

## Tesis de Posgrado

# Producción microbiológica del políester biodegradable poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B

Quagliano, Javier Carlos

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Quagliano, Javier Carlos. (1998). Producción microbiológica del políester biodegradable poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3096\\_Quagliano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3096_Quagliano.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Quagliano, Javier Carlos. "Producción microbiológica del políester biodegradable poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3096\\_Quagliano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3096_Quagliano.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA**

**PRODUCCION MICROBIOLOGICA DEL POLIESTER  
BIODEGRADABLE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) A  
PARTIR DE *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM 6B***

**AUTOR: Lic. JAVIER CARLOS QUAGLIANO**

**DIRECTOR: Dra. SILVIA SUSANA MIYAZAKI**

**Tesis para optar al Título de DOCTOR de la UNIVERSIDAD DE  
BUENOS AIRES**

**1998**

**Nº 3096 -**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA**

**MICROBIAL PRODUCTION OF THE BIODEGRADABLE  
POLYESTER POLY-3-HYDROXYBUTYRATE (PHB) FROM  
*AZOTOBACTER CHROOCOCCUM 6B***

**AUTHOR: Lic. JAVIER CARLOS QUAGLIANO**

**DIRECTOR: Dra. SILVIA SUSANA MIYAZAKI**

**Thesis to apply for the Doctoral degree of the UNIVERSITY OF  
BUENOS AIRES**

**1998**

**Dedico este trabajo especialmente a**

**Lina y Camila**

**y también**

**a la memoria de mis padres.**

**Quiero agradecer...**

**A la Dra. Silvia Miyazaki por su guía constante, experiencia y consideración no sólo por el trabajo sino por las personas**

**Al consejero Dr. Jorge Sproviero por su buena voluntad, predisposición permanente y provechosas charlas**

**A la Dra. Elizabeth Grillo Fernandes del Departamento de Macromoléculas de la Universidad de Pisa y a Fernando Amarilla del Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) de la Universidad Nacional de La Plata, por su ayuda en las mediciones de peso molecular**

**A la gente del Centro de Investigación para la Industria Plástica (CITIP) del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) por su interés y colaboración en la realización de distintas medidas, en particular a las Lic. Patricia Eisenberg y María Cristina Innocenti**

**Al Dr. Francisco Povo y la Dra. Elida Hermida del Laboratorio de Propiedades Mecánicas de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CONEA) por la deferencia de enseñarme las técnicas para la medición de las propiedades mecánicas del PHB**

**A mis compañeros de laboratorio Diego, Luis, Juan Carlos, Elena y Mónica por los momentos vividos**

**y al final, pero no por eso menos, a mi cuñado el Lic. Alejandro Kasis por la ayuda en la resolución de los problemas surgidos de computación en la escritura de mi Tesis.**

**Parte de este trabajo fue publicado (Lic. J. Quagliano y Dra. S. Miyazaki) en:**

-Abstracts of the 6<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, Florencia, Italia, Junio 13-17, 1993.

-“Aislamiento y caracterización de *Azotobacter* sp. para la producción de polihidroxialcanoato” 1994. Rev. Argentina de Microbiología, Vol. 24,1: 21-27.

-“Obtención de plásticos biodegradables polihidroxialcanoatos a partir de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*” 1996. Rev. Facultad de Agronomía, 16(3): 199-206.

-“Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly-3-hydroxybutyrate from *Azotobacter chroococcum* 6B” 1997. Applied Microbiology and Biotechnology, 47: 662-664.

-“Estudio del microencapsulamiento de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) con poli-3-hidroxibutirato (PHB)” 1997. publicado en “Fijación Biológica de Nitrógeno” p. 49-51 Editor: Dr. Carlos Bellone, Universidad Nacional de Tucumán.

-Abstracts of the International Symposium of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers, Münster, Alemania, Junio 3-6, 1998.

## **RESUMEN**

### **Producción microbiológica del poliéster biodegradable poli-3-hidroxi-butirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B. Autor: Lic. Javier C. Quagliano.**

**Director: Dra. Silvia S. Miyazaki.**

El poli-3-hidroxi-butirato (PHB) es un poliéster de origen bacteriano obtenido bajo condiciones de estrés nutricional en el medio de cultivo. Se acumula en el citoplasma dentro de gránulos y representa para el microorganismo una reserva de carbono y poder reductor. El PHB es un polímero biodegradable, biocompatible, de regular cristalinidad y moderada resistencia mecánica, utilizable en varias aplicaciones una vez procesado, como por ejemplo en la fabricación de envases plásticos completamente biodegradables. Al obtenerse además a partir de fuentes de carbono naturales renovables, representa un material promisorio para reemplazar a los plásticos sintéticos en algunas áreas. En este Trabajo se optimizó en primer lugar un medio de cultivo para la obtención de PHB a partir de una cepa de *Azotobacter chroococcum* aislada de una muestra de suelo, para luego estudiar el efecto de distintas condiciones y sistemas de cultivo sobre el contenido de biomasa celular y PHB. Se estableció el efecto de la tasa de aireación y de la relación carbono/nitrógeno bajo cultivo en fermentador sobre el contenido de biomasa, PHB, rendimientos de biomasa y PHB a partir de la glucosa consumida, velocidad específica de crecimiento y de formación de PHB. Un modelo para la obtención del rendimiento real de PHB que utiliza los datos experimentales del contenido de PHB, rendimiento de biomasa y el valor del rendimiento teórico fue aplicado a los resultados obtenidos. Por último, para contribuir al conocimiento de un área poco investigada en *Azotobacter* sp., se estudió el efecto de las condiciones fermentativas sobre las propiedades fisicoquímicas del PHB obtenido (cristalinidad, resistencia mecánica, estabilidad térmica y especialmente sobre el peso molecular relativo, factor que afecta en mayor medida al PHB en cuanto a su utilización). Tres potenciales aplicaciones del PHB fueron desarrolladas: i) como película de soporte para el cultivo de epidermis, ii) como película para el peleteado de semillas de alfalfa utilizadas como inoculante y iii) como matriz para el microencapsulamiento de enzima celulasa para su uso como aditivo en ensilado de pasturas.

