

Producción de poliésteres del tipo polihidroxicanoatos (PHAs) por *Ralstonia eutropha* H16 a partir de agua residual sintética de una industria de jugos.

Tatiana Rojas Betancourt

Asesor: Johana Husserl Orjuela, PhD.

Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad de los Andes, Colombia.

RESUMEN

Palabras claves:

Agua residual

PHAs

Ácidos grasos volátiles
(AGVs)

Ralstonia eutropha

Se utilizó agua residual sintética de una industria de jugos como sustrato para la producción de PHAs. La materia orgánica contenida en el agua residual se transformó en ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs) en un reactor de mezcla completa bajo condiciones anaerobias. La concentración de los AGVs totales alcanzada fue de alrededor de 1.9 g L^{-1} a partir de una carga de entrada al sistema de $4.4 \text{ kg DQO/m}^3 \text{ d}^{-1}$. El efluente ácido, después de un proceso de ultrafiltración, se utilizó como sustrato para la producción de PHAs por medio de la cepa *Ralstonia eutropha* H16. El máximo contenido de PHAs se alcanzó a las 72 horas de incubación con un porcentaje de acumulación del 65 % del peso seco de la biomasa. La caracterización del material polimérico por medio de cromatografía de gases permitió determinar que hubo formación del homopolímero polihidroxitirato (PHB).

1. Introducción

Debido al incremento del precio del petróleo durante los últimos 10 años, la sociedad está cambiando de una infraestructura basada en derivados del mismo a una más sostenible basada en recursos renovables. Este cambio ha requerido el desarrollo de nuevos campos de investigación enfocados en el estudio de la producción de plásticos biodegradables, a partir de biomasa, por medio de actividad microbiológica. Investigaciones previas han demostrado que una gran variedad de microorganismos cuentan con los mecanismos metabólicos necesarios para catalizar la formación de subproductos que podrían tener alto uso comercial al ser utilizados como plásticos [1].

Dentro de los biopolímeros más investigados se encuentra principalmente el grupo conocido como polihidroxicanoatos (PHAs). Los PHAs son una familia diversa de poliésteres naturales, sintetizados por una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de al menos 300 especies diferentes [2,3]. Estos se caracterizan por acumularse

naturalmente en el citoplasma bacteriano como material de reserva de carbono y energía cuando los microorganismos se encuentran en condiciones de estrés por limitación de macronutrientes esenciales (nitrógeno o fósforo) o limitadas en términos de aceptor de electrones (principalmente de oxígeno) y exceso de fuente de carbono [4,5]. Su almacenamiento se da en forma de gránulos móviles, líquidos y amorfos usualmente de carácter lipídico [5]. Los PHAs pueden ser degradados biológicamente mediante metabolismo microbiano y también se pueden moldear y reciclar como los plásticos convencionales [6].

Entre los PHAs, el polihidroxitirato (PHB) es el biopolímero que más se ha estudiado y cuya producción se da con mayor frecuencia en la naturaleza [5]. Éste es interesante en el mundo de los materiales elastómeros y termoplásticos por tener propiedades similares a las de los plásticos petroquímicos como el polipropileno (punto de

ebullición y su forma de cristalización) pero a diferencia de estos últimos, es producido a partir de fuentes renovables [4,5,7,8]. A pesar que algunos estudios se han enfocado en determinar cuáles son las rutas y los mecanismos que regulan la producción de PHB, las enzimas implicadas en su síntesis y sus propiedades más importantes como biopolímero [4, 8], su producción y uso (así como el de otros bioplásticos menos comunes) todavía son limitados a nivel comercial debido a los altos costos asociados a su fabricación y recuperación [4,9]. Para disminuir estos costos, en nuevas investigaciones se han abordado diferentes estrategias, entre ellas el uso de cepas especializadas modificadas genéticamente, la optimización de los procesos de fermentación y el uso de sustratos más económicos [4, 7,8].

En la actualidad, entre el 30 y el 50 % del costo total de producción de los PHAs se debe al sustrato elegido para el crecimiento de los microorganismos responsables de su síntesis (lactosa, glucosa, ácido acético, entre otros) [4]. Esto significa que es de gran interés encontrar fuentes de carbono que sean mucho más económicas. Recientemente se han venido haciendo pruebas con sustratos como la materia orgánica presente en agua residuales o desechos orgánicos [9]. Sin embargo, estos sustratos son complejos para ser utilizados directamente por las bacterias productoras de PHA como *Ralstonia eutropha* (antes conocida como *Alcaligenes eutrophus*) [9]. Para solucionar esto, se han utilizado bioreactores que permiten transformar dicha materia orgánica, mediante su hidrolización y acidificación por un proceso anaerobio, en ácidos grasos volátiles de cadena corta como el ácido acético, propiónico y butírico. Estos compuestos pueden ser utilizados como fuente de carbono por *R. eutropha* para formar y almacenar inclusiones de PHA de diferentes tamaños en su citoplasma [4].

Con base en las anteriores observaciones, el objetivo de este estudio es evaluar el potencial de utilizar el material orgánico contenido en un agua residual sintética de una industria de jugos como sustrato, después de un proceso de fermentación, para la

producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) por medio de la cepa productora *R. eutropha*. Para esto se debe contestar la siguiente pregunta: ¿después del proceso de fermentación del agua residual, la concentración de ácidos grasos volátiles es suficiente para permitir el crecimiento de *R. eutropha* y la acumulación intracelular de PHAs? El presente proyecto contestará esta pregunta por medio de metodologías experimentales que estarán enfocadas hacia los siguientes los objetivos específicos:

- (i) Transformar el agua residual industrial de jugos en ácidos grasos de cadena corta bajo condiciones anaerobias al utilizar un reactor de mezcla completa.
- (ii) Analizar la capacidad de crecimiento de *R. eutropha* H16 y la producción de PHAs al utilizar como sustrato la materia orgánica contenida en el permeado después del proceso de ultrafiltración del agua residual fermentada.
- (iii) Detectar, cuantificar y caracterizar el polímero acumulado intracelularmente por *R. eutropha*.

