

Establecimiento de una estrategia para la producción de PHA
en *Ralstonia eutropha* ATCC 17699.

David García Vásquez

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

2023

Establecimiento de una estrategia para la producción de PHA en *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 a través de la variación de la concentración de oxígeno disuelto en una mezcla de vinaza-melaza como medio alternativo.

David García Vásquez

Asesor

Wilman Alcaraz Zapata

Trabajo de grado para optar por el título de

Microbiólogo Industrial y Ambiental

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

2023

Establishment of a strategy for the production of PHA in *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 through the variation of the concentration of dissolved oxygen in a mixture of vinasse-molasses as an alternative medium

David García-Vásquez ; César García-Echeverry ; Wilman Alcaraz-Zapata

Grupo de Biotransformación, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. david.garciav@udea.edu.co , cegarciae@unal.edu.co, wilman.alcaraz@udea.edu.co

Abstract

The objective of this article is based on the problems with the current production of plastics of petrochemical origin, which has generated the search for new forms of production such as biopolymers of the Polyhydroxyalkanoate (PHA) type using microorganisms such as the *Ralstonia eutropha* bacteria. In this study, the evaluation of the effect of oxygen saturation on the growth and PHA production of this bacterium was proposed, using a mixture of vinasse and cane molasses as an alternative culture medium. The results showed that PHA production is improved at an oxygen saturation between 40-10%, obtaining a biomass concentration of 20.8 (g/L) and 18 (g/L) of PHA.

Keywords: Biopolymers; PHA; vinasse

Establecimiento de una estrategia para la producción de PHA en *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 a través de la variación de la concentración de oxígeno disuelto en una mezcla de vinaza-melaza como medio alternativo.

Resumen

El objetivo de este artículo parte de la problemática que se tiene con la producción actual de plásticos de origen petroquímico, lo que ha generado la búsqueda de nuevas formas de producción como los biopolímeros de tipo polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando *Ralstonia eutropha*. En este estudio se planteó la evaluación del efecto de la saturación de oxígeno sobre el crecimiento y producción de PHA de esta bacteria, empleando una mezcla de vinazas y melazas de caña como medio de cultivo alternativo. Los resultados mostraron un aumento en la producción de PHA a través de la variación de oxígeno disuelto con la estrategia 40-10%, obteniéndose una concentración de biomasa de 20,8 (g/L) y 18 (g/L) de PHA.

Palabras clave: Biopolímeros; PHA; Vinaza

Introducción

Las necesidades de la sociedad actual hacen que el uso constante de materiales plásticos sea necesario por sus propiedades de durabilidad, estabilidad y fácil manejo con costos baratos de producción, sin embargo, su estructura compleja y alto peso molecular, hacen que sea un residuo difícil de degradar, adicionalmente, muchos de estos no se pueden reutilizar o reciclar, lo cual incrementa el problema actual de contaminación ambiental por su acumulación [1]. Lo anterior ha llamado la atención por parte de organismos ambientales y públicos generando la búsqueda de nuevas estrategias para su producción y así poder desarrollar nuevos polímeros que puedan cumplir las mismas

funciones y satisfacer las necesidades que requiere la sociedad actual para su uso, disminuyendo las repercusiones en el ambiente [2]. De esta búsqueda aparecen los polímeros de origen biológico siendo los polihidroxialcanoatos (PHA) uno de los más destacados. Estos son biopolímeros sintetizados por microorganismos en forma de inclusiones granulares como almacenamiento de energía dentro del citoplasma [3, 4, 5].

Los PHA se presentan como una buena alternativa debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, son insolubles en agua, tienen una buena resistencia al ataque hidrolítico, resisten rayos UV y se hinchan en el agua facilitando su degradación anaeróbica en los suelos [2,6,7]. Todas estas características son dadas

debido a las variaciones que presentan en los monómeros que los constituyen; por estas características presentan un amplio rango de aplicaciones en la industria, el sector biomédico y el farmacéutico. Aunque las ventajas que presentan estos biopolímeros sobre los plásticos convencionales están claras, los altos costos asociados a la producción fermentativa que están influenciados principalmente por la fuente de carbono, la productividad del proceso y el procesamiento posterior, generan la necesidad de mejorar el proceso de producción [4,8], lo cual ha llevado a la búsqueda de alternativas que los mejoren y aumenten su productividad. Esto ha generado la necesidad de utilizar sustratos no convencionales para disminuir el costo de producción de PHA. Algunos de los sustratos que han sido reportados hasta ahora para la producción de PHA han sido: grasas, aceites, materias primas lignocelulósicas, residuos agrícolas y domésticos, glicerol, fuentes azucaradas como la melaza de caña de azúcar y aguas residuales [9]. Para la producción de PHA, se han reportado más de 300 especies en las que se incluyen bacterias, hongos y algunas cepas recombinantes [10]. Estos microorganismos productores de PHA se dividen en dos grupos dependiendo de las condiciones a las cuales lo producen. El primer grupo, tiene su producción asociada a limitación de un nutriente como N, O, P, S y con un exceso de fuente de carbono; el otro grupo no necesita la limitación de estos nutrientes, por lo cual, su acumulación está asociada al crecimiento. Para los microorganismos del primer grupo como *Ralstonia eutropha*, se han realizado diversos estudios para buscar factores que puedan inducir el efecto de acumulación del biopolímero; de allí surge la hipótesis del oxígeno como un factor que pueda inducir la producción del PHA, teniendo en cuenta que el oxígeno podría generar un estrés oxidativo como se puede ver en la figura 1. cuando hay una baja cantidad de NADH. Es importante tener en cuenta que esto se da en la ruta metabólica de oxidación de los carbohidratos en *Ralstonia eutropha* ATCC17699 la cual no usa NADPH como normalmente lo hacen otros microorganismos de este grupo y genera acetoacetil-CoA, importante precursor de los PHA [11, 12], se ilustra en la figura 1.