**Palabras clave:** poli-3-hidroxi-butirato, *Azotobacter chroococcum*, aireación, relación carbono/nitrógeno, propiedades fisicoquímicas, aplicaciones.

## **SUMMARY**

**Microbial production of the biodegradable polyester poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from *Azotobacter chroococcum* 6B. Author: Lic. Javier C. Quagliano.**

**Director: Dra. Siliva S. Miyazaki.**

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is a bacterial polyester obtained under nutritional stress in the culture media. It accumulates as granules inside the cytoplasm and represents a carbon and reducing power source. PHB is a biodegradable and biocompatible polymer, with regular crystallinity and mechanical strength, utilizable in several applications once processed, such as for the production of completely biodegradable containers. Additionally, as it is obtained from natural and renewable carbon sources, it looks as a possible material for replacing synthetic plastics in some areas. At first, on this work, a culture media for PHB production was optimized, using a strain of *Azotobacter chroococcum* isolated from a soil sample, then the effect of different conditions and culture systems was studied on biomass and PHB content. The effect of aeration rate and carbon/nitrogen ratio under fermentor cultivation was established over biomass and PHB contents, biomass and PHB yields from consumed glucose, specific growth rate and PHB formation. A model for obtaining overall PHB yields from the experimental data of PHB contents, biomass yield and theoretical yield value was applied to the obtained results. For contributing to the knowledge of a scarcely investigated area on *Azotobacter* sp., the effect of fermentation conditions was studied on PHB physicochemical properties (crystallinity, mechanical strength, thermal stability and specially on the relative molecular weight, which affects PHB mostly for its utilization). Three potential applications were developed: i) as a film for supporting epidermal growth for burn cases, ii) as film for alfalfa seed pelleting used as inoculants and iii) as a matrix for the microencapsulation of the enzyme cellulase for its utilization as additive on grass silage.

**Keywords:** poly-3-hydroxybutyrate, *Azotobacter chroococcum*, aeration, carbon/nitrogen ratio, physicochemical properties, applications.

## Abreviaturas:

X: contenido de biomasa (g/l)

$X_{\text{PHB}}$ : contenido de PHB (% peso seco)=(% p.s.)

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )

$q_{\text{PHB}}$ : velocidad específica de formación de PHB (g PHB/g biomasa residual.h)=( $\text{h}^{-1}$ )

$k_d$ : velocidad específica de reducción de PHB ( $\text{h}^{-1}$ )

$Y_{\text{X/glu}}$ : rendimiento de biomasa a partir de la glucosa consumida (g biomasa/ g glucosa)

$Y_{\text{PHB/glu}}$ : rendimiento de PHB a partir de la glucosa consumida (g PHB/ g glucosa)

$Y_{\text{PHB/glu}}^{\text{ov}}$ : rendimiento real de PHB a partir de la glucosa consumida (g PHB/ g glucosa)

$Y_{\text{PHB/glu}}^{\text{teo}}$ : rendimiento teórico de PHB a partir de la glucosa consumida (g PHB/ g glucosa)

$T_g$ : temperatura de transición vítrea ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_m$ : temperatura de fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_d$ : temperatura de descomposición ( $^{\circ}\text{C}$ )

$\Delta H_m$ : calor de fusión ( $\text{J}/^{\circ}\text{C}$ )

$M_r$ : peso molecular relativo (Da)

$\tau$ : esfuerzo (Pa)

$\gamma$ : deformación (strain) (%)

$\gamma^{\circ}$ : flujo (shear rate) ( $1/\text{s}$ )

$G'$ : módulo de almacenamiento (Pa)

$G''$ : módulo de pérdida (Pa)

$\tan \delta$ : factor de pérdida

$\omega$ : frecuencia angular ( $1/\text{s}$ )

$\sigma$ : módulo de Young (MPa)

$\epsilon$ : estiramiento (%)

$\eta_{\text{rel}}$ : viscosidad relativa

$\eta_{\text{sp}}$ : viscosidad específica

$[\eta]$ : viscosidad intrínseca (dl/g)