2. Materiales y Metodología

2.1. Bioreactor

Para el desarrollo de la investigación se utilizó un reactor anaerobio de mezcla completa por lotes, elaborado en acero inoxidable (Figura 1). El reactor tenía un volumen efectivo de 6 L, se manejó un volumen de descarga y alimentación de 4 L, dejando así 2 L como remanente en el sistema para conservar parte de la biomasa durante el proceso. En la parte superior del reactor se encontraban los sistemas de control automático de temperatura, agitación y pH (controlado con la dosificación de NaOH y HCl 2N).

El reactor se operó en condiciones mesofílicas (29-35 °C). El lodo semilla utilizado para inocular el reactor fue un lodo proveniente de un reactor anaerobio utilizado para la producción de H₂ mediante fermentación oscura y fue suministrado

por el Centro de Investigaciones en Ingeniería Ambiental (CIIA) de la Universidad de los Andes [10].

2.2. Módulo de membrana de ultrafiltración

Para la construcción de la base del módulo de ultrafiltración se utilizó un tubo de acrílico de 30 cm de largo y 2.5 cm de diámetro. Las membranas utilizadas fueron de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro máximo de 0.05 μm , y un diámetro exterior de 1 mm. El número de membranas acopladas fue de 13, resultando en un área de membrana disponible para filtración de 0.031 m^2 .

Antes de pasar el agua por el módulo de ultrafiltración se realizó un proceso de filtración (filtro de 0.40 μm Millipore) para la remoción de los sólidos suspendidos totales (SST) provenientes del reactor anaerobio, con el fin de disminuir el taponamiento de las membranas. Para determinar si hubo un proceso de esterilización del agua a través de las membranas se sembraron alícuotas de 100 μL de agua filtrada en cajas petri con medio LB. Las cajas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas y se observó si hubo crecimiento de bacterias.

2.3. Alimentación del reactor

El reactor fue alimentado con un agua residual sintética de una industria de jugos que tenía una demanda química de oxígeno soluble (DQO) de 3300 mg DQO L^{-1} , equivalente a una carga orgánica (OLR- *Organic Loading Rate*) de 4.4 ± 0.7 kg DQO/ m^3 d^{-1} . En la Tabla 1 se puede observar la caracterización del agua (soluble) con los parámetros más importantes.

Tabla 1. Caracterización del agua residual utilizada como alimento del bioreactor.

Parámetro	Valor
DQO ($\text{mg O}_2\text{L}^{-1}$)	3300
Nitrógeno total (mgL^{-1})	7.6
Fosforo total (mgL^{-1})	5.84
pH	4.4

2.4. Muestreo

Para hacer un seguimiento sobre las condiciones del reactor anaerobio, se realizaron dos tipos de muestreo: frecuente y regular. El muestreo frecuente se hizo todos los días y correspondió al control de los parámetros de pH y AGV totales. El muestreo regular fue realizado cada 7 días en los cuales la DQO, SST y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) fueron determinados. A excepción de los SSV y SST, todas las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos y luego se pasaron por un filtro de 0.2 μm (Millipore).

2.5. Métodos de cuantificación de parámetros en el bioreactor

La cantidad de material orgánico fue medida indirectamente por medio de pruebas de DQO (Método: SM 5220 D Modificado). Esta prueba se realizó para el influente al sistema y el efluente del reactor. Los AGVs totales se midieron por medio del método titulométrico (MT-PRE-018-Uniandes) y su composición se cuantificó por medio de cromatografía de gases (CG) en un cromatografo HP-6890 Plus con detector fotométrico de llama FID y columna capilar (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (Uniandes).

2.6. Microorganismo y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó la cepa *Ralstonia eutropha* H16, la cual fue donada por el laboratorio de Jim Span en Gatech (Atlanta, USA). La bacteria se conservó a -80 °C mediante la preparación de criovales de 1 mL con glicerol (agente crioprotector).

El agua residual fermentada, después del proceso de filtración, fue usada como medio para el crecimiento de *R. eutropha*. Para el experimento se usaron Erlenmeyers de 250 mL con 47.5 mL del medio y 2.5 mL de inóculo (representando 5% de inóculo). El pH del medio se ajustó a 7.5 con NaOH 2N y el cultivo se mantuvo en condiciones controladas de temperatura y agitación (30°C, 150 rpm), durante 72 horas [11].

2.7. Monitoreo del cultivo

Se hizo un seguimiento al crecimiento de *R. eutropha* mediante la medición de la absorbancia de los cultivos y la concentración de AGVs en el medio. La densidad celular de los cultivos fue analizada a partir de una muestra de 1 mL, a la cual se le realizaron medidas de densidad óptica (OD_{600}) en un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c [12]. La concentración de AGVs en el medio se determinó por el método titulométrico (MT-PRE-018-Uniandes) cada 24 horas durante el periodo incubación.

La biomasa del cultivo se determinó teniendo en cuenta una curva de calibración construida previamente que relacionaba la absorbancia y la concentración de la biomasa en peso seco.

Para los ensayos se usó como blanco un medio de agua fermentada filtrada sin inóculo, bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y agitación aplicadas para el crecimiento de *R. eutropha*.

