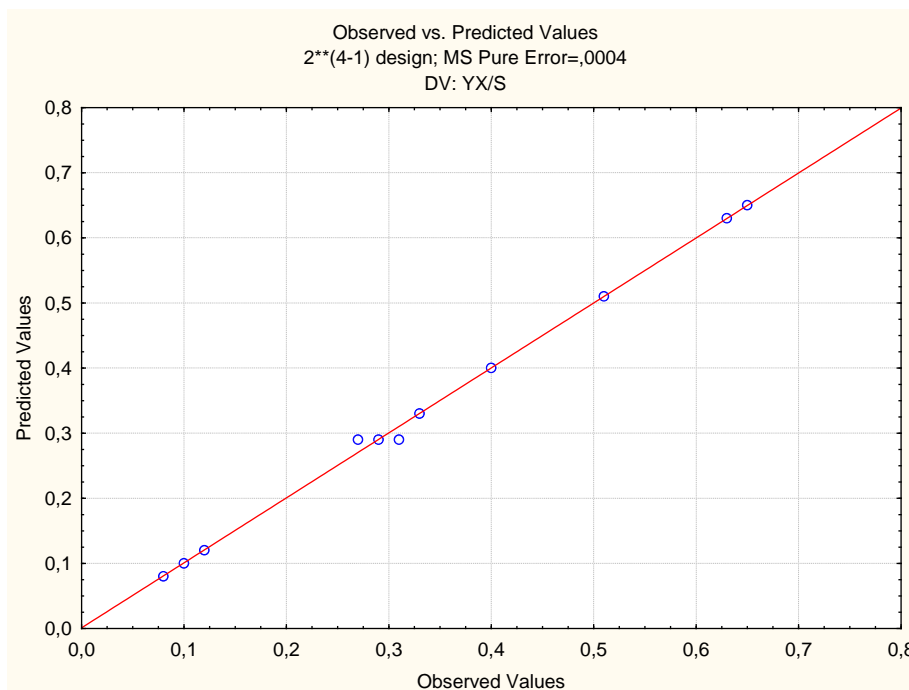


Figura 14. Gráfico de valores predichos vs observados Y X/S en *M. extorquens*

En el siguiente gráfico se presenta la distribución de los residuos.

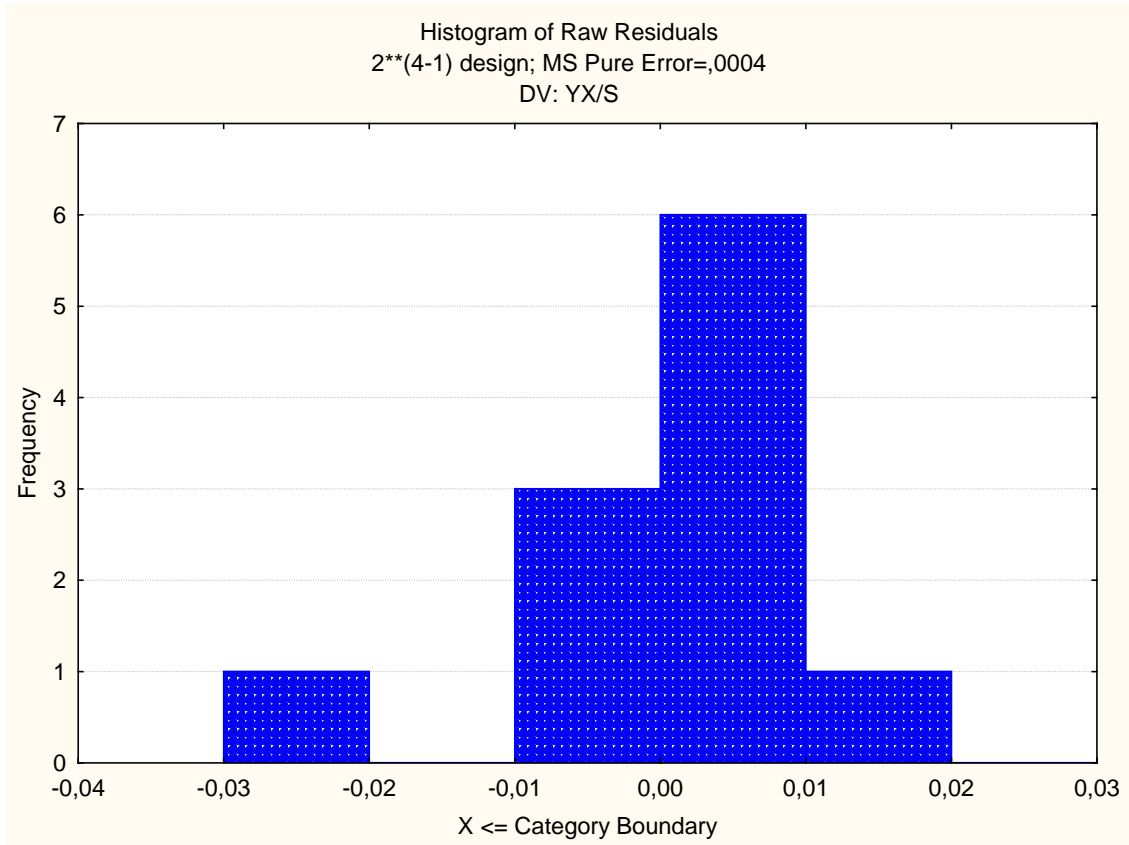


Figura 15. Histograma YX/S *M. extorquens*

2.3. Evaluación del rendimiento de producto en función de la biomasa generada.

A continuación se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo es significativo estadísticamente.

Tabla 9. ANOVA YP/X en *M. extorquens*

Regr. Coefficients; Var.:Y P/X; R-sqr=,99954; Adj:,99772 (PHB fraccionario metilo) 2**(4-1) design; MS Pure Error=,0000333 DV: Y P/X

	Regressn	Std.Err.	t(2)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,432500	0,002041	211,8809	0,000022	0,423717	0,441283
Curvatr.	0,084167	0,003909	21,5333	0,002150	0,067349	0,100984
(1)Gly/Meth	-0,085000	0,002041	-41,6413	0,000576	-0,093783	-0,076217
(2)(NH₄)₂SO₄	0,017500	0,002041	8,5732	0,013334	0,008717	0,026283
(3)KH₂PO₄	-0,077500	0,002041	-37,9671	0,000693	-0,086283	-0,068717
(4)Na₂HPO₄,12H₂O	-0,040000	0,002041	-19,5959	0,002594	-0,048783	-0,031217
1 by 2	0,005000	0,002041	2,4495	0,133975	-0,003783	0,013783
1 by 3	-0,030000	0,002041	-14,6969	0,004598	-0,038783	-0,021217
1 by 4	0,017500	0,002041	8,5732	0,013334	0,008717	0,026283

A continuación se presenta el gráfico del ajuste de los valores predichos por el modelo contra los valores experimentales.

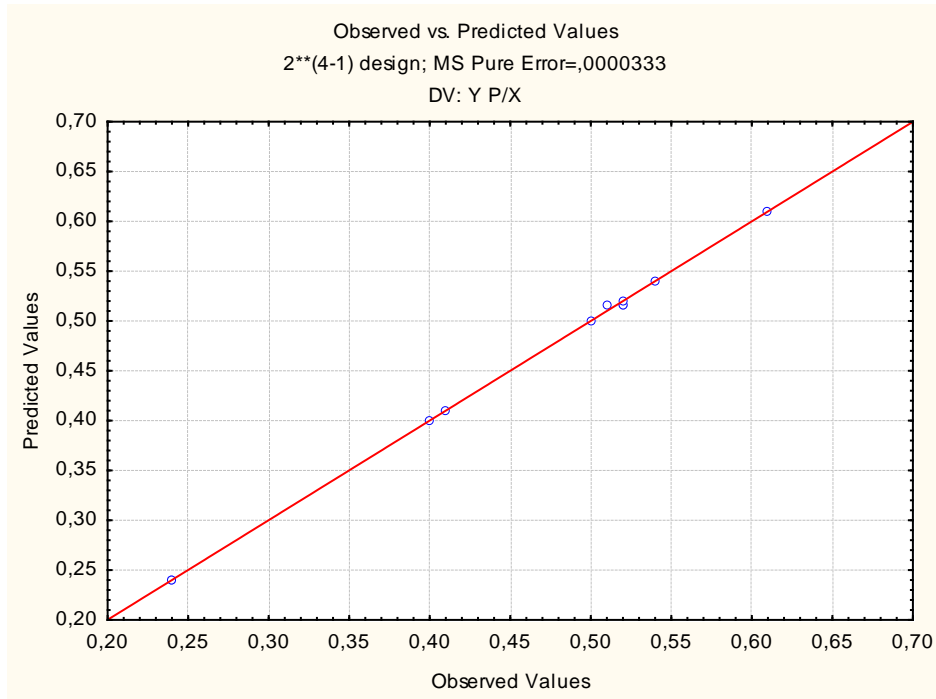


Figura 16. Gráfico valores predichos vs valores observados Y P/X en *M. extorquens*

En el siguiente gráfico se presenta la distribución de los residuos.