DSC: calorimetría diferencial de barrido

TGA: análisis termogravimétrico

TMA: análisis termomecánico

## **Indice**

<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1. Generalidades	1
2. Diversidad de los PHA	2
3. Detección, aislamiento y análisis de los PHA	2
4. Microorganismos productores de PHA	3
5. Biosíntesis de PHAs en <i>Azotobacteriaceae</i>	5
6. Aspectos bioquímicos y rol metabólico de los PHAs	7
7. Clonado de los genes para la biosíntesis de PHB	12
8. El rol del PHB en las bacterias fijadoras de nitrógeno	13
9. Ventajas de los PHAs como bioplástico y obtención industrial	15
10. Métodos para mejorar las propiedades del PHB	18
11. Condiciones metabólicas y biotecnológicas utilizadas para la obtención de PHA	19
12. Propiedades fisico-químicas de los PHAs	20
12.1. Biodegradabilidad	21
12.2. Peso molecular	23
12.3. Cristalinidad, propiedades térmicas, viscoelásticas y de resistencia mecánica	28
13. Aplicaciones de los PHAs	30
13.1. En medicina	30
13.2. En agricultura	31
13.3. Aplicaciones industriales varias	31
<b>I I. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS</b>	<b>32</b>
<b>I I I. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>34</b>
1. Microorganismos	34
2. Medios y procedimiento para el cultivo de <i>Azotobacter</i> sp.	34
3. Procedimiento de extracción de PHB	36
4. Procedimiento de purificación de PHB	36
5. Determinaciones cuali/cuantitativas	37
5.1. Tinciones	37
5.2. Determinación de PHB (espectrofotométrico)	37
5.2.1. Validez del ensayo espectrofotométrico	38
5.3. Determinación de PHB (por cromatografía gaseosa)	38
5.3.1. Identificación de los picos presentes en los cromatogramas de gases por medio de espectrometría de masa	39
5.4. Determinación de glucosa (enzimático, oxidasa-peroxidasa)	39
5.5. Determinación de sacarosa	40
5.6. Determinación de biomasa	40
5.7. Determinación de fosfato	41
5.8. Determinación de amonio (método del nitroprusiato)	41

5.9. Determinación de sodio y potasio	42
5.10. Determinación de exopolisacáridos (EPS)	42
5.11. Determinación del peso molecular relativo ( $M_r$ ) del PHB	43
<b>6. Determinaciones de estructura y constantes físicas de PHB</b>	<b>44</b>
6.1. Determinación de grupos funcionales presentes en el producto obtenido por medio de un espectro de absorción infrarroja (FT-IR)	44
6.2. Análisis de la estructura del producto por medio de espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ( $^1\text{H-RMN}$ ) y carbono 13 ( $^{13}\text{C-RMN}$ )	44
6.3. Determinaciones por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	44
6.4. Determinaciones por termogravimetría (TGA)	45
6.5. Determinación de la tensión de ruptura y módulo de Young	45
6.6. Determinación de cristalinidad	46
6.7. Análisis termomecánico	47
<b>7. Determinaciones enzimáticas</b>	<b>47</b>
7.1. Preparación del extracto crudo	47
7.2. Medición de la actividad de la acetoacetil-CoA reductasa (biosíntesis)	47
7.3. Actividad 3-hidroxiacetilCoA deshidrogenasa (3-HBDH) (degradación)	48
7.4. Medición de proteínas en extracto crudo	48
<b>8. Técnicas especiales para aplicaciones del PHB</b>	<b>48</b>
8.1. Peleteado de semillas de alfalfa con PHB ocluyendo <i>Rhizobium meliloti</i> B36	48
8.1.1. Procedimiento de peleteado	48
8.1.2. Procedimiento para la observación de semillas y bacterias por microscopía electrónica	49
8.2. Ensayo de actividad de enzimas celulolíticas libres y microencapsuladas en películas de PHB	49
8.2.1. Medición de la actividad de la enzima celulasa	49
8.2.2. Microencapsulado de celulasa en PHB	49
8.2.3. Determinación del porcentaje de proteína retenida	49
8.2.4. Actividad de la celulasa microencapsulada	50
8.3. Verificación del crecimiento de células animales (keratinocitos) sobre un soporte de PHB	50
<b>I V. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
1. Aislamiento de cepas de <i>Azotobacter</i> sp.	52
1.1. Métodos de enriquecimiento para <i>Azotobacter</i> sp. Screening por tinciones de los aislamientos	52
1.2. Caracterización morfofisiológica del aislamiento seleccionado	54
2. Producción de PHB a partir de <i>Azotobacter chroococcum</i> . Estudios en erlenmeyers en agitador rotatorio	58