2.8. Detección, cuantificación y caracterización del polímero

Para hacer un seguimiento de la producción de PHAs, se tomaron muestras de los cultivos a las 24, 48 y 72 horas de la inoculación y se observó la acumulación del polímero en las células de *R.*

eutropha mediante la tinción de los gránulos con la solución Negro Sudan B [13]. Las preparaciones se examinaron en el microscopio óptico Olympus a un aumento de 100x bajo aceite de inmersión.

La técnica para la cuantificación de los PHAs acumulados se desarrolló mediante dispersiones de hipoclorito de sodio y cloroformo conforme a la metodología descrita por [14]. El método consistió en la liberación del polímero de las células bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura, en las cuales el material celular fue disuelto (excepto los gránulos de PHA) en una solución alcalina de hipoclorito. Los PHAs liberados quedaron contenidos en la fase con cloroformo, donde posteriormente se recuperó el polímero por centrifugación, se secó a 60°C hasta peso constante y finalmente se pesó.

Se realizó un blanco con todos los reactivos usados en la técnica anterior, para determinar que el producto obtenido no proviniera de la reacción entre ellos y un control negativo con una cepa no productora de PHAs (*Bacillus cereus*). Adicionalmente, para determinar qué porcentaje de PHAs se había acumulado intracelularmente en la bacteria, se tomaron muestras previas y se calculó la concentración de la biomasa en peso seco.

La caracterización del tipo de PHA formado se desarrolló por medio de cromatografía de gases (HP 6890 Series) equipado con una columna HP 5 (30 m x 0,53 mm x 1µm) [15]. Las muestras se prepararon de acuerdo a la metodología aplicada por [15] y se usó PHB (Sigma Aldrich) como estándar.

En la figura 1 se puede observar el proceso esquemático que se llevó a cabo durante la investigación para transformar el agua residual a PHAs.

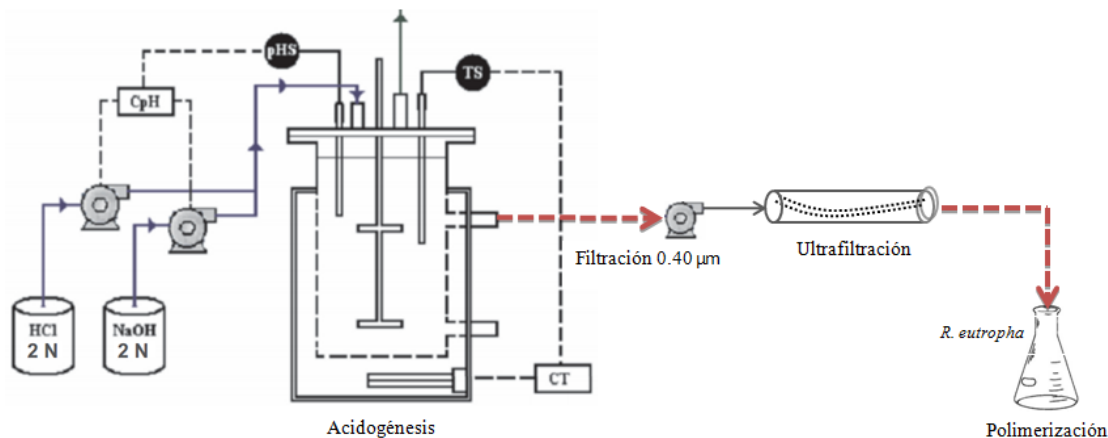


Fig 1. Proceso esquemático de la transformación del agua residual a PHA a partir de la formación de ácido en un reactor de mezcla completa, un módulo de ultrafiltración para esterilización del agua y polimerización por medio de *R. eutropha* bajo condiciones controladas de agitación y temperatura.

3. Resultados y discusión

3.1. Comportamiento del reactor y módulo de membranas

En la Tabla 2 se observa el comportamiento general del reactor durante su operación. La materia orgánica disuelta del influente fue removida por medio de procesos biológicos en un 24% aproximadamente. No hubo detección de ácidos orgánicos en el influente del reactor lo que permite concluir que los ácidos se formaron únicamente a partir de la digestión del agua residual. La producción de AGVs en el reactor anaerobio de mezcla completa fue de alrededor de $1.9 \text{ g L}^{-1} \pm 0.45$ durante el tiempo de estudio bajo un tiempo de retención (TRH) de 12 horas (Figura 2).

El pH se mantuvo estable en 5.5 durante el proceso, con el propósito de inhibir el crecimiento de las archeas consumidoras de AGVs (metanogénicas) y potenciar la presencia de las bacterias acidogénicas en el reactor [10].

Las membranas cumplieron un papel fundamental en términos de esterilización del

agua usada para la producción de PHAs. No se evidenció crecimiento de microorganismos durante el proceso de filtración y se pudo utilizar el agua como medio para el crecimiento de *R. eutropha*.

Tabla 2. Comportamiento general del reactor

Parámetro	Valor
OLR $\text{kg m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$	4.4 ± 0.7
pH	5.5 ± 0.2
% Remoción (DQO soluble)	24 ± 4.9
SSV mg L^{-1} (%)	766 ± 12.3 (81.32)
SSV/SST	± 4.96
AGV (g L^{-1})	1.9 ± 0.45

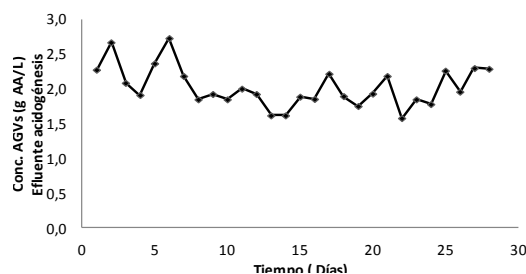


Fig 2. Resultados de la producción de AGVs en el reactor anaerobio durante los últimos 30 días de ensayos.