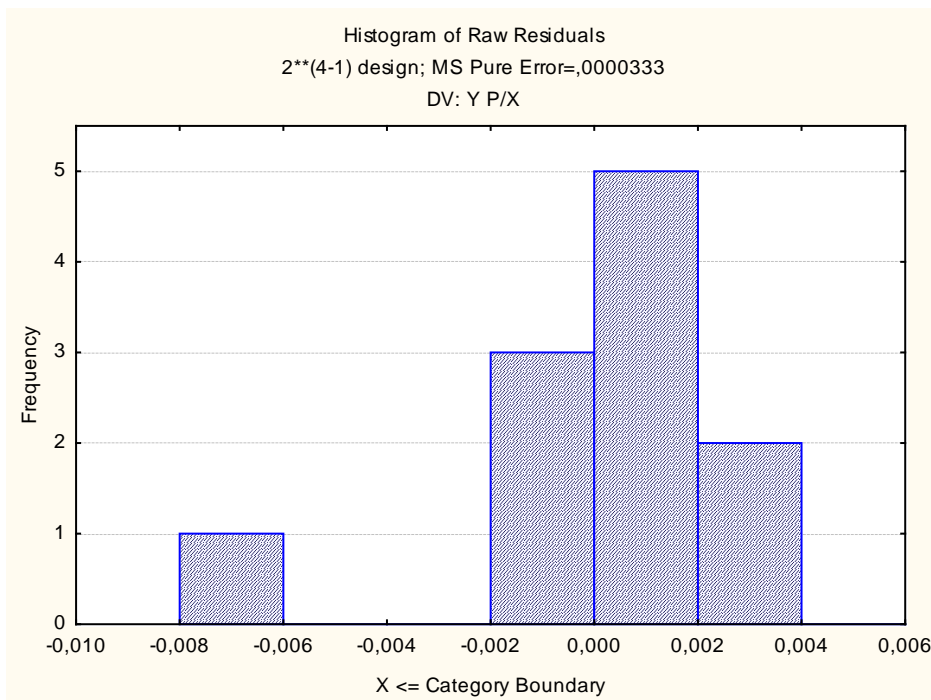


Figura 17. Histograma Y P/X en *M. extorquens*

2.4. Evaluación de la productividad específica de producto

A continuación se presenta el ANOVA para el modelo presentado, validando los coeficientes (efectos C) analizados, mediante test de Fisher. El efecto de curvatura en el modelo es significativo estadísticamente.

Tabla 10. ANOVA qP *M. extorquens*.

Effect Estimates; Var.:qP; R-sqr=,99959; Adj:,99794 (PHB fraccionario metilo) 2**(4-1) design; MS Pure Error=0 DV: qP										
	Effect	Std.Er r.	t(2)	p	-95,%	+95,%	Coeff.	Std.Er r.	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,0045 13	0,0000 20	221,06 64	0,0000 20	0,0044 25	0,0046 00	0,0045 13	0,0000 20	0,0044 25	0,0046 00
Curvatr.	0,0017 08	0,0000 78	21,853 1	0,0020 87	0,0013 72	0,0020 45	0,0008 54	0,0000 39	0,0006 86	0,0010 22
(1)Gly/Meth	- 0,0017 75	0,0000 41	- 43,478 4	0,0005 29	- 0,0019 51	- 0,0015 99	- 0,0008 88	0,0000 20	- 0,0009 75	- 0,0008 00
(2)(NH₄)₂SO₄	0,0003 75	0,0000 41	9,1856	0,0116 45	0,0001 99	0,0005 51	0,0001 87	0,0000 20	0,0001 00	0,0002 75
(3)KH₂PO₄	- 0,0008 75	0,0000 41	- 21,433 0	0,0021 70	- 0,0010 51	- 0,0006 99	- 0,0004 38	0,0000 20	- 0,0005 25	- 0,0003 50
(4)Na₂HPO₄,12 H₂O	- 0,0016 25	0,0000 41	- 39,804 2	0,0006 31	- 0,0018 01	- 0,0014 49	- 0,0008 13	0,0000 20	- 0,0009 00	- 0,0007 25
1 by 2	0,0000 75	0,0000 41	1,8371	0,2075 94	- 0,0001 01	0,0002 51	0,0000 38	0,0000 20	- 0,0000 50	0,0001 25
1 by 3	0,0004 25	0,0000 41	10,410 3	0,0091 01	0,0002 49	0,0006 01	0,0002 13	0,0000 20	0,0001 25	0,0003 00
1 by 4	- 0,0006 25	0,0000 41	- 15,309 3	0,0042 40	- 0,0008 01	- 0,0004 49	- 0,0003 12	0,0000 20	- 0,0004 00	- 0,0002 25

Se presenta en el siguiente gráfico la relación lineal entre los valores observados y los predichos por el modelo.