2.1.1. Obtención de PHB utilizando tres cepas de <i>A. chroococcum</i>	58
2.1.2. Estudio genético de las tres cepas aisladas originalmente de <i>Azotobacter chroococcum</i> .	59
2.1.3. Cultivo en distintos medios	60
2.2. Optimización de la concentración de los componentes del medio basal de Burk	61
2.2.1. Fosfato	61
2.2.2. Calcio	63
2.2.3. Magnesio	63
2.2.4. Hierro	64
2.2.5. Sodio y potasio	65
2.2.6. Fuentes de carbono	66
2.2.6.1. Efecto de la concentración de glucosa	67
2.2.7. Fuentes del nitrógeno	68
2.2.8. Aireación y agitación	69
2.2.8.1. Efecto de la relación Vrecipiente: Vol medio ( $V_r:V_m$ )	70
2.2.8.2. Variación en la velocidad de agitación (rpm) en agitador rotatorio	70
2.2.9. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y producción de PHB	71
2.2.10. Efecto del pH sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y contenido de PHB	72
2.2.11. Regulación del pH. Efecto de la adición de carbonato de calcio	72
2.2.12. Efecto de la edad del inóculo	73
2.2.13. Modificaciones efectuadas en el medio basal de Burk: formulación del medio productivo de Burk	74
3. Diseño del proceso. Sistemas de cultivo utilizando fuentes de carbono simples	75
3.1.1. Cultivo en dos etapas: medio completo (primera etapa)	76
3.1.2. Segunda etapa: crecimiento en medios de cultivo deficientes	76
3.2. Sistemas de cultivo en una etapa. Cultivo en batch	78
3.3. Cultivo en batch alimentado	79
3.3.1. Alimentación con glucosa (en fase logarítmica)	79
3.3.1.2. Cultivo en fermentador alimentado con glucosa en fase estacionaria	80
3.3.2. Alimentación con sulfato de amonio	81
3.4. Cultivo semicontínuo	83
3.5. Efecto del agregado de compuestos definidos sobre el contenido de PHB en cultivos batch en medio Bm	85
3.5.1. Efecto de la adición de ácidos orgánicos: ácido isovalérico y ácido hexanoico agregados en fase logarítmica y en fase estacionaria	85
3.5.2. Efecto del agregado de alcoholes. 2-propanol, 1- butanol y 1-octanol	88
3.5.3. Efecto del agregado de compuestos polihidroxilados. Polietilenglicol (PEG) y Tween 80	88
3.5.4. Efecto del agregado de metabolitos del ciclo de Krebs	90

Polietilenglicol (PEG) y Tween 80	88
<b>3.5.4. Efecto del agregado de metabolitos del ciclo de Krebs</b>	90
<b>3.5.5. Coproducción de PHB y exopolisacáridos (EPS).</b>	
Fracción de PHB del total de biopolímeros	90
<b>3.5.5.1. Curvas de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento (<math>\mu</math>) con diferentes fuentes de carbono en medio Bm</b>	91
<b>3.5.5.2. Coproducción de PHB y EPS</b>	92
<b>3.5.5.3. Fracción de PHB del total de biopolímeros producidos</b>	94
<b>3.5.6. Efecto del antibiótico cloramfenicol en erlenmeyers agitados</b>	96
<b>3.6. Efecto del agregado de compuestos complejos sobre la producción de PHB en el medio Bm con glucosa 1%</b>	98
<b>3.6.1. Efecto del agregado de peptona y extracto de levadura</b>	98
<b>3.6.2. Efecto del agregado de un extracto de suelo</b>	99
<b>3.7. Cultivos por sistema batch o batch alimentado en fermentadores</b>	100
<b>3.7.1. Efecto de la aireación en medio Bm con manitol como fuente de carbono</b>	100
<b>3.7.1.1. Cultivo en medio manitol 1% en dos etapas de aireación</b>	100
<b>3.7.1.2. Cultivo en medio manitol 1% con alta aireación y fed-batch de glucosa</b>	101
<b>3.7.2. Efecto de la aireación en medio Bm con glucosa al 1% como fuente de carbono</b>	102
<b>3.7.2.1. Agitación óptima (medida en rpm)</b>	102
<b>3.7.2.2. Cultivo en medio Bm con glucosa y baja aireación</b>	103
<b>3.7.2.3. Cultivo en medio Bm con glucosa, baja aireación y fed-batch de glucosa</b>	105
<b>3.7.2.4. Cultivo en medio Bm con glucosa y alta aireación</b>	105
<b>3.7.2.5. Anaerobiosis creada por burbujeo de nitrógeno en fase estacionaria</b>	106
<b>3.7.2.6. Relación entre la tasa de aireación (vvm) la tensión de oxígeno disuelto (% saturación) bajo cultivo en fermentador. Determinación del coeficiente de transferencia de masa (<math>K_L a</math>) de oxígeno a distintas tasas de aireación</b>	108
<b>3.7.2.7. Velocidades específicas de crecimiento (<math>\mu</math>) a diferentes tasas de aireación</b>	110
<b>3.7.2.8. Rendimiento de PHB a partir de la glucosa consumida (<math>Y_{PHB/glu}</math>) durante el cultivo a diferentes tasas de aireación</b>	112
<b>3.7.2.9. Rendimiento de biomasa a partir de la glucosa consumida (<math>Y_{x/glu}</math>) en función del tiempo a diferentes tasas de aireación</b>	113
<b>3.7.2.10. Velocidad específica de formación de PHB (<math>q_{PHB}</math>) en función del tiempo a distintas tasas de aireación</b>	113
<b>3.8. Efecto del nitrógeno combinado (como relación molar carbono/nitrógeno)</b>	115
<b>3.8.1. Velocidad específica de crecimiento (<math>\mu</math>) bajo distintas relaciones carbono/nitrógeno (C/N)</b>	116
<b>3.8.2. Velocidad específica de formación de PHB (<math>q_{PHB}</math>) en función del tiempo de cultivo a distintas relaciones C/N</b>	116
<b>3.8.3. Rendimiento para la conversión de glucosa en PHB (<math>Y_{PHB/glu}</math>)</b>	