3.2. Crecimiento de *R. eutropha*

El comportamiento del crecimiento de *R. eutropha* durante el experimento, se muestra en la Figura 3.

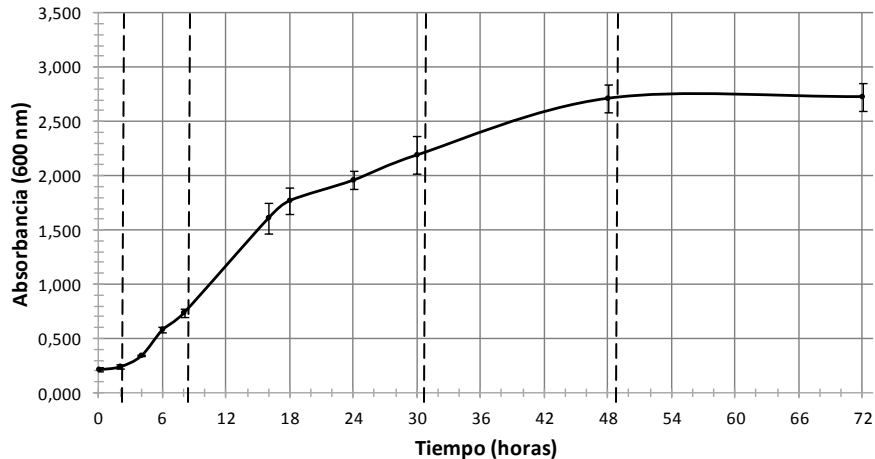


Fig 3. Cinética de crecimiento de la cepa *R. eutropha* en cultivo alimentado con agua residual fermentada. Los valores presentados son el promedio de un duplicado con sus respectivas desviaciones estándar mostradas con barras de error.

En la curva de crecimiento se puede observar que la fase de latencia de la bacteria tomó aproximadamente dos horas; periodo en el cual el microorganismo acomodó sus herramientas para degradar el sustrato. Después de este tiempo, la bacteria creció exponencialmente durante las siguientes 28 horas de incubación donde creció con mayor rapidez. A partir de este punto, la velocidad de crecimiento disminuyó considerablemente hasta que entró completamente a la fase estacionaria a las 48 horas.

Para determinar la cinética de crecimiento de *R. eutropha* y degradación de los AGVs durante el periodo de incubación, se ajustaron los datos experimentales al modelo de Monod mediante el uso de la herramienta de Excel. Este modelo es el más comúnmente usado para relacionar el crecimiento bacteriano con la utilización de sustrato (fuente de carbono). La tasa de crecimiento (dX/dt) está en función no solamente de la concentración microbiana sino también de algún sustrato limitante (S):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Donde μ : es la tasa de crecimiento específico (d^{-1}); μ_{\max} : Tasa de crecimiento específico máximo (d^{-1}); S: Concentración de sustrato (mg/L) y K_s : Constante de saturación (mitad) (mg/L).

La ecuación anterior se puede sustituir por (Modelo de Monod):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} X - bX$$

En la figura 4 se puede ver el resultado obtenidos del ajuste de los datos experimentales al modelo de Monod. Durante el seguimiento cinético con el modelo se obtuvo un rendimiento (Y) de 0.41 g de biomasa/ g de AGVs, una velocidad específica de crecimiento máximo (μ_{\max}) de 0.3 h^{-1} y un K_s de 0.6 g/L, el cual fue usado de acuerdo a la literatura reportada [25]

Se pudo observar de la misma manera un incremento gradual en el consumo de los AGVs en el medio a medida que *R. eutropha* utilizaba los ácidos como fuente de carbono y energía para su crecimiento celular y síntesis de PHAs (Figura 4). El mayor consumo de AGVs se presentó durante las primeras 24 horas incubación (1.42 g L^{-1}); período en el cual la bacteria se encontraba en fase exponencial de crecimiento. Después de este punto el crecimiento celular disminuyó considerablemente hasta que entró a la fase estacionaria, como consecuencia de una limitación de la fuente nitrógeno en el medio y no del carbono; al finalizar los ensayos, se encontró que la fuente de carbono no se había consumido en su totalidad, quedando alrededor de 11% de AGVs residual.

Lo anterior se pudo ver reflejado de igual manera en los resultados obtenidos al utilizar el modelo de Monod (Figura 4). Los últimos datos experimentales para la degradación de los AGVs no fueron posibles de ajustar con el modelo debido a que el sustrato limitante (S) durante esta última etapa no fue el carbono (AGVs) como se venía evaluando, sino el nitrógeno. Por lo tanto, estas condiciones bajo limitación de la fuente de carbono favorecieron a la acumulación intracelular de los PHAs y no al crecimiento celular. Du, G (2001) En su investigación comparó la cinética de crecimiento de *R. eutropha* cuando esta se encontraba bajo dos condiciones de nutrientes diferentes por limitación en la fuente de carbono (glucosa) y por la fuente de nitrógeno, encontrando que bajo limitación de este último nutriente en el medio, las tasas de crecimiento específico de la bacteria eran más bajas y la tasa de síntesis de PHB era diez veces mayor que cuando había una limitación por glucosa [25]; esto se debe a que la bacteria utiliza la fuente de carbono como reserva de

energía cuando se encuentra en condiciones de estrés.