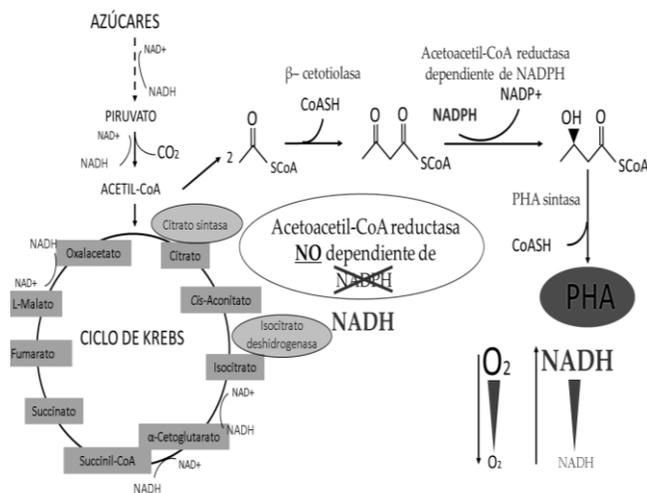


Figura 1. Ruta metabólica de la producción de PHA a partir de la limitación de oxígeno disuelto. Imagen tomada y modificada de: Alcaráz 2018; Budde et al., 2010; Cabello, 2007; Chohan and Copeland, 1998; González et al., 2013 [5].

Entre los grandes organismos productores de PHA se destaca *R. eutropha* que ha sido ampliamente estudiada en la industria sucroalcoholera, esto dado a su alta velocidad de crecimiento, alto contenido de PHA en biomasa, su capacidad de resistir condiciones de estrés y la capacidad de utilizar fuentes de carbono simples [4]. Es un

bacilo alargado, Gram negativo capaz de crecer de forma autotrófica y heterotrófica en diversas fuentes de carbono a una temperatura de 25°-40° C, presenta un rango de pH (5.5-7.9), siendo un organismo atractivo para la síntesis de PHA a partir de fuentes de carbono de bajo costo que son materiales de desecho [13]. Durante tiempos de exceso de carbono y limitación de nutrientes, la cepa de *R. eutropha* H16 almacena hasta 90% (p / p) de su peso seco celular como polihidroxibutirato (PHB), el biopolímero de PHA más común. [14]. Teniendo en cuenta que es uno de los microorganismos más estudiados en el campo de la producción de PHA, se conocen sus rutas metabólicas lo que hace más fácil el manejo de los sustratos a utilizar, siendo esto importante ya que los sustratos pueden llegar a presentar hasta un 50% de los costos en su producción [4].

La producción de PHA se ha evaluado en matrices alternativas, entre las cuales cabe destacar la melaza de caña y vinaza [5, 6]. La vinaza es el compuesto líquido resultante de la producción de etanol, y se le atribuye hasta un 70% de la contaminación procedente de la fermentación, se puede obtener ya sea por fermentación de los jugos de caña o de la destilación del bagazo resultante de esta [15]. Presenta un color marrón, con gran cantidad de sólidos suspendidos y un olor a miel [16]. Este material líquido presenta pH bajos (3.5-4.5), altos valores de DQO y DBO; por esto se considera un residuo con alto impacto ambiental que repercute principalmente en los recursos hídricos, debido a que por sus características disminuye el oxígeno disuelto en el agua y la luminosidad, afectando la actividad fotosintética y así, provocando eutrofización con un resultado negativo para la microbiota presente. Por estos efectos adversos se han buscado diversas alternativas para su tratamiento, ya sea reutilizándolo, modificándolo o hasta degradarlo [8].

En Colombia se han adelantado varios estudios principalmente para la utilización de la vinaza como un material de compostaje u abono, esto debido a su composición que generalmente la hace rica en nitrógeno, potasio, calcio y azufre [17]. Por esto, aunque posee pocos micronutrientes puede ayudar a mejorar la disposición del suelo, sin embargo, estudios en los cuales se analice el efecto de la vinaza en la microbiota presente son pocos, por esta razón se hace necesario adelantar investigaciones donde se evalúe el efecto de la vinaza en diversos microorganismos, en pro a su aprovechamiento como un medio que favorezca su actividad o presencia. Teniendo en cuenta que en estudios anteriores *R. eutropha* puede crecer en vinaza y que este microorganismo genera metabolitos de reserva en forma de PHA al encontrarse sometido a condiciones de estrés o con la limitación de un nutriente esencial, se presenta la posibilidad de evaluar los factores limitantes que puedan inducir la producción de PHA.

Diseño experimental: Se realizó un diseño unifactorial donde se tuvo como variable explicativa el oxígeno disuelto (D.O.) y teniendo como variables de respuesta biomasa, polímero y azúcares.