tiempo de cultivo a distintas relaciones C/N	116
<b>3.8.3. Rendimiento para la conversión de glucosa en PHB (<math>Y_{\text{PHB}/\text{glu}}</math>) en función del tiempo de cultivo a diferentes relaciones C/N</b>	117
<b>3.8.4. Rendimiento de biomasa a partir de la glucosa consumida (<math>Y_{x/\text{glu}}</math>) en función del tiempo de cultivo a diferentes relaciones C/N</b>	119
<b>3.8.5. Velocidad de reducción específica de PHB (<math>k_d</math>) bajo diferentes relaciones C/N</b>	119
<b>3.8.6. Productividad volumétrica de PHB a diferentes relaciones C/N</b>	120
<b>3.8.7. Cálculo de la energía de mantenimiento (m) en medio Bm con diferentes relaciones C/N</b>	121
<b>3.9. Modelo de productividad y cinética del PHB en cultivos batch y fed-batch en medio Bm</b>	124
<b>3.9.1. Rendimiento real de PHB (<math>Y_{\text{p/c}}^{\text{ov}}</math>) como función del rendimiento teórico (<math>Y_{\text{p/c}}^{\text{teo}}</math>), del rendimiento de biomasa (<math>Y_{x/c}</math>) y contenido de PHB a diferentes relaciones C/N</b>	127
<b>4. Cultivo en medio Bm utilizando fuentes de carbono complejas</b>	129
<b>4.1. Sacarosa sin refinar (origen Tucumán)</b>	130
<b>4.2. Jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF)</b>	132
<b>4.3. Melaza de caña de azúcar</b>	132
<b>4.4.4. Melaza de caña de azúcar tratada por precipitación</b>	135
<b>4.4.5. Melaza de caña de azúcar tratada con resina de intercambio iónico</b>	136
<b>4.4.6. Cultivo con distintas concentraciones de melaza de caña de azúcar cruda en fermentador</b>	137
<b>4.4.4. Fed-batch semi-continuo de melaza de caña de azúcar cruda sobre medio Bm con glucosa 1%</b>	138
<b>Velocidad de alimentación de melaza por fed-batch sobre medio Bm con glucosa</b>	140
<b>4.5. Productividad y cinética del PHB en cultivo batch en fermentador con melaza de caña de azúcar</b>	136
<b>4.5.1. Velocidades específicas de formación de PHB (<math>q_{\text{PHB}}</math>)</b>	142
<b>4.5.2. Velocidad de reducción específica de PHB (<math>k_d</math>)</b>	143
<b>4.5.3. Productividad volumétrica en fermentador</b>	144
<b>4.6. Actividad enzimática de biosíntesis de PHB</b>	144
<b>4.6.1. Medición de la actividad acetoacetyl-CoA reductasa en medio Bm con glucosa al 1% y con diferentes concentraciones de melaza como fuente de carbono</b>	145
<b>4.6.2. Medición de actividad 3-hidroxi-butilato deshidrogenasa (3-HBDH) en medio Bm con glucosa al 1%</b>	145
<b>5. Caracterización de la estructura del polímero obtenido</b>	146

<b>5. Caracterización de la estructura del polímero obtenido</b>	<b>146</b>
<b>5.1. Grupos funcionales presentes. Espectro de absorción infrarroja</b>	<b>147</b>
<b>5.2. Espectros de resonancia magnética protónica (<sup>1</sup>H-RMN) y de carbono 13 (<sup>13</sup>C-RMN)</b>	<b>148</b>
<b>5.3. Cristalinidad. Espectrograma de difracción de rayos X</b>	<b>150</b>
<b>6. Propiedades físico- químicas del PHB obtenido</b>	<b>151</b>
<b>6.1. Solubilidad en diferentes solventes</b>	<b>152</b>
<b>6.2. Biodegradabilidad</b>	<b>153</b>
<b>6.3. Transparencia (T) y radiación dispersada (Haze) de películas de PHB</b>	<b>155</b>
<b>6.4. 1. Resistencia mecánica del PHB: Tensión de ruptura (módulo de Young)</b>	<b>157</b>
<b>6.4.2. Modificación de la resistencia mecánica: plastificación con polioxietilensorbitanos (Tween 80) e hidroxiapatita</b>	<b>158</b>
<b>6.5. Propiedades viscoelásticas del PHB</b>	<b>160</b>
<b>7. Efecto de diferentes condiciones fermentativas sobre las propiedades físicas del PHB obtenido</b>	<b>165</b>
<b>7.1. Peso molecular</b>	<b>165</b>
<b>7.1.1. Efecto de la concentración de glucosa</b>	<b>166</b>
<b>7.1.2. Efecto de la concentración de melaza</b>	<b>167</b>
<b>7.1.3. M<sub>r</sub> a distintos tiempos de cultivo y concentraciones de glucosa</b>	<b>168</b>
<b>7.1.4. M<sub>r</sub> a distintos tiempo de cultivo con melaza de caña de azúcar al 5%</b>	<b>170</b>
<b>7.1.5. Efecto de la temperatura de cultivo</b>	<b>171</b>
<b>5.1.6. Efecto del pH</b>	<b>171</b>
<b>7.1.7. Peso molecular de muestras de PHB obtenidas de cultivos en erlenmeyers agitados y en fermentador</b>	<b>173</b>
<b>7.1.8. Efecto de la tasa de aireación</b>	<b>174</b>
<b>7.1.8.1. Efecto de la anaerobiosis sobre M<sub>r</sub> del PHB obtenido con melaza</b>	<b>176</b>
<b>7.1.9. Efecto de la relación C/N</b>	<b>176</b>
<b>7.1.10. Índice de polidispersión (D) de las muestras de PHB obtenidas. Distribución de pesos moleculares</b>	<b>177</b>
<b>7.1.11. Efecto de las técnicas de extracción sobre el M<sub>r</sub> del PHB: Extracción completa, con tensioactivo y directa en continuo</b>	<b>180</b>
<b>7.2. Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)</b>	<b>182</b>
<b>7.3. Grado de termoplasticidad: Temperaturas de transición vítrea (T<sub>g</sub>)</b>	<b>184</b>
<b>7.4. Efecto sobre la estabilidad térmica: Temperatura de descomposición. Relación con el peso molecular</b>	<b>185</b>
<b>7.5. Estudio de las propiedades de ablandamiento del PHB: análisis termomecánico (TMA)</b>	<b>189</b>
<b>8. Estudios sobre aplicaciones</b>	<b>190</b>