Estudios han demostrado que *R. eutropha* puede metabolizar los AGVs de cadena corta para la formación de PHAs [11,16,17]. Sin embargo, la utilización de estos ácidos puede variar considerablemente dependiendo de la concentración inicial de AGVs que haya en el medio [2]. Bajas concentraciones iniciales de AGV, pueden resultar en bajas tasas de utilización de los ácidos por parte de *R. eutropha* para que pueda acumular los PHAs intracelularmente debido a la limitación de sustrato, mientras que bajo concentraciones iniciales adecuadas las moléculas de los ácidos grasos pueden entrar al citoplasma, ser activadas y metabolizadas en CO_2 , biomasa y PHAs [2]. La concentración inicial de AGVs utilizada en este estudio se encuentra dentro de los rangos reportados [18] para el uso efectivo de los AGVs como fuente de carbono para la síntesis de PHAs por medio

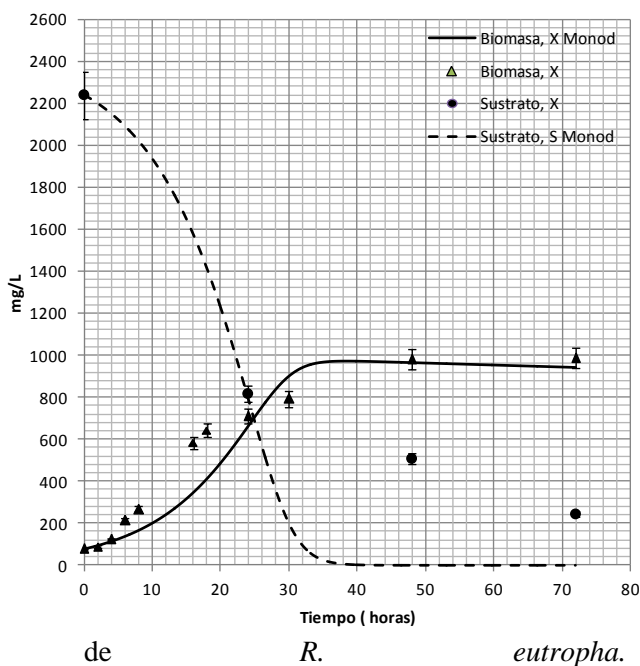


Fig 4. Cinética de crecimiento de *R. eutropha* (\blacktriangle) y consumo y consumo de AGVs durante el periodo de incubación (\bullet). Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos al modelo

3.3. Detección y cuantificación de la acumulación de Polihidroxicanoatos (PHAs)

Durante el crecimiento de *R. eutropha* se evaluó la acumulación intracelular de PHA en sus células mediante la técnica de detección por microscopía óptica al usar la solución lipofílica Negro Sudan B. Este colorante se usó por su gran afinidad por los compuestos de naturaleza lipídica como lo son los PHAs. Cuando hay presencia del polímero los gránulos se tiñen de gris-negro bajo iluminación directa, mientras que en ausencia la célula se ve de color rosado-rojizo.

Tras la tinción con el colorante, se logró visualizar los gránulos de PHA de color negro refringentes en el citoplasma de la bacteria (Figura 5). La técnica permitió monitorear la formación del polímero en las diferentes etapas de incubación para posteriormente proceder a su extracción y caracterización (Figura S1); la acumulación de PHAs fue apreciable en las células de la bacteria a partir de la hora 24 hasta que terminó el ensayo.

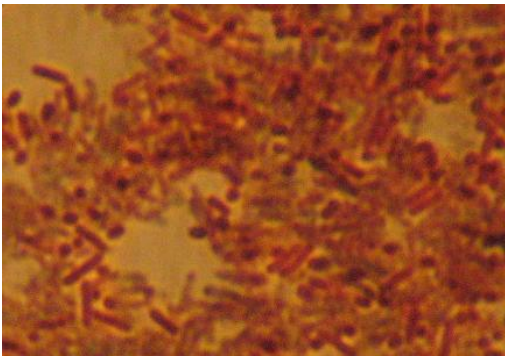


Fig 5. Acumulación de gránulos de PHA a un aumento de 100X en *R. eutropha* H 16 en un cultivo de 48 horas tras la tinción con la solución Negro Sudan. Las flechas negras señalan ejemplos de gránulos de PHA dentro de las células.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de la técnica para la cuantificación de los PHAs acumulados en la bacteria. Se

puede ver que hubo un incremento gradual en la concentración de PHAs a partir de la hora 24 hasta la hora 48 y después de este punto se presentó un incremento brusco durante toda la fase estacionaria hasta la hora 72. El máximo contenido de PHAs se registró una vez finalizó el ensayo con una concentración de $1.3 \text{ g L}^{-1} \pm 0.28$, representado un porcentaje de acumulación del 65% del peso seco de la biomasa y una productividad de $0.05 \text{ g PHAs / hora}$. Estos resultados coinciden con los reportados por [19,20], quienes concluyeron que la cepa *R. eutropha* acumula el mayor contenido de PHAs una vez entra a la fase estacionaria.

Los datos anteriores también evidenciaron que el cultivo de *R. eutropha* se mantuvo exitosamente, produciendo una biomasa con alto contenido de PHAs comparado con el obtenido de producciones convencionales de PHAs a partir del uso de glucosa pura como fuente de carbono [11]. En la investigación desarrollada por El-Sayed, se registró una máxima acumulación de PHAs del 60.3% a partir de un medio con 20 g L^{-1} de glucosa como fuente de carbono [19]. De la misma manera, se encontró que el porcentaje acumulado de PHAs en esta investigación se encuentra por encima de la mayoría de los resultados reportados para la producción de PHA a partir del uso de agua residual fermentada como sustrato; en algunos casos se registran porcentajes de acumulación de alrededor del 50% del peso seco de la biomasa [21]. Esto demuestra que la materia orgánica contenida en sustratos económicos como el agua utilizada en este estudio, puede ser usada para generar productos de alto valor como lo es el plástico.