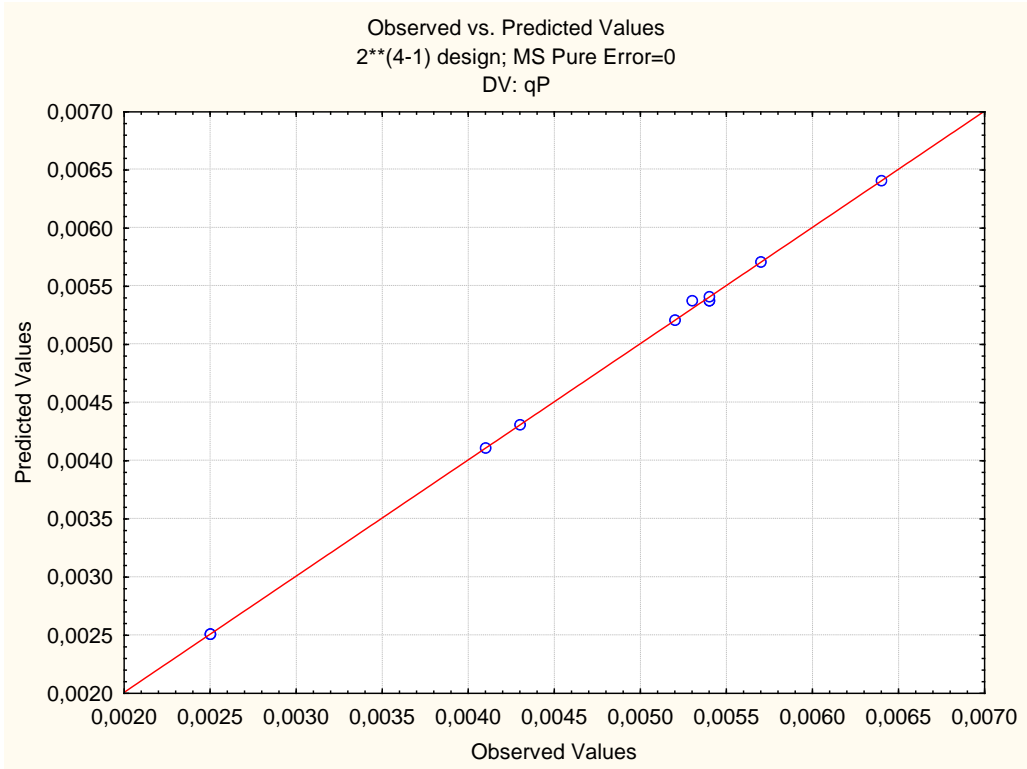


Figura 18. Gráfico de valores predichos vs valores observados qP *M. extorquens*

A continuación se presenta la distribución de los residuos

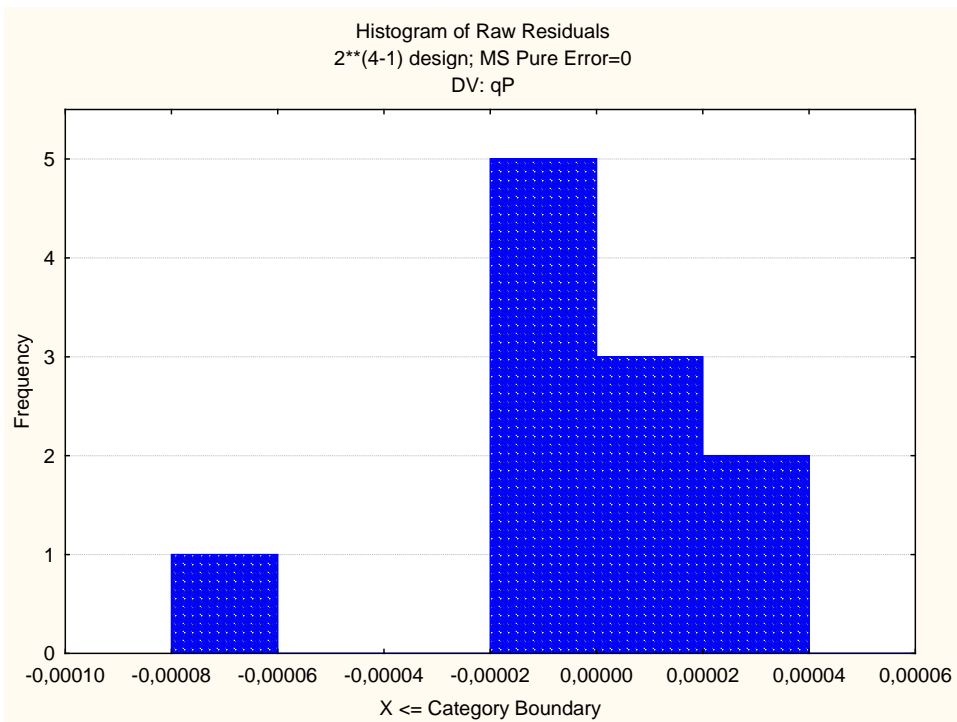


Figura 19. Histograma de residuos estandarizados qP *M. extorquens*

ANEXO

Capítulo 7

TABLA DE CONTENIDO

1. PROGRAMACIÓN EN MATLAB PARA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS	197
Cinética de Khanna con Inhibición	197
Monod	198
Moser	198
Tessier	198
Aiba	199
Andrews	199
Mulchandani	199
Khanna sin inhibición	200
2. GRÁFICOS DE NORMALIDAD DE RESIDUOS.....	201
3. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	203
4. FEDBATCH	203

1. PROGRAMACIÓN EN MATLAB PARA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS

```
function sum=SumSqr(Beta,data)
global Feval SumSave
Feval=Feval+1;
time=data(:,1);
ym=data(:,2:end);
yc(1,:)=ym(1,:);
[nr,nc]=size(ym); % nr - numero de puntos;
                    % nc - numero de variables dependientes
tspan = [time(1) time(2)]; % Rango de variables independientes
y0 = ym(1,:); % Valor inicial para variables dependientes
for i=2:nr
    [t,y]=ode45(@ODEfun(nombre de la función según
cinética),tspan,y0,[],Beta);
    yc(i,:)=y(end,:);
    if i<nr
        tspan = [time(i) time(i+1)];
        y0 = yc(i,:);
    end
end
sum=0;
for ic=1:nc
    sum=sum+(ym(:,ic)-yc(:,ic))* (ym(:,ic)-yc(:,ic));
end
if sum< SumSave*0.9
    disp([' No. ' num2str(Feval) ' SumSqr ' num2str(sum)]);
    SumSave=sum;
end
```

Cinética de Khanna con Inhibición

```
function dYfuncvecdt = ODEfung(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1); %R
y2 = Yfuncvec(2); %PHA
y3 = Yfuncvec(3); %Glicerol
y4 = Yfuncvec(4); %Sulfato de Amonio
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
b7=Beta(7);
b8=Beta(8);
b9=Beta(9);
b10=Beta(10);
b11=Beta(11);
b12=Beta(12);
b13=Beta(13);
u=b1*(y3^b2/(y3^b2+b3^b2))* (y4^b4/(y4^b4+b5^b4))* (1-(y3/b7)^b6)*(1-
(y4/b9)^b8);
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b10*y1;
dy3dt=-b11*u*y1-b12*b10*y1;
dy4dt=-(u*b13)*y1;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];
```

Monod

```
function dYfuncvecdt = ODEfunmon(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
u=b1*(y4/(y4+b2));
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b3*y1;
dy3dt=-b4*u*y1-b5*b3*y1;
dy4dt=-u*y1*b6;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];
```

Moser

```
function dYfuncvecdt = ODEfunmos(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
b7=Beta(7);
u=b1*(y4^b2/(y4^b2+b3));
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b4*y1;
dy3dt=-b5*u*y1-b6*b4*y1;
dy4dt=-u*y1*b7;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];
```

Tessier

```
function dYfuncvecdt = ODEfuntes(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
u=b1*(1-y4*exp(-y4/b2));
```

```

dy1dt=u*y1;
dy2dt=b3*y1;
dy3dt=-b4*u*y1-b5*b3*y1;
dy4dt=-u*y1*b6;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];

```

Aiba

```

function dYfuncvecdt = ODEfunaiba(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
b7=Beta(7);
u=b1*(y4/(y4+b2))*exp(-y4/b3);
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b4*y1;
dy3dt=-b5*u*y1-b6*b4*y1;
dy4dt=-u*y1*b7;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];

```

Andrews

```

function dYfuncvecdt = ODEfunand(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
b7=Beta(7);
u=b1/((1+b2/y4)*(1+y4/b3));
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b4*y1;
dy3dt=-b5*u*y1-b6*b4*y1;
dy4dt=-u*y1*b7;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];

```

Mulchandani

```

function dYfuncvecdt = ODEfunmul(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);

```

```

b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
b7=Beta(7);
b8=Beta(8);
u=b1*((y3/y4)/(y3/y4+b3))*(1-((y3/y4)/b3)^b4);
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b5*y1;
dy3dt=-b6*u*y1-b7*b5*y1;
dy4dt=-u*y1*b8;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];