<b>8. Estudios sobre aplicaciones</b>	190
<b>8.1. Aplicación en salud humana</b>	190
<b>8.1. PHB como soporte para el crecimiento de células animales</b>	190
<b>8.2. Aplicaciones agrícolas</b>	191
<b>8.2.1. PHB como película para el peleteado de semillas y bacterias</b>	192
<b>8.2.1.1. Siembra de semillas de alfalfa en tubos con medio mineral de Crone</b>	193
<b>8.2.1.2. Siembras de semillas de alfalfa sin tratar y peleteadas con PHB</b>	193
<b>8.2.1.3. Peso total, aéreo y de raíz de plantas de alfalfa provenientes de semillas control y peleteadas con PHB</b>	194
<b>8.2.1.4. Siembras de semillas de alfalfa sin tratar e inoculadas con <i>Rhizobium meliloti</i> y peleteadas con PHB</b>	196
<b>8.2.2. PHB como película para la oclusión de enzimas</b>	198
<b>8.2.2.1. Actividad de la enzima celulasa y proteína retenida a diferentes cargas de enzima en PHB</b>	199
<b>8.2.2.2. Decaimiento en el tiempo de la actividad de la celulasa microencapsulada</b>	200
<b>V. CONCLUSIONES</b>	203
<b>APENDICE</b>	206
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	208

# I. INTRODUCCION

---

## 1. Generalidades

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una clase de poliésteres microbianos que se biosintetizan en los microorganismos bajo condiciones de stress o desbalance nutricional, como ser depleción de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo, oxígeno o microelementos en el medio de cultivo (Dawes y Senior 1973; Anderson y Dawes 1990; Steinbüchel 1991a). Se acumulan bajo la forma de gránulos intracitoplasmáticos refráctiles al microscopio, de entre 0.2 y 3  $\mu\text{m}$  (Wang y Lundgren 1969; Dunlop y Robards 1973; Kofronova et al. 1984; Page et al. 1995) y representan para los microorganismos una fuente de carbono y de energía (Anderson et al. 1990; Doi 1990, Poirier et al. 1992, Lee 1996). En el caso de falta de nitrógeno, el metabolismo se deriva a la acumulación de reservas de alto poder reductor como los PHAs, en lugar de a la formación de constituyentes celulares tales como aminoácidos y proteínas (Carter y Dawes 1979).

Los PHAs representan una de las cinco clases de biopolímeros en la Naturaleza, junto con los polisacáridos, polipéptidos, polinucleótidos y polisoprenoides (Doi y Iwata, 1998). De todos ellos, el más frecuentemente encontrado es el ácido poli- $\beta$ -hidroxi-butírico (PHB). El PHB es una excelente fuente de carbono potencial, es altamente reducido y ejerce una presión osmótica despreciable. Sirve como sumidero de electrones (poder reductor) y también de carbono, a bajas concentraciones de oxígeno disuelto. No se sabe claramente todavía si el PHB tiene una función común en todos los microorganismos donde se lo encuentra, ya que puede cumplir diferentes roles dependiendo del organismo y de las condiciones externas.