La imagen del polímero extraído de la bacteria después del periodo de incubación, se puede ver en la Figura S2

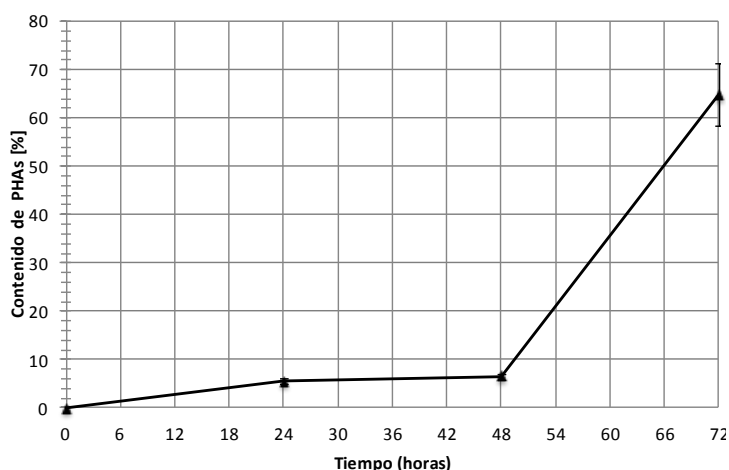


Fig 6. Porcentaje de acumulación de PHAs durante el tiempo de incubación. Para esta prueba se determinó inicialmente la concentración de la biomasa en peso seco producida en cada etapa y luego se realizó la cuantificación de PHAs.

3.4. Caracterización del polímero

Se ha demostrado que los ácidos grasos volátiles de cadena corta como el ácido acético, propiónico y butírico, pueden ser utilizados por *R. eutropha* como fuente de carbono y energía para el crecimiento celular y síntesis de PHA [11, 16,17]. Sin embargo, de acuerdo a la literatura consultada, el contenido final de PHAs puede variar considerablemente dependiendo de la composición de los AGVs de cadena corta que estén presentes en el medio [18]. Por este motivo, mediante la prueba de cromatografía de gases, se determinó la composición de los principales ácidos presentes en el medio de cultivo que fueron utilizados por *R. eutropha* para la producción de PHAs.

De acuerdo a los resultados obtenidos el ácido butírico fue el ácido que predominó en el medio representando el $68 \% \pm 0.72$ de los AGVs producidos, seguido del ácido propiónico con un $31\% \pm 0.72$ y en menor

proporción el ácido isobutírico y valérico ($<1\% \pm 0.72$).

La prueba de cromatografía mostró que hubo formación del homopolímero poli (3-hidroxi-butirato) o PHB al utilizar el agua fermentada como sustrato para su síntesis por medio de *R. eutropha*; biopolímero que más se ha estudiado y cuya producción se da con mayor frecuencia en la naturaleza [5]. El tiempo de retención obtenido durante esta prueba para el metil- β -hidroxi-butirato fue de 3.87 minutos (Figura S3).

Lo anterior sugiere que la composición de los ácidos en el medio fue adecuada como fuente de carbono para la síntesis de PHB por medio de *R. eutropha*, principalmente por la presencia en mayor concentración del ácido butírico en el medio. Esto coincidiendo con los datos reportados por varios autores [17-18], quienes concluyeron que dependiendo del ácido que predomine en el medio, *R. eutropha* va a preferir el ácido butírico para la formación de PHB y el ácido propiónico para

la formación del copolímero poli(hidroxibutirato-hidroxivalerato). Éste último es el polímero más deseado para producción debido a que tiene mejores propiedades termo-mecánicas que el PHB [22] y cuya formación se podría incrementar al variar parámetros operativos en el reactor que permitan aumentar la formación del ácido propiónico durante la fermentación del agua.

4. Conclusiones

En este trabajo de investigación se evaluó el potencial de utilizar el agua residual sintética de una industria de jugos (después de un proceso de fermentación) como sustrato para la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) al utilizar a *Ralstonia eutropha* como microorganismo productor. Se analizó su crecimiento y la síntesis de PHAs por medio de técnicas cualitativas y cuantitativas.

Se pudo utilizar el reactor de mezcla completa para la producción de AGVs a partir de la digestión de la materia orgánica del agua residual, alcanzando concentraciones de alrededor de 1.9 g L^{-1} a partir una carga orgánica aplicada al sistema de $4.4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Después de un proceso de ultrafiltración, el efluente ácido pudo ser utilizado por *R. eutropha* como fuente de carbono y energía para su crecimiento.

Mediante la técnica cualitativa, se pudo monitorear la acumulación de PHA en las células de *R. eutropha* en las diferentes etapas de crecimiento. Igualmente, se pudo cuantificar la concentración de PHA, obteniendo como resultado una producción de PHAs de 1.3 g L^{-1} , representando un porcentaje de acumulación del 65%. La caracterización del material extraído mediante cromatografía de gases permitió determinar que hubo formación del homopolímero polihidroxibutirato o PHB.

5. Recomendaciones

Si se quiere obtener polímeros de mejores propiedades como por ejemplo el copolímero poli(hidroxibutirato-hidroxivalerato), sería recomendable evaluar diferentes variables operativas como la temperatura, carga orgánica, tipo de sustrato y el pH para determinar cómo varía la composición final de los AGVs en el efluente y cómo puede afectar el tipo de PHA formado en cuanto a estructura y peso molecular. Se podría usar otros estándares que permitan identificar por medio de cromatografía de gases la formación de otros tipos de PHAs.

En próximas investigaciones, sería ideal determinar las propiedades físicas y mecánicas del material extraído debido porque de esta forma se podría evaluar su calidad como biopolímero. Dentro de las propiedades físicas y mecánicas se destacan: el elevado punto de fusión, baja rigidez, temperatura de transición vítrea (el cual se puede realizar por medio de calorimetría diferencial de barrido DSC) y la cristalinidad [24].

6. Agradecimientos

Se agradece al Centro de Investigaciones en Ingeniería Ambiental-CIIA de la Universidad de los Andes.