```

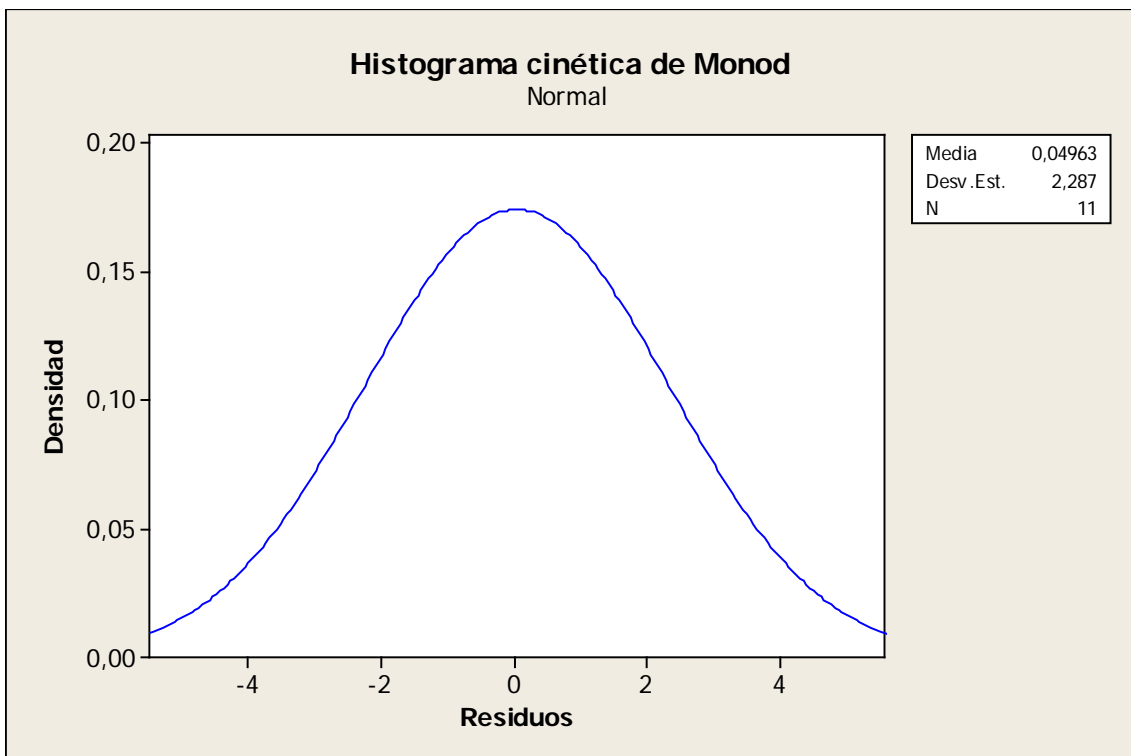
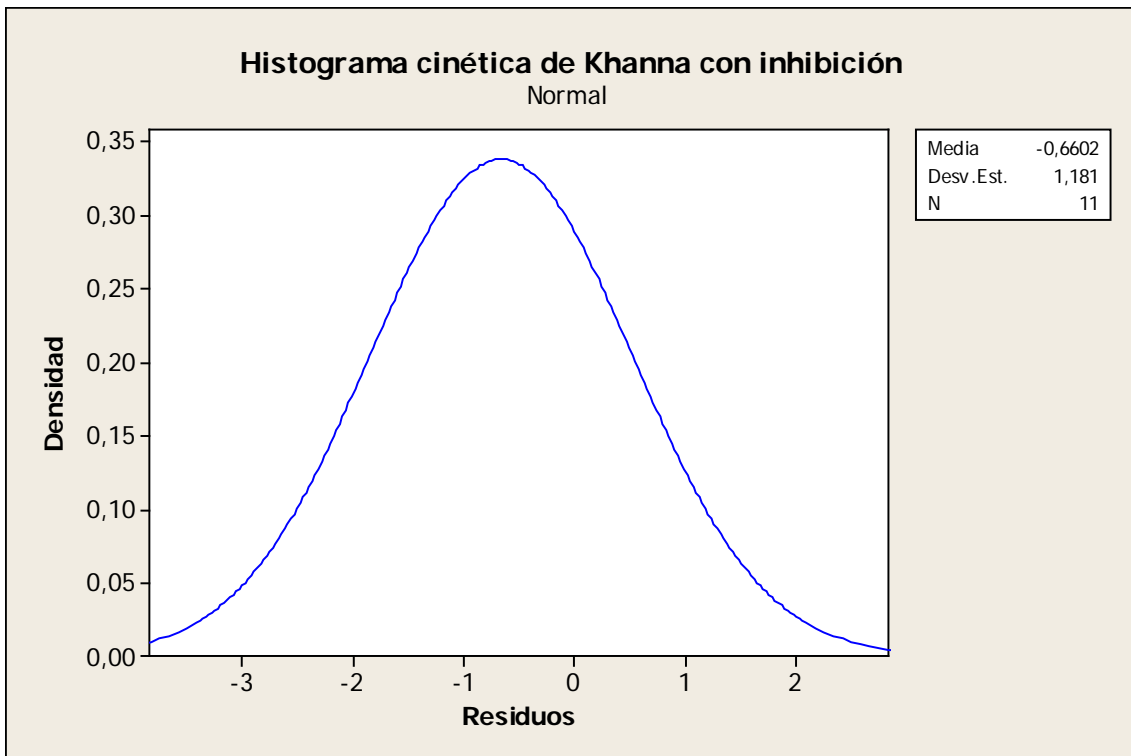
Khanna sin inhibición

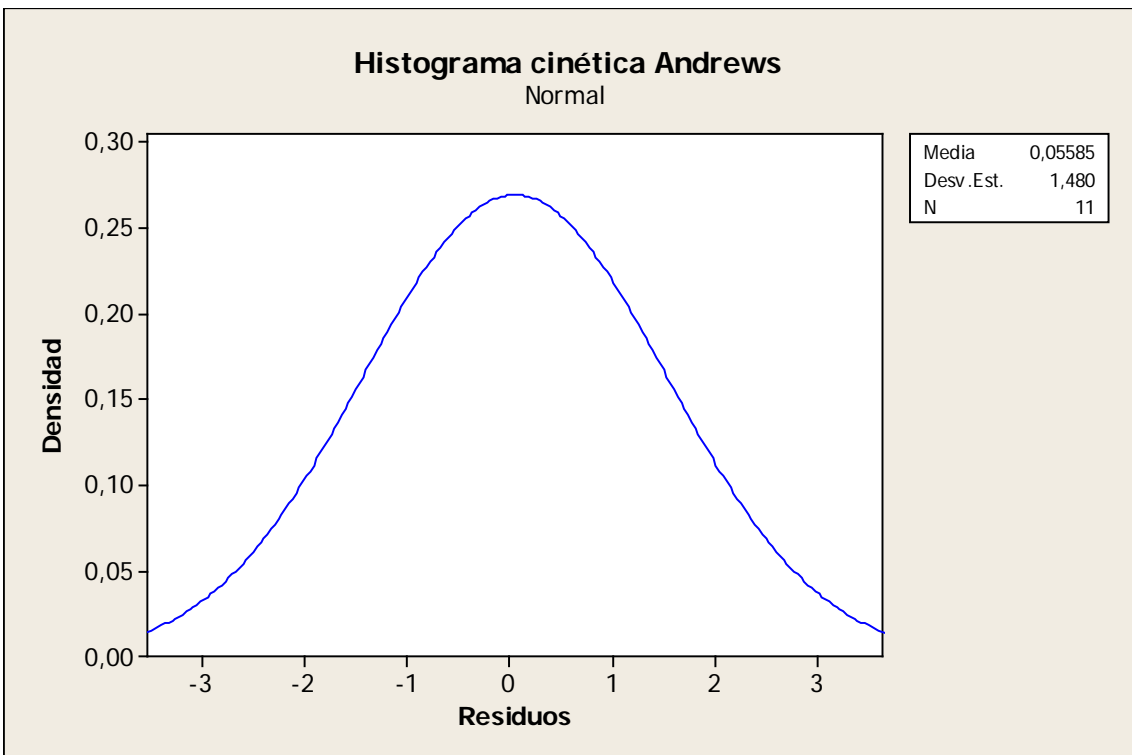
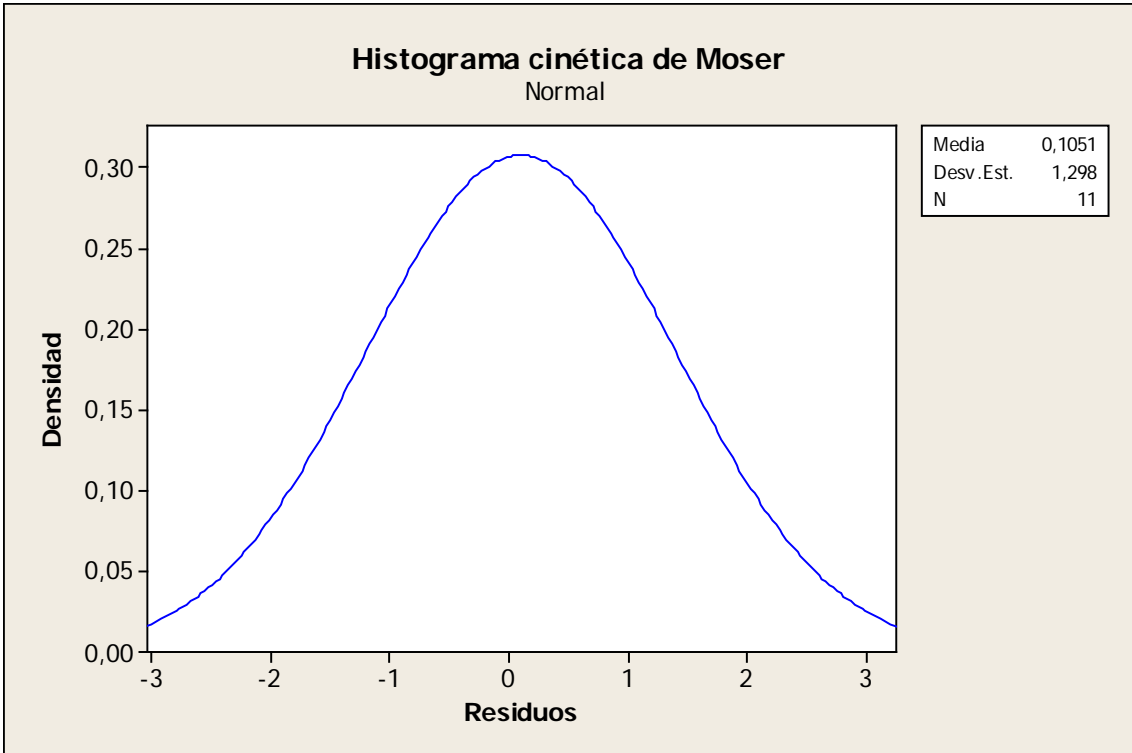
```

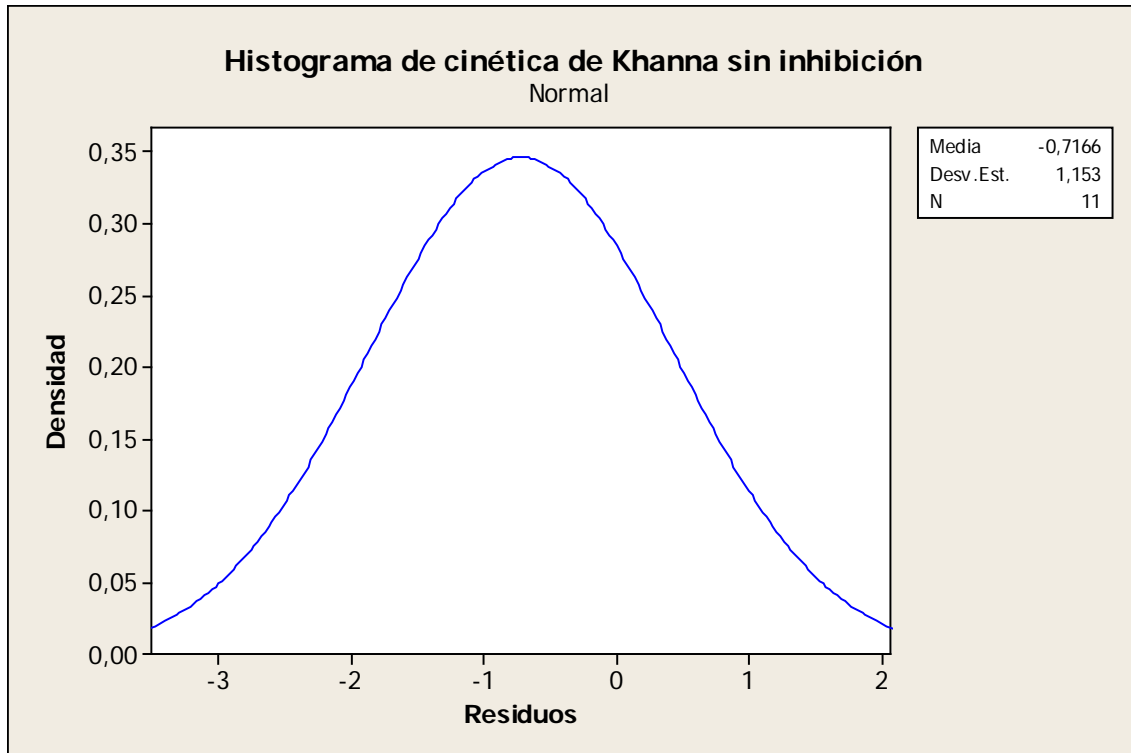
function dYfuncvecdt = ODEfundobe(t,Yfuncvec,Beta)
y1 = Yfuncvec(1);
y2 = Yfuncvec(2);
y3 = Yfuncvec(3);
y4 = Yfuncvec(4);
b1=Beta(1);
b2=Beta(2);
b3=Beta(3);
b4=Beta(4);
b5=Beta(5);
b6=Beta(6);
b7=Beta(7);
b8=Beta(8);
b9=Beta(9);
u=b1*(y3^b2/(y3^b2+b3^b2))*(y4^b4/(y4^b4+b5^b4));
dy1dt=u*y1;
dy2dt=b6*y1;
dy3dt=-b7*u*y1-b8*b6*y1;
dy4dt=-(u*b9)*y1;
dYfuncvecdt = [dy1dt; dy2dt; dy3dt; dy4dt];