En las últimas dos décadas, los PHAs han sido profundamente estudiados dadas sus propiedades de termoplaticidad, de biodegradabilidad (Brandl et al. 1995, Mergaert et al. 1995, Swift 1992; Krupp y Jewell 1992) y por ser biocompatibles (Anderson y Dawes 1990, Hangii 1995). El PHB es esencialmente no tóxico, teniendo una dosis letal DL 50

de 5.000 mg/kg. Por ser estereoregulares, ópticamente activos y quirales (debido a la incorporación de monómeros R(-)-3-hidroxicanoato) son considerados productos potenciales para la obtención de unidades quirales (sintones) con aplicaciones en síntesis orgánica (Steinbüchel, 1991b). Los PHAs tienen un rango amplio de propiedades adecuables a cada utilización, ya que puede regularse en su biosíntesis la incorporación de monómeros en cantidades definidas, y así poder modificar sus propiedades físicas, químicas y/o mecánicas.

## **2. Diversidad de los PHA**

A pesar de que el primer PHA descrito, el PHB, fue descubierto en 1926 en el Instituto Pasteur en la bacteria *Bacillus megaterium*, los usos y aplicaciones son recientes, dado que la investigación en biopoliésteres comenzó alrededor de los años 70, cuando la crisis del petróleo obligó a la búsqueda de nuevos materiales y fuentes de energía (Hrabak 1992). Hasta 1974 se consideraba al monómero 3-hidroxi butirato (3-HB) como el único monómero posible dentro de los PHAs, cuando se descubrieron en muestras de barro activados PHAs con 3-hidroxi valerato (Wallen y Rohwedder 1974). En 1983 se descubrieron los polihidroxi octanoatos (PHO) a partir de *Pseudomonas oleovorans*. Estos poseen alta flexibilidad, debido a la mayor longitud de la cadena lateral R, (Smet et al., 1983). Hoy ha aumentado a cerca de 120 los tipos diferentes de PHAs reportados (Lee 1996), los cuales difieren en los grupos funcionales de los monómeros (monómeros insaturados, 3, 4 y 5-hidroxiácidos, 3-hidroxiácidos funcionalizados con grupos carboxilo, bencilo, fenoxi, ciano, ciclohexil, epoxi o halógenos y de diferente longitud de la cadena lateral R, de hasta de 9 carbonos (Fritzsche et al. 1990a, Kim et al. 1995).

## **3. Detección, aislamiento y análisis de los PHA**

Los PHAs pueden detectarse en las bacterias por tinciones específicas utilizando colorantes de naturaleza lipofílica, como el Sudan Black (Gerhardt 1994) y el Azul de Nilo (Ostle y Holt 1982). Con este último, los gránulos de PHA pueden verse en un microscopio de fluorescencia. Para el aislamiento a partir de la biomasa bacteriana, en general, pueden extraerse con solventes en un aparato de Soxhlet a partir de la biomasa

liofilizada, para luego determinarlos gravimétricamente (Williamson y Wilkinson, 1958) y calculados como porcentaje del peso seco celular. Se han utilizado varias mezclas para la extracción de PHAs, como por ejemplo hipoclorito de sodio y tensioactivos (Griebel y Merrick 1971; Berger et al., 1989; Ramsay et al, 1990), etilencarbonato, propilencarbonato y también solventes clorados como cloroformo, cloruro de metileno y 1,2-dicloroetano (Sasikala y Ramana 1996). En función del método de extracción, la realizada con solventes rinde polímeros de peso molecular mayor que los extraídos utilizando hipoclorito de sodio, y por lo tanto de mejores propiedades físicas (Ramsay et al, 1990).

La determinación cuantitativa del polímero purificado se realiza la determinación espectrofotométrica del ácido crotónico formado por deshidratación del PHB con ácido sulfúrico concentrado (Slepecky y Law, 1961). Por cromatografía gaseosa el polímero se determina cuantitativamente después de la metanólisis en presencia de ácido sulfúrico 5 a 15% en metanol de células liofilizadas (Braunnegg 1978, Riis y Mai, 1988). Métodos para la separación, detección y purificación de PHAs a partir de los microorganismos han sido publicados y patentados (Nickerson y Kenneth 1982; Srienc et al. 1984; Holmes 1985; Hrabak 1992; Sasikala y Ramana 1996).

#### **4. Microorganismos productores de PHA**

Se han hallado PHAs tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, como por ejemplo: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum* y *Rhizobium*, donde se los ha caracterizado por varias técnicas (Jensen y Sicko 1971; Dunlop y Robards 1973; Emeruwa y Hawirko 1973; Findlay y White 1983; Tal et al. 1985; Amos Dale 1989; Haywood et al. 1989a; García Lillo et al. 1990; Vierkant et al. 1990; Takeda et al. 1995; Brandl et al. 1991; Siddegui et al. 1992). Fueron aislados de microorganismos presentes en diferentes detritos, sedimentos marinos y barros activados (Wallen y Rohwedder, 1974; Rees et al. 1992) pero los mayores niveles de polímero han sido aislados de sedimentos terrosos. De todos ellos, el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es la principal reserva lipófila o lipídica que poseen las bacterias.

*Alcaligenes*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* y *Azotobacter* son los géneros productores de PHA más estudiados (Anderson y Dawes, 1990).