Materiales y métodos

Inóculos y medios de cultivo

Se trabajaron con dos medios de cultivo diferentes; el primero fue el medio líquido convencional caldo triptona soja (TSB) que se utilizó para garantizar el crecimiento de *Ralstonia eutropha* ATCC 17699, se mantuvo a una temperatura de 32° C durante 12 h en agitación (120 rpm) con un volumen de 40 mL; el volumen fue establecido para ser el preinóculo del segundo medio utilizado siendo el 10%, este segundo medio utilizado fue de vinaza-melaza 360mL a las mismas condiciones para un total de 400 mL. El segundo preinóculo se hizo con el fin de generar un mayor periodo de adaptación a la bacteria antes de ser

llevada al biorreactor y empezar el proceso ya que no es un medio convencional.

Vinaza – melaza

Se usó como medio alternativo un medio compuesto de vinaza proveniente de la empresa INCAUCA, ubicada en Cali, Valle del Cauca; este medio fue suplementado con melaza, manejando una relación de 75% - 25% (vinaza-melaza), la adición de melaza buscaba suplementar el medio de azúcares con el fin de garantizar la disposición necesaria de sustrato para el microorganismo, dado que los azúcares residuales provenientes de la vinaza son muy bajos [5].

Ralstonia eutropha ATCC 17699

Cepa bacteriana criopreservada en el Laboratorio del Grupo de Biotransformación de la Universidad de Antioquia.

Se reactivó usando caldo TSB en erlenmeyer 100 mL durante 24 h/36°C

Fermentación con *R. eutropha* ATCC 17699

Se utilizó el biorreactor New Brunswick (5 L) ubicado en la planta piloto de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia donde se trabajó con un volumen real de 4 L, se mantuvo un pH de 7,0, a 32 °C, 150 rpm y la condición de D.O. a evaluar varió en cada montaje (10, 20, 40, 60%) [19, 2]. Los montajes tuvieron una duración de 28 h que era el tiempo que tardaba el medio en saturarse por el crecimiento de la biomasa, luego se hizo la toma de muestras de 30 mL cada 4 h y a cada muestra, se le hizo medición de azúcares, biomasa y polímero por triplicado.

Determinación de azúcares por DNS

Se empleó este protocolo con el fin de determinar el consumo de sustrato en el tiempo que duró el montaje. Este protocolo determina azúcares reductores, por lo tanto, fue necesario hacer DNS con hidrólisis ácida de la siguiente manera: A partir de la muestra centrifugada a 10.000 rpm/5min, se hizo dilución 1:100, se le adicionó 20 de HCL 37%, se dejó en baño María 5min 90 °C y se llevó a enfriar en hielo 5 min, posterior a esto, se agregó 50 µL de NaOH 1 M y 1070 µL del reactivo DNS, se hizo vórtex y se repitió el proceso de calentamiento y enfriamiento como se mencionó anteriormente. Seguido de esto se hizo la lectura en el espectrofotómetro a 540nm y se llevaron las absorbancias obtenidas a los datos con la curva de DNS para determinar su concentración. Cabe destacar que, en todas las mediciones se encontró que siempre quedaban azúcares residuales o un compuesto que reaccionaba con el DNS, esto dado que no era un compuesto asimilable por la bacteria y proveniente de la vinaza.

Peso seco

Para la determinación de biomasa en el tiempo se utilizó el método de peso seco de la siguiente forma: se obtuvo 1 mL de la muestra en viales estériles que previamente, fueron secados y pesados. La muestra se centrifugó a 10.000 rpm/5min, se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de agua destilada estéril. Luego, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante para llevar a secar en horno 80 °C por 24 h y después, pesar en la balanza analítica.

Extracción polímero

Para la extracción de polímero se buscó una forma que presentara buena relación de rendimiento y costos. Basados en que el biopolímero es soluble en el cloroformo, y en metodologías anteriormente descritas se usa [4], se planteó de la siguiente manera. Las muestras obtenidas en Falcon de 50 mL se encontraban previamente congeladas en la nevera, esto con el fin de generar la cristalización de las células y facilitar la liberación del biopolímero, luego de descongelarse se tomaron 30 mL y fueron centrifugadas a 5000 rpm/ 10 min, se descartó sobrenadante y al pellet se le agregó 20 mL de hipoclorito y se hizo vórtex, luego se agregó 10 mL de cloroformo y se dejaron por 90min en shaker con agitación constante 120 rpm para facilitar la separación de los detritus celulares y el biopolímero. Se generaban dos fases y se extraía la parte superior que contenía el hipoclorito y los detritus celulares y la fase restante que contenía el cloroformo con el biopolímero fue servida en cajas de Petri previamente pesadas, las cuales se llevaban a la plancha para evaporar el exceso del cloroformo y finalmente, ser llevadas al horno durante 24 h/ 80 °C y obtener el producto final que se pesaría en la balanza.

1. Resultados

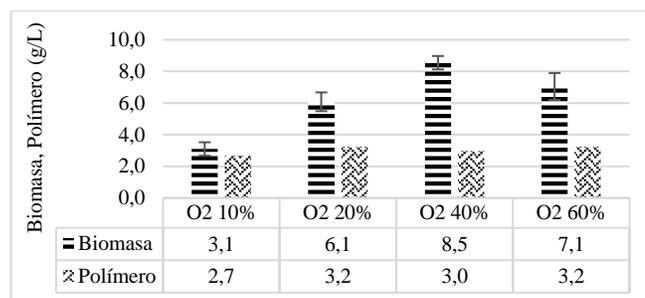


Figura 2. Producción de biomasa y concentración de PHA (g/L) en *R. eutropha* ATCC 17699 a partir de sus productos finales en las diferentes condiciones de D.O. evaluadas en medio alternativo vinaza-melaza A LAS 28 h.