```

2. GRÁFICOS DE NORMALIDAD DE RESIDUOS







3. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

```
function R2 = rsquare(y,yhat)
if nargin ~= 2
    error('2 argumentos de entrada!');
end
yhat=reshape(yhat,1,size(yhat,1)*size(yhat,2));
y=reshape(y,1,size(y,1)*size(y,2));
while sum(isnan(y))~=0 || sum(isnan(yhat))~=0
    if sum(isnan(y)) >= sum(isnan(yhat))
        yhat(isnan(y))=[];
        y(isnan(y))=[];
    else
        y(isnan(yhat))=[];
        yhat(isnan(yhat))=[];
    end
end
R2 = 1 - ( sum( (y-yhat).^2 ) / sum( (y-mean(y)).^2 ) );
if R2<0 || R2>1
    error(['R^2 of ',num2str(R2),' : yhat error!'])
end
```

4. FEDBATCH

```
function dYfuncvecdt = ODEfunProcFed(t,Yfuncvec);
Nr = Yfuncvec(1);
Ng = Yfuncvec(2);
Nn = Yfuncvec(3);
Nm = Yfuncvec(4);
Np = Yfuncvec(5);
V = Yfuncvec(6);
```

```

%Alimentación de glicerol en fase inicial (g/L)
GP = De acuerdo al diseño;
%Alimentación de biomasa residual en fase inicial (g/L)
RP=0;
%Alimentación de sulfato de amonio en fase inicial (g/L)
NP= De acuerdo al diseño;
%Alimentación de metanol en fase inicial (g/L)
MP= De acuerdo al diseño;
%Caudal en fase inicial (L/h)
FP = De acuerdo al diseño;
%Concentración de glicerol (g/L)
G = Ng / V;
%Concentración de biomasa residual (g/L)
R = Nr / V;
%Concentración de sulfato de amonio (g/L)
N = Nn / V;
%Concentración de metanol (g/L)
M = Nm / V;
%Concentración de PHA (g/L)
P = Np / V;
%cinética
u=0.85*(1-0.024*M)*(G^1.39/(G^1.39+61^1.39
))* (N^0.56/(N^0.56+0.0063^0.56));
%Balance de biomasa residual (g)
dNr dt = FP * RP + u * V * R;
%Balance de glicerol (g)
dNg dt = FP * GP - 1.2 * u * V * R - 0.000448 * R * V;
%Balance de sulfato de amonio (g)
dNndt = FP * NP - 0.07 * u * V * R;
%Balance de metanol (g)
dNm dt = FP * MP ;
%Balance de PHA (g)
dNp dt = 0.0056 * R * V;
%Culture volume (L)
dV dt = FP;

dYfuncvec dt = [dNr dt; dNg dt; dNndt; dNm dt; dNp dt; dV dt];

```

Abreviaturas y Nomenclatura

Conc.	Concentración
exp.	Experiencia
MCL	medium-chain length
Nº	Número
P	PHAs
P(3HB)	Polihidroxiбутirato
P(3HV)	Polihidroxi valerato
PA	Poliamida
PCL	Policaprolactona
PET	Polietilentereftalato
PHA	Polihidroxi alcanoato
PHB	Polihidroxi butirato
PHB	Polihidroxi butirato
PHBcoPHV	Copolímero PHB y PHV
PHV	Polihidroxi valerato
PLA	Ácido poliláctico
PP	Polipropileno
PTT	Plitrimetilentereftalato
PVC	Policloruro de vinilo
qP	Productividad volumétrica de producción de PHAs
QP	Productividad volumétrica de producto
QS	Productividad volumétrica de consumo de sustrato
qs	Productividad específica de consumo de sustrato
R	Biomasa residual
S1	Glicerol
S2	Sulfato de Amonio

SCL	short-chain length
TLCAN	Tratado de Libre Comercio de América del Norte
UE	Unión Europea
WVO	Waste vegetable oil
X	Biomasa
Y P/S	Rendimiento de producto basado en consumo de sustratos
Y P/X	Rendimiento de producto basado en biomasa generada
Y X/S	Rendimiento de biomasa basado en consumo de sustratos
μ	Velocidad específica de crecimiento

Producción de polihidroxicanoatos a partir de glicerol crudo: selección de microorganismos y optimización del medio de cultivo.

Guadalupe Martínez y Lylia Loperena

Departamento de Bioingeniería-Instituto de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería-UdelaR. Julio Herrera y Reissig 565
CP 11300-Montevideo-Uruguay.
(+5892)7110871-Fax (+5982)7115446
gmartine@fing.edu.uy

El futuro agotamiento de los recursos fósiles y los problemas de disposición final de los plásticos petroquímicos, están incrementando el interés en el mercado por los plásticos biodegradables. El mayor inconveniente en la penetración en el mercado de estos productos es su alto costo respecto a los derivados petroquímicos. Entre los plásticos biodegradables, los polihidroxicanoatos (PHA) son una familia diversa de poliésteres sintetizados por una amplia gama de microorganismos. Los PHAs son acumulados intracelularmente como respuesta a un desbalance de nutrientes en su ambiente, constituyendo una reserva de fuente de carbono y energía dentro de microorganismos para su sobrevivencia durante periodos de escasez. El crecimiento de la industria del biodiesel a nivel mundial ha generado una sobreproducción de glicerina, con la consiguiente baja de su precio debido a las impurezas presentes. Dado que el precio actual del glicerol se ha vuelto muy competitivo con los azúcares usados para la producción de químicos y combustibles, la vía de fermentación microbiana es una opción para su aprovechamiento que está siendo re-evaluada. EL objetivo del presente trabajo es la selección de microorganismos productores de PHAs. Se optimizará un medio de cultivo, que sea de bajo costo y de alto rendimiento, utilizando como fuente de carbono glicerol y metanol (modelado como subproducto del biodiesel). La optimización será realizada utilizando un diseño experimental, a distintas escalas comenzando con matraces y verificando los resultados en escala de fermentadores.