7. Bibliografía

- [1] McEwen, J. T., & Atsumi, S. (2012). Alternative biofuel production in non-natural hosts. *Current opinion in biotechnology*, 23(5), 744-750
- [2] Chakraborty, P., Gibbons, W., & Muthukumarappan, K. (2009). Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. *Journal of applied*

- microbiology*, 106(6), 1996-2005. 5516.
- [3] Coats, E. R., Loge, F. J., Wolcott, M. P., Englund, K., & McDonald, A. G. (2007). Synthesis of polyhydroxyalkanoates in municipal wastewater treatment. *Water Environment Research*, 79(12), 2396-2403.
- [4] Carraso, F., & Dionisi, D. (2004). Los polihidroxicanoatos. Plásticos biodegradables producidos por microorganismo. pp. 244-251.
- [5] Yang, S. T. (Ed.). (2011). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Elsevier.
- [6] Cerrone, F. (2011). Producción de poliésteres biopolímeros (PHAs) desde alpeorujopor medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. *Microbiología*, p. 152.
- [7] Fuentes, L. (2012). Optimización y refinamiento de la producción de polihidroxicanoatos a partir de *Herbaspirillum Seropedicae*, Montevideo.
- [8] Hernandez, M. (2007). Producción de hidrógeno a través de la digestión anaerobia del estiércol de cerdo, in Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental. Universidad de los Andes, Bogotá.
- [9] Du, G., & Yu, J. (2002). Green technology for conversion of food scraps to biodegradable thermoplastic polyhydroxyalkanoates. *Environmental science & technology*, 36(24), 5511-
- [10] Du, G., Si, Y., & Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology letters*, 23(19), 1613-1617.
- [11] Bojacá, V. (2012). Optimización de cepas por medio de ingeniería genética para la producción de biopolímeros in Departamento de Ingeniería civil y ambiental. Universidad de Los Andes, Bogotá.
- [12] Barbosa, M. (2005). Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana*, 10 (1), 45-54.
- [13] Nighat, N., Nazia, J., Shahida, H., & Ghulam, A. (2012). Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae* bacterium sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. *African Journal of Biotechnology*, 11(14), 3321-3332.
- [14] Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., & Chang, H. N. (1994). Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), 256-261.
- [15] Braunegg, G., Sonnleitner, B. Y., & Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and*

Biotechnology, 6(1), 29-37.

- [16] Hafuka, A., Sakaida, K., Satoh, H., Takahashi, M., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2011). Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. *Bioresource technology*, 102(3), 3551-3553.
- [17] Yu, J. (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 105-112.
- [18] Yu, J., Si, Y., Keung, W., & Wong, R. (2002). Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 37(7), 731-738.
- [19] El-Sayed, A. A., Abdelhady, H. M., Abdel Hafez, A. M., & Khodair, T. A. (2009). Batch production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(5), 556-564.
- [20] Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(1), 21-53.
- [21] Jeyaseelan, A., Pandiyan, S., & Ravi, P. (2012). Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) using hydrolyzed grass and syzygium cumini seed as low cost substrates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(3), 970-982.
- [22] Wang, J., Yue, Z. B., Sheng, G. P., & Yu, H. Q. (2010). Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 422-428..
- [23] Wong, H. H., & Lee, S. Y. (1998). Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(1), 30-33.
- [24] Ortiz, E.(2009). Obtención, aislamiento e identificación de cepas bacterianas presuntas productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs). Xalapa, Ver.
- [25] Du, G., Chen, J., Yu, J., & Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of biotechnology*, 88(1), 59-65.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