La figura 2 muestra los resultados que se obtuvieron en los diferentes montajes de D.O. evaluados. Se hace una comparación de biomasa y polímero, para observar el efecto del D.O. en la acumulación del biopolímero. Este efecto del O₂ no se pudo observar dado que la cantidad de biopolímero obtenido está siendo constante en el tiempo, esto se debe a que esta cepa de *R. eutropha*, como se muestra en estudios anteriores, también acumula el biopolímero a medida que aumenta su densidad celular sin la necesidad de una limitación de un nutriente esencial [5]. Sin embargo, no lo hace de una manera tan evidente a cuando está en condiciones de estrés; sabiendo esto, teniendo en cuenta que al ser un polímero que se almacena de manera intracelular como fuente de reserva energética, este se encuentra altamente relacionado con la biomasa que se obtiene y esto explicaría la baja producción del polímero en niveles de O₂ donde no se favoreció la formación de biomasa en el tiempo (D.O. 10- 20%). Con estos resultados observamos que en D.O. de 40% se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, pero si se relaciona la cantidad de biomasa con la producción del polímero, el tratamiento de D.O. 10%, indica ser la mejor condición para la producción del biopolímero. Basados en esto, se planteó la estrategia que podrá ser implementada para favorecer la obtención de polímero en forma de biomasa.

Para confirmar que estas dos condiciones eran las más adecuadas, se hizo un análisis de rendimientos para la obtención del polímero y la biomasa, se muestran en la figura 3.

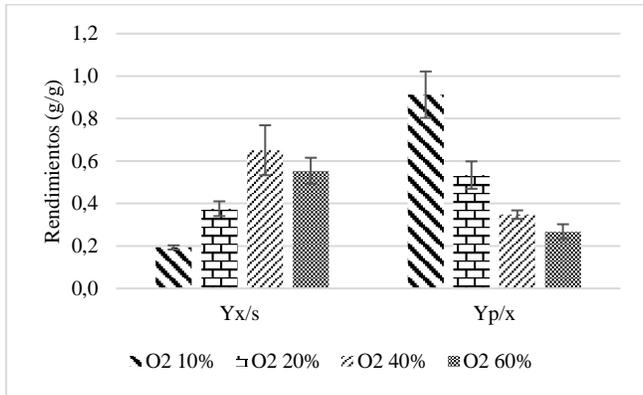


Figura 3. Rendimientos para cada tratamiento de D.O. en medio alternativo vinaza-melaza, expresados en (g/g). $Y_{x/s}$ = g biomasa/ g sustrato; $Y_{p/x}$ = g producto/ g biomasa.

Con el fin de poder ver de una manera más directa el efecto del D.O. en la biomasa y el biopolímero, se hizo el análisis de rendimientos en donde se comparan estas dos variables y el sustrato respecto a la biomasa producida. El rendimiento para $Y_{p/x}$, que es donde se relaciona los gramos de producto obtenido con los gramos de biomasa, muestran que el D.O. sí está teniendo un efecto en la acumulación del biopolímero dado que el mayor rendimiento se obtuvo en el D.O. 10%, esto lo que nos indica, es que cuando *R. eutropha* se encuentra sometida a una condición de estrés como lo es la disminución de oxígeno, su metabolismo prioriza la producción de PHA como una fuente de reserva, confirmando lo que se describió anteriormente en la teoría donde esta condición favorece el uso de una ruta metabólica alternativa que disminuye el estrés oxidativo causado por el oxígeno para obtener mayores cantidades de acetil CoA que es un precursor para la producción de PHA cuando se oxidan o cuando la fuente de carbono son los carbohidratos [7,8]; por ello se ve afectada la formación de biomasa. Sin embargo, se observa que la cantidad de polímero (g/L) obtenido al final en el montaje D.O. de 10% es bajo, lo que se puede deber a que *R. eutropha* ATCC 17699 acumula el biopolímero de manera intracelular, y en esta condición durante las 28 h del montaje no se favoreció la formación de biomasa, por ello, al estar relacionados y tener una baja densidad celular para esta condición, no hubo manera de obtener grandes cantidades del polímero. Dicho esto, se necesitan obtener grandes cantidades de PHA en forma de biomasa y para lograr esto se buscó controlar la acumulación del biopolímero a través de una estrategia de D.O. 40-10% de manera que se favorezca la formación de biomasa en una primera etapa que consta de D.O. 40%/12h y realizar un cambio a D.O. 10% las 12h siguientes para acumulación del biopolímero.

Para apoyar lo visto en las gráficas 1 y 2, a estos rendimientos también se le hizo un análisis estadístico con el programa Stat Graphics Centurion XVI, utilizando la comparación de múltiple varianza para también evidenciar la diferencia que hay entre cada tratamiento. En los resultados obtenidos, todos los tratamientos que fueron comparados con el tratamiento de 10% presentaban diferencias estadísticamente significativas en sus medias, pero la comparación entre el de 40 y 60% no presentaba esta diferencia significativa; aunque este análisis estadístico nos ayuda a ver la diferencia que puede generar el oxígeno disuelto para estos rendimientos, por lo cual podemos decir que para el de D.O. 40-60% al no presentarse esta diferencia, a partir del 40% no hay un efecto significativo del D.O. en la acumulación del biopolímero, pero para niveles de D.O. más bajos si hay un efecto dado que todos presentaron diferencias estadísticamente significativas en cada condición evaluada indicando que cuando se encuentra en

condiciones de estrés, se favorece su acumulación, respaldando la teoría. [12].