Para la selección de microorganismos productores se utilizaron cepas pertenecientes al Dpto. de Bioingeniería y cepas adquiridas en ceparios. Además se planteo una estrategia de aislamiento de cepas de un efluente de biodiesel proporcionado por un productor local.

Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido (tubos) y en medio sólido (placas). La presencia de acumulaciones de PHA se determinó mediante tinción violeta cristal en medio líquido y fluorescencia en presencia de baño Azul Nilo y tinción violeta cristal en las placas.. Para cada cepa se realizó un seguimiento cualitativo(a diferentes tiempos) para evaluar crecimiento y producción de PHA mediante tinción de frotis con Violeta Cristal. Para las cepas positivas en esta tinción se realiza una confirmación por fluorescencia en UV en baño Azul Nilo en los cultivos sólidos.

Luego de realizados los ensayos, únicamente dos cepas fueron capaces de acumular PHA utilizando como fuente de carbono en efluente modelo: *Ralstonia eutropha* DSM 545, *Metilobacterium extorquens* DSM 1340.

Para *M. extorquens* se obtuvo un máximo 0.49 g/L de PHAs en 92 horas mientras que para *R.eutropha* se obtuvo un máximo de 0.69 g/L de PHAs en 48 hrs.

Producción microbiana de biopolímeros a partir de glicerol

Guadalupe Martínez¹ y Lyliam Loperena

Departamento de Bioingeniería-Instituto de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería-UdelaR. Julio Herrera y Reissig 565
CP 11300-Montevideo-Uruguay.
(+5892)7110871-Fax (+5982)7115446

RESUMEN

El PHB (polihidroxibutirato) es un bioplástico que se acumula intracelularmente en diversos microorganismos frente a un déficit nutricional y exceso de fuente de carbono. Se presenta un modelo cinético dado por una descripción matemática de un cultivo batch de *Ralstonia eutropha* DSM 545, utilizando un medio modelado de glicerol crudo como fuente de carbono para producir PHB. El crecimiento del microorganismo es descrito por la cinética de Khanna con doble limitación de fuente de carbono y fuente de nitrógeno.

INTRODUCCIÓN

Los materiales plásticos, son parte integral de la vida contemporánea, lo que ha llevado a la acumulación de grandes cantidades de desechos plásticos no degradables. El carácter no biodegradable de los polímeros de origen petroquímico, necesariamente llevará a significativas restricciones en su uso futuro y por lo tanto a la utilización de productos con un impacto menor o nulo sobre el medio ambiente. Los plásticos biodegradables proporcionan una posible solución a los problemas ambientales anteriormente descritos ya que por un lado se desviaría parte del volumen de plásticos de los vertederos a otros medios de gestión de residuos como por ejemplo el compostaje, y por el otro, contribuirían a la preservación de los recursos no renovables. Entre los plásticos biodegradables, los polihidroxialcanoatos (PHA) son una familia diversa de poliésteres sintetizados por una amplia gama de microorganismos. Los PHAs son acumulados intracelularmente como respuesta a un desbalance de nutrientes en su ambiente, constituyendo una reserva de fuente de carbono y energía dentro del microorganismo para su sobrevivencia durante periodos de escasez. La fuente de carbono es asimilada y convertida en un hidroxialcanoato, que finalmente es polimerizado en PHAs de alto peso molecular, siendo almacenado como gránulos insolubles en el citoplasma (Ching-Yee Loo *et al.*, 2007). Las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los PHA's son similares a las que presentan los polímeros sintéticos comerciales, por lo que son aptos para numerosas aplicaciones industriales como ser agricultura, productos higiénicos descartables, envases de cosméticos. Como son resistentes al agua, y a la radiación ultravioleta, presentan baja permeabilidad al oxígeno y humedad, son especialmente apropiados para envases de alimentos. Por ser biodegradables son además de sumo interés en el campo de los sistemas de liberación controlada, por lo que han

¹ gmartine@fing.edu.uy

sido investigados como transportadores para la dosificación a largo plazo de insecticidas y herbicidas, e incluso al ser biocompatibles como sistema de liberación de drogas, medicinas, suturas y soportes tisulares (Kim *et al.*, 2000) (Chen *et al.*, 2005). El PHB (polihidroxibutirato) es el miembro de los PHAs mejor caracterizado y difundido, por lo que se han desarrollado diversas estrategias de fermentación y recuperación para su producción como polímero modelo. La producción de PHAs aún tiene desafíos tecnológicos que la hagan económicamente rentable. Para ello se desarrollan estrategias de producción que involucran el uso de cepas microbianas y métodos de fermentación eficientes, que utilicen fuentes de carbono de bajo costo. Los estudios realizados sobre la producción de PHA's utilizando sustratos de bajo costo sugieren que la alternativa es económicamente viable (Du *et al.*; 2012) (Gomez *et al.*, 2012) (Khardenavis *et al.*, 2007). El crecimiento de la industria del biodiesel a nivel mundial ha generado una sobreproducción de glicerina, derivando en la baja de su precio, lo que ha llevado a que este producto sea considerado como un desperdicio, con la consiguiente urgente necesidad de reutilización, para contribuir a la rentabilidad del proceso de producción de biodiesel, además de contribuir al cumplimiento de las normas medioambientales cada vez más exigentes. El bajo precio de la glicerina, no solo se debe al mayor volumen de producción, sino a su alto nivel de impurezas. Dado que el precio actual del glicerol se ha vuelto muy competitivo con los azúcares usados para la producción de químicos y combustibles, la vía de fermentación microbiana es una opción para su aprovechamiento que está siendo re-evaluada. Este es el caso de la producción de polímeros biodegradables, en el cual el medio de fermentación se estima representa un 40% de los costos globales, por lo que el uso de un subproducto como la glicerina beneficiaría el balance económico del mismo (Ashby *et al.*, 2004). (Cavalheiro *et al.*, 2009). Como ya ha sido reportado es posible utilizar el proceso de producción de PHB, como alternativa para la valorización de la glicerina (Biodiesel technotes, 2006), obteniendo más de 80% de peso seco de la célula como plástico biodegradable en diversas cepas (Cavalheiro *et al.*, 2009). Mediante este proceso es posible integrar la generación de energía con la producción de bioplásticos de alto valor agregado a partir de un subproducto de difícil disposición. Se han planteado varios modelos cinéticos para el crecimiento y producción de PHB en diversas cepas (Annur *et al.*, 2008) (Shahhosseini, 2004) (Patwardhan *et al.*, 2008) (Khanna *et al.*, 2006), sin embargo ninguno de estos modelos involucraron glicerol como fuente de carbono. En el presente trabajo se presenta un estudio de la cinética de crecimiento y producción de PHB en *Ralstonia eutropha* DSM 545 a partir de un sustrato modelado como glicerol crudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Se utilizó *Ralstonia eutropha* DSM 545. La cepa fue mantenida en tubos inclinados de TSA a 4°C. El microorganismo se repicó en tubos inclinados de glicerol 18 % v/v en TSA y se incubó durante 48 h a temperatura ambiente. Luego de la incubación fueron mantenidos a 4°C hasta ser utilizados.

Composición del efluente modelo.

Dado la variación en la composición del glicerol subproducto del biodiesel se decidió trabajar con un medio modelado. La composición de este medio tiene en cuenta las peores condiciones en las cuales se puede encontrar este subproducto: sin recuperación de metanol. Basado en estudios realizados por diversos autores (Thompson *et al.*) y la información brindada por productores nacionales de biodiesel se seleccionó la siguiente composición del efluente modelo: glicerol (37%), metanol (30%), catalizador (1%) agua (2%). Los monoacilglicéridos no fueron considerados dado que la cantidad presente en este efluente es generalmente despreciable, y de estar presentes en el medio producen aumento en el crecimiento bacteriano y acumulación de PHA (Martinez *et al*, 2008).