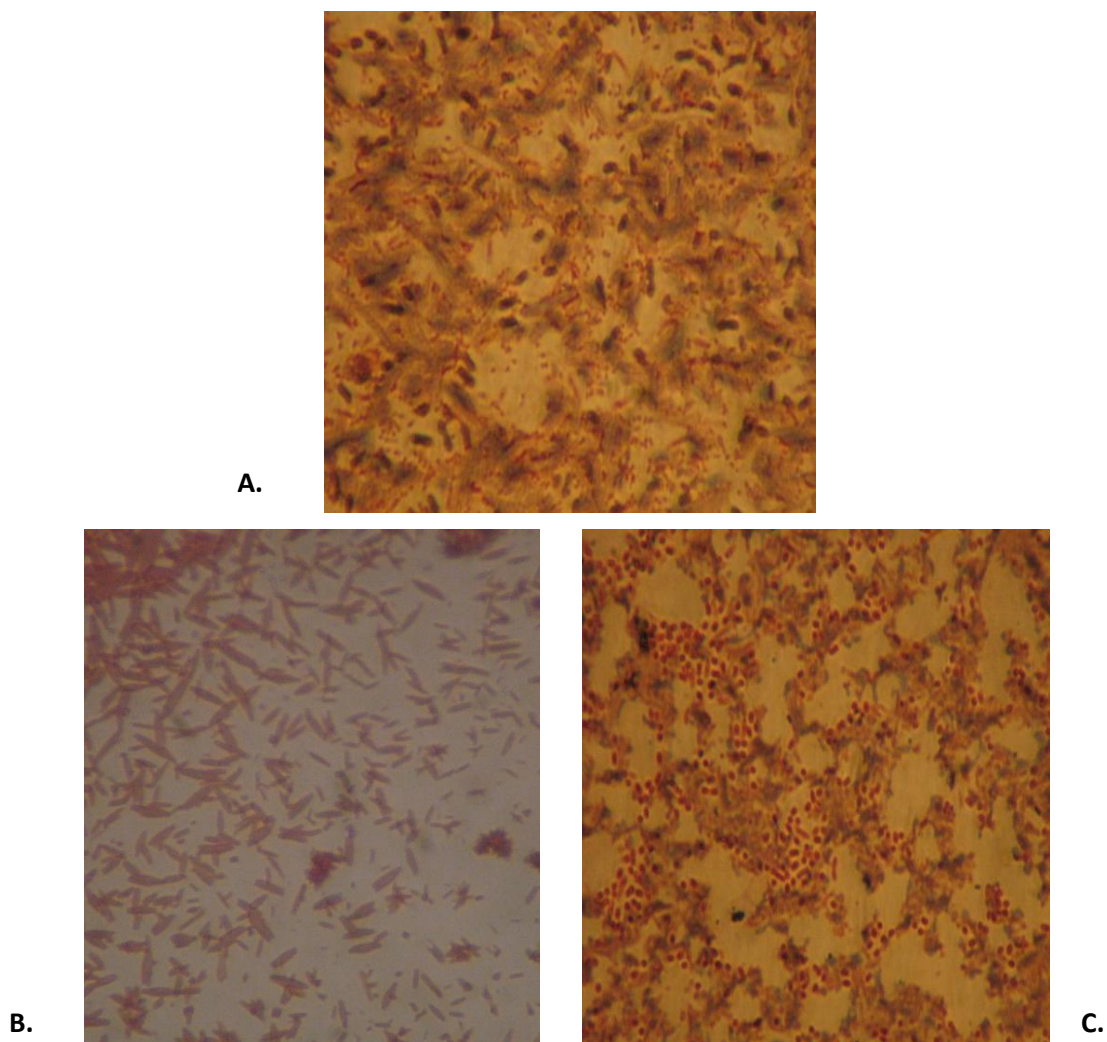


Figura S1. Resultados obtenidos durante la detección de PHA por medio de la técnica de microscopía con Negro Sudan. La imagen A corresponde a la bacteria utilizada como blanco para esta prueba (*Bacillus cereus*) y las imágenes B y C a las detecciones del biopolímero a las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente.

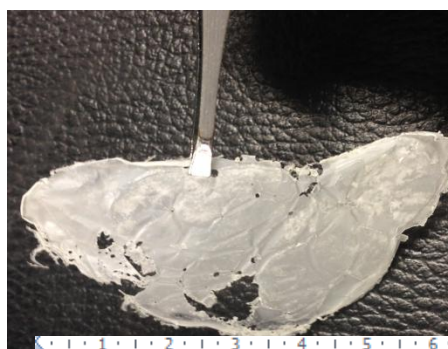


Figura S2. Polímero extraído con 6,5 cm de largo.

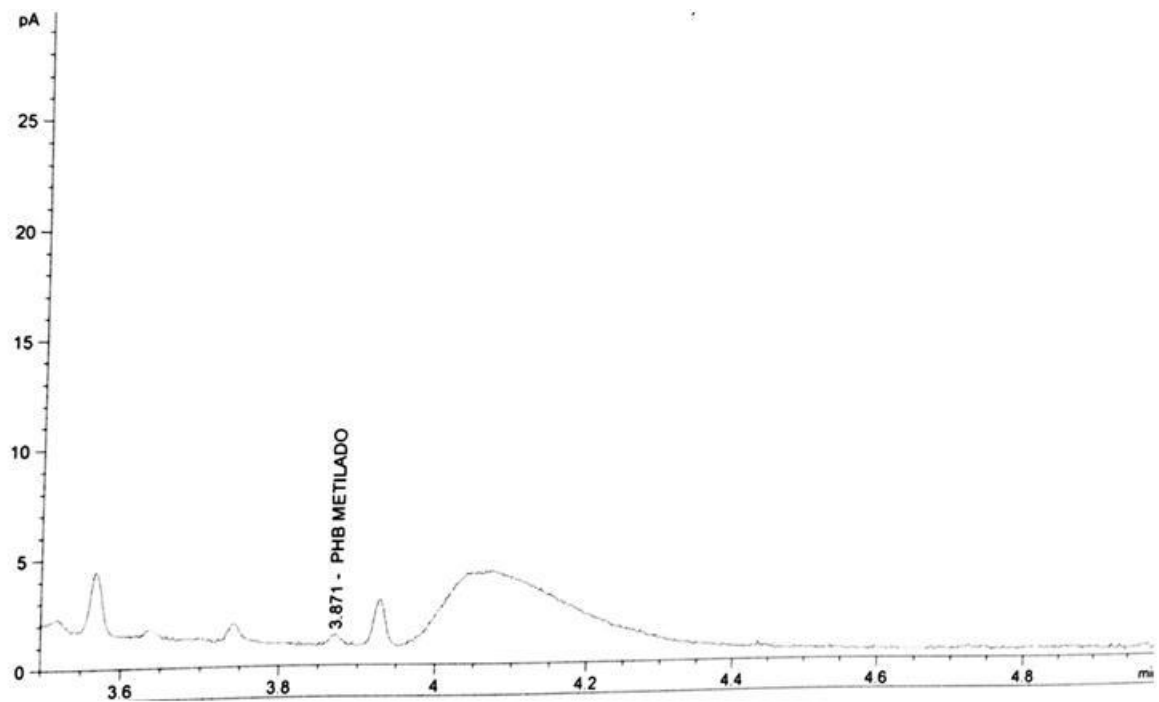


Figura S3 Cromatograma de una muestra de PHA del cultivo de *R. eutropha* sometido a metanólisis donde se aprecia el pico del metil- β -hidroxibutirato con un tiempo de retención de 3.87 minutos. Los primeros picos corresponden al cloroformo y el metanol utilizados para la metanólisis de la muestra. Las siguientes curvas corresponden al metil-benzoato usado como estándar interno (1) y metil éster del ácido butanoico (2).