Para el rendimiento de $Y_{x/s}$ donde se relaciona la biomasa y el sustrato consumido, nos ayuda a entender cuál es la mejor estrategia por implementar para el favorecimiento en la producción de biomasa, y esto con el fin de establecer las condiciones a usar en la estrategia. Los resultados aquí obtenidos nos ayudan a identificar en qué condición de D.O. hubo un mayor consumo de sustrato que fue destinado a la producción de biomasa, de lo que podemos decir que en la condición con mayor rendimiento fue la de 40% D.O., nos indica que al encontrarse con una mayor disponibilidad de sustrato se obtendrá mayor biomasa en el tiempo; sin embargo, se debe tener en cuenta que una fuente de sustrato en exceso puede generar un estrés osmótico que repercute de manera negativa en la acumulación del biopolímero, dado que el acetil-CoA en exceso funciona como un inhibidor de la producción de PHA, es por esto que la fuente de sustrato debe ser controlada [7,18].

El análisis estadístico aplicado para este rendimiento también presentó diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos que se compararon con el de 40%, indicando que, en las otras condiciones evaluadas, el favorecimiento de la biomasa a partir del sustrato va a ser utilizado para otros procesos celulares como mantenimiento celular o simplemente respiración celular, y no será tan favorecida la densidad celular como en el de 40%.

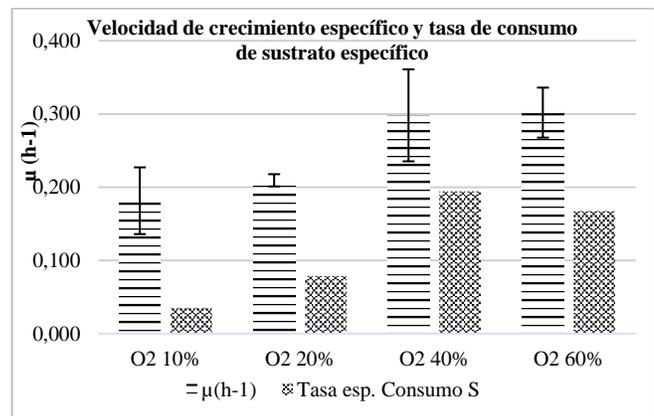


Figura 4. Comparación de la velocidad de crecimiento específico y tasa de consumo de sustrato para cada tratamiento evaluado en el medio de sustrato alternativo vinaza-melaza 75/25. La tasa de consumo de sustrato específico se obtiene a partir de $Y_{x/s}$. μ (Rendimiento para producto final y sustrato).

La figura 4 nos confirma lo que se tenía como suposición para definir la condición a la cual se obtendrá mayor cantidad de biomasa en el tiempo, aunque la velocidad de crecimiento específica para los tratamientos de 40 y 60% de D.O. es muy similar, su diferencia está en la tasa de consumo donde se encuentra relacionado el rendimiento $Y_{x/s}$ y su velocidad de crecimiento, indicando que aunque su velocidad es más alta, cuando se relaciona con el consumo de sustrato para su formación en biomasa el tratamiento de 40% es mayor, de lo que podría inferirse que en el de 60% su destinación al consumo de sustrato podría estar siendo mayormente destinada para el mantenimiento celular o respiración celular como se mencionó anteriormente; es por esto que se plantea una estrategia para la obtención de una mayor cantidad de biomasa en una primera etapa, donde la mejor condición para esto es comenzar con una D.O. de 40%, esto lo podemos observar en la fig. 5.

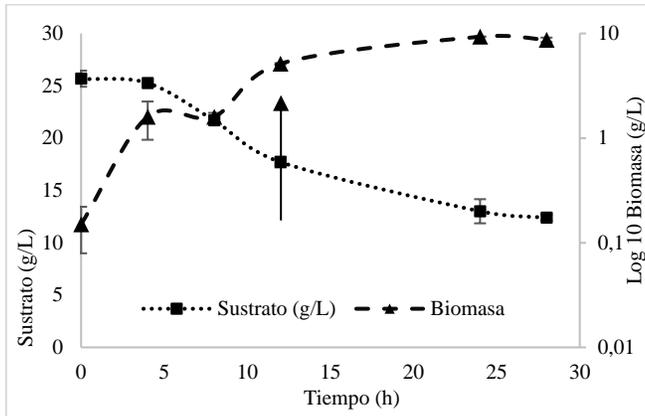


Figura 5. Biomasa y consumo de sustrato en el tiempo para el montaje de 40% D.O. en medio alternativo vinaza melaza expresado en (g/L) (La flecha señala la hora del pulso de melaza dado el incremento de biomasa- consumo sustrato).