Medio de cultivo.

La composición mineral en el medio de fermentación fue: 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.06 g/L citrato de amonio y hierro (III), 0.01 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 1.0 mL/L de solución de metales traza. La solución de metales traza consiste en: 0.3 g/L H_2BO_4 , 0.2 g/L $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03 g/L $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 g/L $NiCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.01 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.03 g/L $MnCl_2 \cdot 6H_2O$.

La solución de fosfatos: 0.6 g/L KH_2PO_4 , 10.0 g/L Na_2HPO_4 , en el medio de fermentación. Como fuente de carbono se utilizó una dilución del efluente modelo para llegar a una concentración de 18.3 % v/v de glicerol y 13.7% de metanol. El pH de todas las soluciones se ajustó a 7.0 con 5.0 N NaOH/ 5.0 N HCl. Todas las soluciones fueron esterilizadas por separado 15 min a 121°C y luego reconstituidas en forma aséptica a temperatura ambiente previo a ser inoculado.

Fermentación.

Los datos experimentales utilizados para la simulación fueron tomados de experiencias en reactor de laboratorio operado en modalidad batch. El inóculo se preparó en Erlenmayer de 1 L conteniendo 200 mL del medio descrito anteriormente, en shaker orbital durante 24 h a 200 rpm y 35°C.

Las experiencias se realizaron en fermentador Sartorius Stedim Biotech. BIOSTAT® A Plus a 35°C y pH 7, conteniendo 2 L de medio de cultivo. La concentración del inóculo fue la necesaria para obtener 0.5 g/L de biomasa al comienzo de la fermentación. Se tomaron muestras a intervalos irregulares para determinación de: biomasa, glicerol, metanol, PHB y sulfato de amonio. El oxígeno disuelto en el medio se mantuvo constante a 30% de saturación, mediante regulación automática de la agitación, la aireación se mantuvo constante a 1 vvm.

Métodos analíticos

La concentración de biomasa se determinó mediante espectrofotometría. La densidad óptica de la suspensión se determinó a 600 nm en espectrofotómetro UNICAM UV/VIS. Para la determinación del glicerol y metanol residual, las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm a 4°C durante 15 min. Se determinó la concentración en el sobrenadante en HPLC Shimadzu equipado con una columna Shodex sugar KS-801 (8 mm x 300 mm) a 55°C, utilizando agua MilliQ como eluyente a 0.7 mL/min. La concentración de PHB se determinó con kit enzimático (Boehringer

Mannheim). La concentración de amonio residual se determinó con electrodo de amonio ORION.

Modelado de parámetros

Para la identificación de los parámetros de los modelos cinéticos propuestos, se tomaron los valores promedio de concentración de biomasa, PHB, glicerol y sulfato de amonio, obtenidas en fermentaciones descritas anteriormente. Los parámetros fueron determinados mediante una regresión no lineal, que minimiza las diferencias entre las predicciones del modelo y los datos experimentales. El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió utilizando un programa basado en el método de Runge Kutta de cuarto orden. El sistema multivariado se resuelve de forma iterativa, minimizando la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor predicho por el modelo y los datos experimentales (Cutlip *et al.*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética del crecimiento en batch

En 60 horas de fermentación se produjeron 22.5 g/L de biomasa. En este período, se consumieron 1.5 g/L de fuente de nitrógeno y se metabolizaron 26.2 g/L de glicerol, manteniéndose el metanol presente en el medio, constante. La síntesis de PHB, producto de interés, comenzó a las 32 horas y llegó a una concentración final de 3.3 g/L.

Modelo Matemático

Los modelos matemáticos son necesarios para tener bases sólidas para el diseño de procesos fermentativos, para cálculos económicos y para el control del proceso. El crecimiento y acumulación de PHB, se describe en términos de biomasa producida, PHB acumulado, sulfato de nitrógeno consumido y glicerol consumido.

La concentración de biomasa total (g/L) consiste en dos partes: PHB (P) y biomasa residual (R), en donde R se calcula como la diferencia entre la biomasa total y PHB. R es la fracción de la biomasa total catalíticamente activa, e incluye proteínas y ácidos nucleicos.

La síntesis de R se describe como:

$$\frac{dR}{dt} = \mu R$$

En donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

El producto PHB (P [g/L]) se produce y acumula la forma mayoritaria en fase estacionaria (verificado en experiencias anteriores), por lo que la cinética de producción se modela únicamente con un término de producción no asociado al crecimiento (β [g/g.h]).

$$\frac{dP}{dt} = \beta \times R$$

El consumo de glicerol se derivó en crecimiento celular y formación de producto. Basado en experiencias previas se desprecia el término mantenimiento celular.

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{GS1}} \times R - \frac{\beta}{Y_{P/S1}} \times R$$

Siendo Y_{GS1} , el rendimiento de biomasa activa (R) basado en el consumo de glicerol utilizado para crecimiento y Y_{PS1} , el rendimiento de PHB basado en glicerol utilizado para la formación de producto.

La fuente de nitrógeno es consumida para la formación de biomasa activa (R), y mantenimiento celular.

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{R/S2}} \times R$$

Siendo $Y_{R/S2}$, el rendimiento de biomasa activa basado en consumo total de fuente de nitrógeno.

Se plantean 5 cinéticas de crecimiento para modelar el crecimiento celular.

Modelos para crecimiento con fuente de nitrógeno como sustrato limitante

a) Monod

$$\mu = b_1 \frac{S_2}{S_2 + b_2}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}) y b_2 (g/L) constante de saturación.

b) Moser

$$\mu = b_1 \frac{S_2^{b_2}}{S_2^{b_2} + b_3}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 : constante adimensional y b_3 (g/L) constante de saturación.

Modelo para crecimiento con fuente de nitrógeno como sustrato limitante e inhibición por sustrato.

c) Andrews modificado

$$\mu = \frac{b_1}{\left(\frac{1 + b_2}{S_2}\right) \times \left(\frac{1 + S_2}{b_3}\right)}$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_2 (g/L): constante del sustrato limitante y b_3 (g/L) constante de inhibición.

Modelo para crecimiento con doble limitación por fuente de carbono y fuente de nitrógeno.

d) Khanna *et al.*

$$\mu = b_1 \left(\frac{S_1^{b_2}}{S_1^{b_2} + b_3 b_2} \right) * \left(\frac{S_2^{b_4}}{S_2^{b_4} + b_5 b_4} \right)$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_3 (g/L) y b_5 : constantes de saturación de glicerol y sulfato de amonio respectivamente; b_2 y b_4 constantes adimensionales.

e) Khanna, *et al.* (con inhibición)

$$\mu = b_1 \left(\frac{S_1^{b_2}}{S_1^{b_2} + b_3 b_2} \right) * \left(\frac{S_2^{b_4}}{S_2^{b_4} + b_5 b_4} \right) * \left(1 - \left(\frac{S_1}{b_7} \right)^{b_6} \right) \left(1 - \left(\frac{S_2}{b_9} \right)^{b_8} \right)$$

Con $b_1 = \mu_{\max}$ (h^{-1}), b_3 (g/L) y b_5 : constantes de saturación de glicerol y sulfato de amonio; b_2 , b_4 , b_6 y b_8 constantes adimensionales; b_7 (g/L) y b_9 (g/L) representan la concentración mínima de fuente de carbono y fuente de nitrógeno respectivamente para que ocurra inhibición.

Resultados del modelado matemático

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada una de las cinéticas planteadas.

Tabla 1. Parámetros modelados

	Monod	Moser	Andrews	Khanna	Khanna c/inhibición.
β	0.004	0.005	0.002	0.006	0.007
Y_{GS1}	1.01	0.88	0.98	0.83	0.83
Y_{PS1}	0.34	1.99	0.17	12.5	6.3
Y_{RS1}	14.29	16.75	14.56	14.03	14.02
b_1	0.13	0.13	1.29	0.63	0.62
b_2	0.07	3.24	5.69	1.39	1.38
b_3		0.07	1.65	61.04	61.55
b_4				0.56	0.58
b_5				0.0063	0.0053
b_6					11.82
b_7					144.19
b_8					2.3
b_9					17.9
r^2	0.9320	0.9771	0.9704	0.9745	0.9747
Sumsqr	76.52	51	64.9	31	32.9

Para cada modelo (Figuras 1-5) se presenta el coeficiente de correlación (r^2) y la suma de los cuadrados de la diferencia entre el valor predicho por el modelo y los datos experimentales (SumSqr). El coeficiente r^2 suele utilizarse para juzgar si un modelo representa un conjunto de datos. Sin embargo no es condición suficiente obtener r^2 cercano a 1 para asegurar la representatividad del modelo. Por ello, para evaluar los modelos se toma en cuenta, además, las distribución de los residuos (no se presentan) y el valor obtenido Sumsqr de la regresión. Teniendo en cuenta estos elementos se obtiene que el modelo que mejor representa los datos experimentales es el modelo de Khanna (limitación dual) sin inhibición.

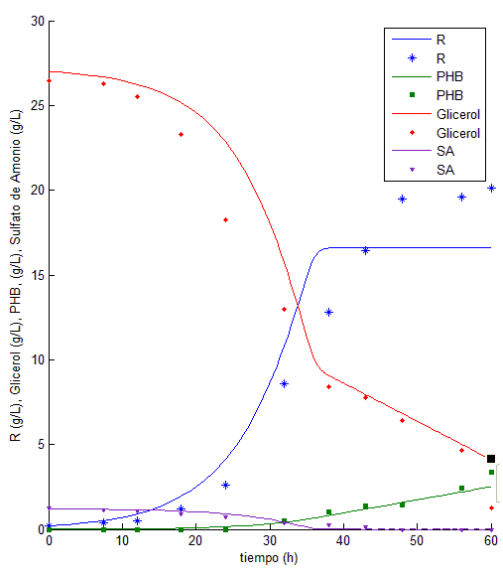


Figura 1. Monod

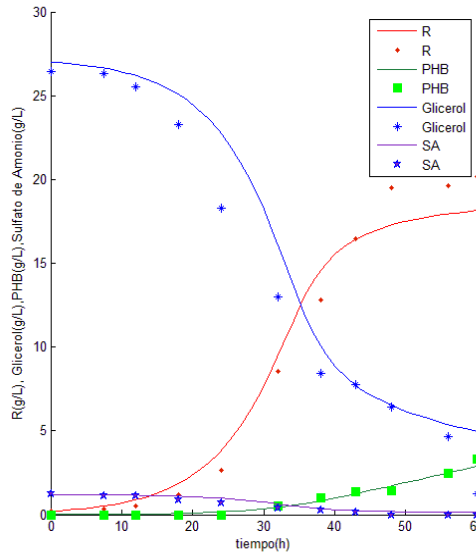


Figura 2. Moser

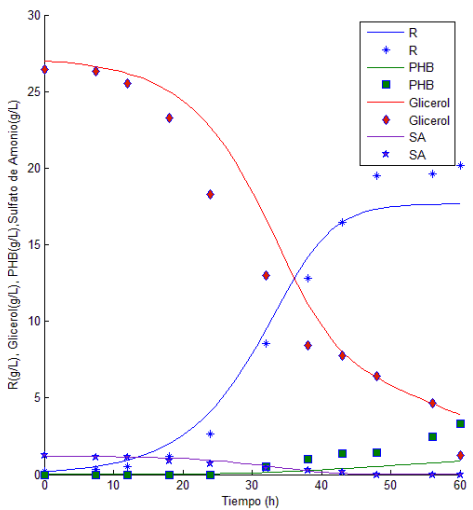


Figura 2. Andrews

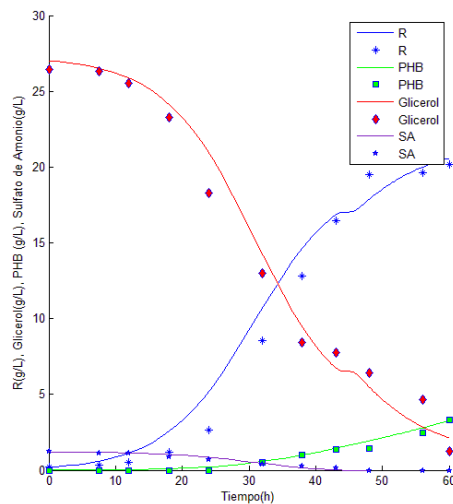


Figura 4. Khanna

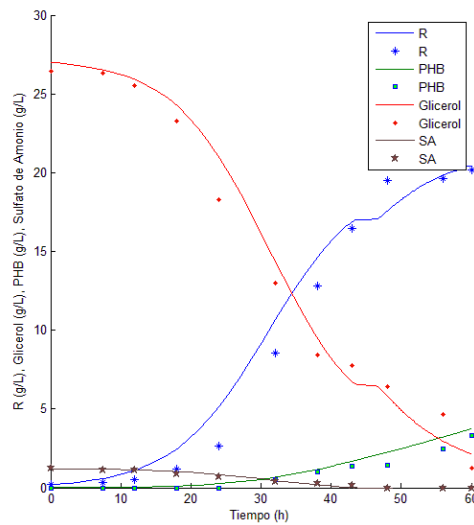


Figura 3. Khanna con inhibición

La limitación de crecimiento dual (por dos nutrientes, modelo de Khanna) se detecta en microorganismos que muestran variación en los rendimientos de biomasa bajo diferentes limitaciones de nutrientes heterólogos (no interactúan entre sí, como la fuente carbono y fuente nitrógeno). Esta variación es causada, en *R. eutropha* por cambios fisiológicos debido a la acumulación del compuesto de reserva PHB. La acumulación y reserva de PHB responde a la deficiencia de un nutriente en el medio, en este caso la fuente de nitrógeno, que detiene el crecimiento exponencial. El exceso de carbono remanente se almacena como compuesto de reserva (PHB) predominantemente en la fase estacionaria de crecimiento. La relación entre fuente de carbono y fuente de nitrógeno en el medio, determina, en concordancia con el modelo matemático descrito (Khanna *et al.*), si el flujo de carbono se destina a producir biomasa o PHB.

CONCLUSIONES

El crecimiento en batch de *R. eutropha* DSM 545 en un medio definido utilizando un efluente modelo de glicerol crudo como fuente de carbono puede ser descrito por el modelo de doble limitación de Khanna sin inhibición por sustrato. Este modelo podrá ser luego utilizado como base, para plantear estrategias de producción que maximicen la producción de PHB y para cálculos económicos del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

Annuar, M.; Tan, I.; Ibrahim, S.; Ramachandran, K. A kinetic model for growth and biosynthesis of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. (2008) Braz. J. Chem Eng. Vol 25 n2.

Ashyby R.D, Solaiman D.K.Y., Foglia T.A., (2004), Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream, Journal of Polymers and the Environment, 12(3), 105-112.

Biodiesel technotes (2006) Vol 3 Issue 3. www.biodieseleducation.org

Cavalheiro J.M.B.T, de Almeida M.C.M.D., Grandfils C., da Fonseca M.M.R., (2009), Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol, Process Biochemistry 44, 509-515.

Chen G.Q., Wu Q., (2005), The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, Biomaterials, 26 (33), 6565-6578.

Ching-Yee Loo and Kumar Sudesh, Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. (2007) Malaysian Polymer Journal (MPJ), Vol 2, No. 2, p 31-57.

Cutlip, M.; Shacham, M; Problem Solving in Chemical and Biochemical Engineering with Polymath, Excel and Matlab. Second Edition. Prentice Hall Pearson Education. ISBN-13 978-0-13-18204-3.

Du G.C., Chen J., Gao H.J., Chen Y.G., Lun S.Y., (2000), Effects of environmental conditions on cell growth and poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *A. eutrophus*,

José G. C. Gomez, Beatriz S. Méndez, Pablo I. Nickel, M. Julia Pettinari, María A. Prieto and Luiziana F. Silva (2012). Making Green Polymers Even Greener: Towards Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Agroindustrial By-Products, Advances in Applied Biotechnology, Marian Petre (Ed.), ISBN: 978-953-307-820-5

Bioresource Technology 99, 1787-1792.

Khanna. S.; Srivastava, A.; Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen (2006) Biochemical Engineering Journal 27, 197-203.

Khardenavis A.A., Suresh Kumar M., Mudliar S.N, Chakrabarti T., (2007), Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly beta-hydroxybutyrate, Bioresource Technology, 98, 3579-3584.

Kim B.S., (2000), Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 774-777.

Martinez. G.A; Laborda I., Maisonneuve M. Statistical media optimization of polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* DSM 545 using whey as substrate (2007). Publicación SinaFerm 2007

Patwardhan, P.; Srivastava, A.; Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*.(2008)

Shahhosseini, S. Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*.(2004) *Process Biochemistry* 39, 963-969.

Thompson, J.C.; He, B.B. *Appl Engineering in Agriculture* Vol 22 (2) 261-265.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Hermosinda Varela por el aporte a este trabajo.

El presente trabajo fue realizado con la financiación de ANII PR_FMV_2010_1_2898