Los resultados que se obtuvieron para todos los tratamientos evaluados fueron muy similares en su tendencia tanto en biomasa como en consumo de sustrato; todos los montajes presentaban un consumo mínimo de azúcares de 8 g/L. Esto se puede explicar dado que el DNS es una metodología para la medición de azúcares reductores, y se le pueden atribuir estos resultados a que la vinaza al ser una matriz heterogénea compleja que presenta una cantidad pequeña de azúcares residuales, se presume la presencia de algún compuesto reducido que está reaccionando con el reactivo DNS, pero que no es asimilable por el microorganismo. Conociendo esto, no se debe tener en cuenta estos azúcares restantes que fueron constantes en cada tratamiento como azúcares que se encuentren disponibles, pero si se deben tener en cuenta como azúcares totales, esto para no generar un estrés osmótico que influya en el comportamiento del microorganismo; por ello, sabiendo la tendencia que presenta en el consumo, que su fase estacionaria está en la hora 12 y que *R. eutropha* ATCC 17699 requiere tanto la limitación de un nutriente esencial como una fuente de carbono en exceso, se hace necesario realizar una alimentación con melaza que le proporcione los azúcares en la hora 12 donde se habrá obtenido la mayor cantidad de biomasa con el tratamiento de 40%, con el fin de mantener la fuente de sustrato constante y no generar un estrés adicional, luego se hará el cambio a un D.O. de 10% para que *R. eutropha* ATCC 17699 comience la acumulación del biopolímero hasta la hora 28 [19,7 ,8], mediante esta estrategia, se espera obtener mayor cantidad de PHA en forma de biomasa como lo planteaba la estrategia.

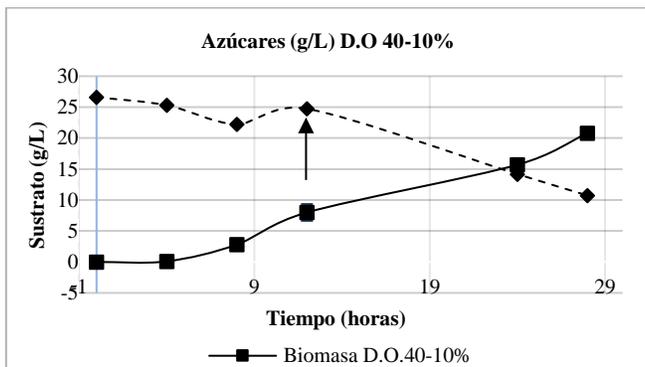


Figura 6. Producción de biomasa y consumo de sustrato por *R. eutropha* ATCC 17699 en 28 h de cultivo. La flecha indica el pulso de melaza implementado a las 12 h.

Los resultados obtenidos fueron los esperados teóricamente, donde se obtuvo un total de 20,8 (g/L) polímero para la hora 28, el consumo total de sustrato fue de 20,6 (g/L). La biomasa fue superior que los azúcares consumidos dado que en estos resultados se encuentran también unos precipitados que se formaron y fueron favorecidos por el tiempo que llevaba la vinaza almacenada, lo que genera una sobreestimación en la medición, explicando por qué a partir de 20,6 (g/L) de sustrato se produjeron 20,8 (g/L) de biomasa, sin embargo, se cumple con el objetivo de la estrategia dado que estos precipitados, aunque influyen en la medición, no cambian el comportamiento que presenta *R. eutropha* ATCC17699 con la estrategia implementada que fue superior a los tratamientos anteriormente evaluados (figura 9), estos resultados se pueden ver de otra manera, en la siguiente figura 7. Donde se observa el incremento del polímero en el tiempo.

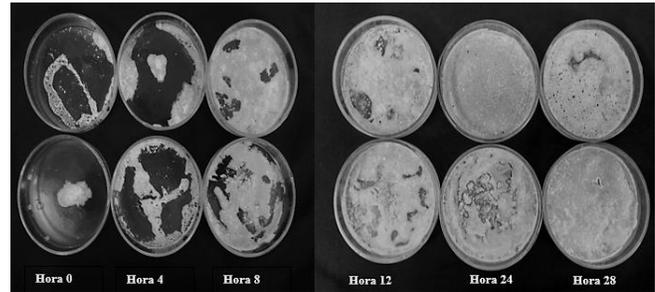


Figura 7. Fotos del polímero extraído desde la hora 0 hasta la hora 28, muestras cada 4h por duplicado, (de izquierda a derecha) en la estrategia D.O.40-10%. No se tomaron muestras en la hora 16 y 20.

Con el método de extracción utilizado se presentaban dificultades en las últimas horas para extraer el polímero dadas las altas cantidades de biomasa, lo que generaba un mayor grado de dificultad para extraer la fase del cloroformo con el polímero que se encontraba disuelto cuando se formaban las dos fases en el tubo falcon [5]; para esto también se debe tener en cuenta que con este método de extracción aunque es económico en costos, funcionó mejor para bajas densidades celulares y tener presente que puede llegar a degradar el polímero hasta en un 50% si no se hace el tratamiento adecuado [4,11]. La diferencia mencionada antes se ve claramente en la siguiente figura 8.

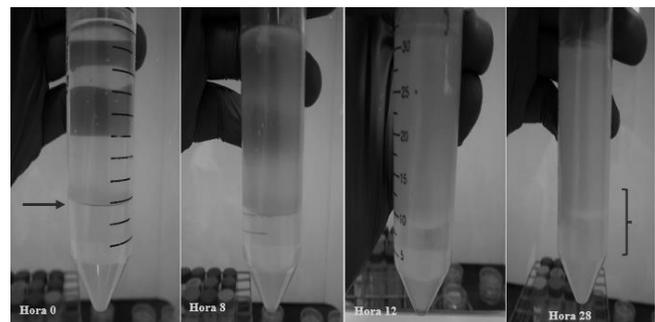


Figura 8. fases generadas para la extracción del biopolímero. Fase superior: hipoclorito y detritus celulares; fase inferior: cloroformo con el biopolímero soluble; de las horas 0, 8, 12 y 28 (izquierda a derecha).

El polímero que se obtiene de *R. eutropha*, es un PHB, el polímero de PHA más común [14]. Esto es importante a tener en cuenta ya que la naturaleza del polímero también dependerá del sustrato utilizado, así mismo, podrán variar sus componentes como lo son los grupos que lo conforman, pudiendo ser un copolímero cuando se utilizan sustratos diferentes o un homopolímero como es en este caso a partir de una fuente de sustrato como lo es la vinaza- melaza que las componen

sacarosa, fructosa y glucosa, sin embargo, generalmente la estructura de los PHA suele ser parcialmente cristalinas independiente del sustrato utilizado y es por esto que sus propiedades térmicas y mecánicas se presentan en términos de la temperatura de fusión y de transición. El método de extracción utilizado también influye en la cantidad del polímero obtenido y su disposición final, así, sabiendo esto, se pueden controlar algunas variaciones para la obtención del polímero final [1,5,7].

En resumen, la estrategia implementada constó de dos etapas que se reportan en la literatura como etapa de alimentación (condiciones ideales y que favorecen el crecimiento) y una fase de hambruna (condición de estrés para inducir la generación del biopolímero) [1]. El pulso suministrado a las 12 h, se observa en la figura 6 y genera la posibilidad de que *R. eutropha* ATCC 17699 no consuma el polímero acumulado que tiene como fuente de reserva y a su vez no se encuentre estresada por otras variables a parte del oxígeno ya que fue la variante de la hora 12 con un D.O que pasó de 40% las primeras 12 horas a 10% hasta las 28 horas obedeciendo a la estrategia que se buscaba implementar.

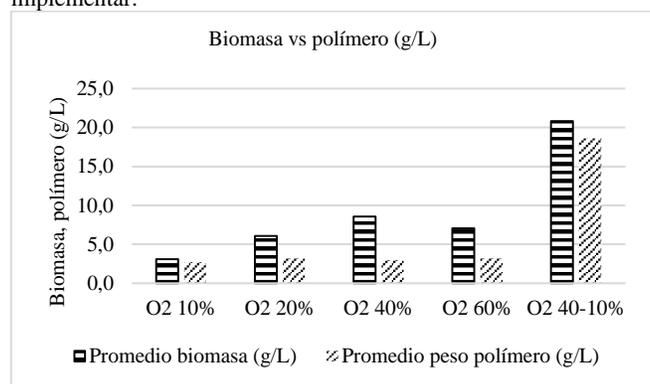


Figura 9. Producción de biomasa y polímero en el tiempo con las condiciones evaluadas (D.O. 10, 20, 40, 60%) y la estrategia implementada D.O.40-10%.

Los resultados obtenidos para la estrategia utilizada, en comparación con los tratamientos de D.O. antes evaluados, muestran cómo se favorece la producción del polímero en forma de biomasa.

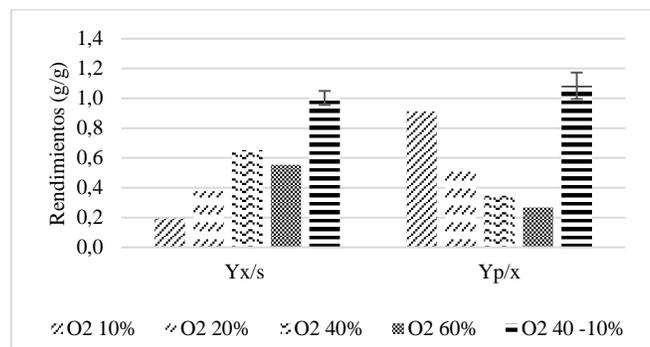


Figura 10. Rendimientos para cada tratamiento de D.O. incluyendo la estrategia implementada en medio alternativo vinaza-melaza, expresados en (g/g). $Y_{x/s}$ = g biomasa/ g sustrato; $Y_{p/x}$ = g producto/ g biomasa.

Los rendimientos que se obtuvieron con la estrategia evaluados en D.O. 40-10% son mucho mayores que los tratamientos evaluados durante las 28h en la misma condición (Los datos contienen la sobreestimación generada por los precipitados de la vinaza), este cambio de D.O. genera una forma de controlar la acumulación de este biopolímero, lo que nos muestra una estrategia que se puede aplicar a gran escala, dado que al controlarlo primeramente, se podrán favorecer

altas cantidades de biomasa para luego inducir la formación del biopolímero; por otro lado se debe tener en cuenta que la fuente de carbono que utilizó *R. eutropha* ATCC17699 fueron los azúcares presentes en la vinaza-melaza, esto la hace utilizar su ruta metabólica de carbohidratos, que a partir de acetil CoA se puede transformar en PHA y aunque es la ruta más corta, se ha visto que la ruta de la síntesis de ácidos grasos se obtiene una cantidad máxima de PHA dado que todos sus precursores pueden generar 3-hidroxitubirilo que luego se transformará en PHA [1, 18], esto con el fin de ampliar el rango de sustratos posibles para optimizar la producción a gran escala de PHA en *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 utilizando por ejemplo, fuentes de lipídicas.

2. Conclusiones

La utilización de sustratos alternativos provenientes de desechos como vinaza, suplementada con melaza y utilizando *R. eutropha* ATCC 17699, hacen que el proceso de producción de PHA se vea rentable y pueda competir económicamente, esto dadas las limitaciones presentadas por el costo de la fuente de carbono, productividad del proceso y su procesamiento posterior.

El efecto del D.O. como nutriente esencial puede generar la acumulación del biopolímero en *R. eutropha* ATCC 17699, sin embargo, también puede limitar su crecimiento, lo que hace necesario la combinación de estrategias para la producción simultánea de biomasa y PHA de forma que se pueda controlar su formación en las células.

Se lograron las mayores producciones de polímero en forma de biomasa con la estrategia implementada controlando el D.O. donde se favoreció la formación de biomasa (D.O. 40%) para luego generar la acumulación del biopolímero (D.O. 10%), lo que indica que su producción se puede controlar en este medio de cultivo alternativo

La estrategia implementada apunta a un mejoramiento en la producción de PHA, para producirlo de tal manera, que utilizando materiales de desecho con altos valores de DQO se obtengan PHA con aplicaciones biomédicas e industriales que ameriten los costos de producción.

3. Referencias

- [1] Pakalapati, H., Chang, C., Show, P. L., Arumugasamy, S. K., & Lan, J. C. (2018). Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126 (3), pp. 282–292. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>
- [2] Saratale G.D, Oh M.K. Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. *Int J Biol Macromol*. Elsevier B.V.; pp.627–35, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.034>.
- [3] Steinbüchel, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example, (1), pp. 1–24, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1002/1616-5195\(200101\)1:1%3C1::AID-MABI1%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1616-5195(200101)1:1%3C1::AID-MABI1%3E3.0.CO;2-B).
- [4] Raza Z.A, Abid S., Banat I.M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* (126) , pp. 45–56, 2018.
- [5] Alcaraz Zapata W. Producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de un aislado bacteriano, en cultivos de lote alimentado empleando harina de

- yuca como sustrato alternativo. Medellín. Universidad de Antioquia; Escuela de Microbiología. 2018.
- [6] Gholami A, Mohkam M, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: Opportunities and challenges. *Minerva Biotecnol.*;28(1): pp. 59–74, 2016.
- [7]) González García Y., Meza Contreras J.C., Córdova López J.A. SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO, *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 77-115, 2013. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v29n1/v29n1a7.pdf>.
- [8] ZUNIGA CERON V. & GANDINI AYERBE M. CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL DE LAS VINAZAS DE RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. *Dyna rev.fac.nac.minas*, Medellín. 80 (177) , pp. 124-131. 2013. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532013000100015&lng=en&nrm=iso.
- [9] Castilho, L. R., Mitchell, D. A., & Freire, G. Bioresource Technology Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100 (23), pp. 5996–6009, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>.
- [10] Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, pp.161–174, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
- [11] Lee, IY, Kim, MK, Park, YH y Lee, SY (1996). Efectos reguladores de nucleótidos de nicotinamida celular y actividades enzimáticas sobre la síntesis de poli (3-hidroxi butirato) en *Escherichia coli* recombinante. *Biotechnology and Bioengineering.*; 52(6): pp.707-712,1996. DOI: 10.1002 / (SICI) 1097-0290 (19961220) 52: 6 <707: AID-BIT8> 3.0.CO; 2-S.
- [12] Lefebvre G, Rocher M, Braunegg G. Effects of Low Dissolved-Oxygen Concentrations on Poly-(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Production by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Environ Microbiol.* 63 (3); pp. 827–33, 1997. DOI:<https://doi.org/10.1128/aem.63.3.827-833.1997>.
- [13]) Huschner F., Grousseau E., Brigham C.J, et al. Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. *Process Biochem.* Elsevier Ltd; 50 (2), pp. 165–72, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.004>.
- [14] Riedel S.L, Jahns S., Koenig S., Brigham C.J., et al. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *J Biotechnol Elsevier B.V.*; 214, pp. 119-27, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.002>.
- [15] ZÚÑIGA CERÓN, VANESSA , GANDINI AYERBE, MARIO ANDRÉS , CARACTERIZACIÓN AMBIENTAL DE LAS VINAZAS DE RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR RESULTANTES DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. *Dyna* [Internet]. 2013;80(177):124-131.
- [16] Cobos Becerra- Yazmin L., Ortiz Gómez- Helda M.EVALUACION DEL IMPACTO AMBIENTAL PRODUCIDO POR EL TRATAMIENTO ANAEROBIO DE VINAZAS. Especialización en Ingeniería Ambiental, Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. 2007. pp. 1-106.
- [17] MONTENEGRO GOMEZ, Sandra Patricia et al . Influencia de la aplicación de vinaza en actividad y biomasa microbiana en un Entic Dystropept y un Fluventic haplustoll del Valle del Cauca, Colombia. *Acta Agron., Palmira*; 58, (1), pp. 41-45, 2009. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122009000100007&lng=en&nrm=iso.
- [18] Luengo J.M., García B., Sandoval A., Naharro G., Olivera E.R. Bioplastics from microorganisms, *Current Opinion in Microbiology* 6(3): pp. 251–260, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7).
- [19] Yan Q., Du G., Chen J., Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem.* 39 (3): pp.387–91, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00127-4).