*Alcaligenes* produce copolímeros de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV), en función de las condiciones de cultivo y aditivos (Kunioka et al. 1989; Peoples y Sinskey 1989 a,b; Nakamura et al. 1992; Byrom 1992). *Alcaligenes eutrophus* (renombrado como *Ralstonia eutropha*) es el microorganismo elegido para la producción industrial del copolímero PHBV. Acumula cerca de 90% del peso seco bacteriano (Pedros-Alió et al. 1985). Este microorganismo puede acumular biopoliésteres compuestos por 3,4 y 5-hidroxiácidos, y también copoliésteres y terpoliésteres a partir de fuentes de carbono no relacionadas (Eggink et al., 1995; Steinbuchel y Piepier, 1992a). Utilizan además varias fuentes de carbono, algunas cepas pueden utilizar ácidos orgánicos con 2 hasta 22 carbonos, aceites vegetales y grasas de origen animal (Kunioka et al. 1988; Akiyama et al., 1992). *Alcaligenes* puede crecer también en condiciones quimioautótrofas, usando solamente dióxido de carbono y amoníaco. Se encontró que la biosíntesis de PHBV en *Alcaligenes* sp. SH-69 estaba favorecida por tensiones de oxígeno disuelto de 20% y una relación molar C/N (glucosa/amonio) de 23.1 (Rhee et al., 1993). Aragao y colaboradores (1994) señalaron que debía mantenerse una concentración residual mínima de amonio para poder llegar a altas productividades de PHB con *Alcaligenes* sp. SH-69. Con la cepa *Alcaligenes eutrophus* H16 se reveló que la velocidad máxima específica de producción de PHB en *Alcaligenes eutrophus* H16 se alcanzaba cuando la concentración de amonio disminuía a cero, decreciendo asintóticamente después del máximo; también la velocidad específica de producción de PHB se correlacionó linealmente con la velocidad de síntesis de biomasa residual, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (Sonnleitner et al., 1979). Otra especie promisoría para la producción industrial de PHAs es *Alcaligenes latus*, que puede acumular hasta 80% de PHB, y también los copolímeros PHBV y P(3HB-co-4-HB), en forma paralela a la síntesis de biomasa (Hrabak, 1992).

*Methylobacterium* ha sido cultivado en forma continua llegando a altos valores de biomasa, con un medio de cultivo económico, ya que utilizan compuestos de C-1 (metanol), siendo la principal desventaja que producen polímeros de bajo peso molecular. Suzuki y colaboradores (1986b) demostraron, en forma similar a lo observado

con *Alcaligenes eutrophus* SP-69 (Aragao, ver más arriba) que el agregado de una fuente de nitrógeno era necesaria aún en la fase de producción de PHB en la bacteria metilótrofa *Methylobacterium extorquens*, pero que una excesiva alimentación causaba una degradación del PHB acumulado y una reducción de la actividad específica de formación de PHB.

*Pseudomonas* produce varias clases de PHA, desde homopolímeros lineales a copolímeros ramificados (Haywood et al. 1990; Bertrand et al. 1990; Huisman et al. 1991; Eggink et al. 1995). Pueden acumular PHAs con diferentes grupos funcionales, como fenilo (Fritzsche et al. 1990a), olefinas, cloruro, bromuro y fluoruro (Kim et al., 1992a). Es interesante la observación realizada de que las pseudomonas fluorescentes no acumulan PHB, pero sí elastómeros de cadena larga como poli-3-hidroxi octanoato (PHO) (Huisman et al., 1989; Timm y Steinbüchel 1990). Una de las especies más estudiadas es *P. oleovorans*, que tiene la capacidad de sintetizar PHAs con monómeros de distinto número de carbono, desde 6 a 12, y de 8 mayoritariamente, a partir de ácido octanoico (Smet et al., 1983; Stuart et al., 1995; Preusting et al., 1993). *Pseudomonas cepacia* ha sido utilizada para obtener PHAs de xilosa, proveniente de residuos hemicelulósicos (Ramsay et al., 1989). *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 ha probado poder biosintetizar PHAs originales con grupos epoxidados a partir de aceites de euforbia y castor (Eggink et al., 1995).

También se han investigado respecto de la biosíntesis de PHAs bacterias anoxigénicas fototróficas, de las cuales la más estudiada es *Rhodospirillum rubrum*, principalmente debido a que acumula varios tipos de PHAs, pero con bajo rendimiento (Brandl et al., 1989). Halobacterias pueden producir PHAs hasta cierta proporción (Fernández-Castillo et al., 1986).

## **5. Biosíntesis de PHAs en Azotobacteriaceae**

La acumulación de PHB en *Azotobacter chroococcum* es conocida desde 1926 (Lemoigne 1926) y su acumulación y degradación fue estudiada (Lemoigne y Girard 1943). Aunque se han reportado acumulaciones de hasta 80% del peso seco (Schlegel y

Gottschalk 1962), los mayores contenidos de PHB se encuentran entre 50 y 70% (Lee et al. 1995, Santek y Maric 1992).

*Azotobacter* sp fue el primer microorganismo elegido por la empresa británica ICI para la síntesis de PHB. Luego fue desechado pues divertía parte de la fuente de carbono a la producción de exopolisacáridos (EPS) y era difícil de controlar (Byrom 1992).

*Azotobacter* sp. biosintetiza normalmente el homopolímero lineal PHB, de mayores ventajas en aplicaciones médicas como la liberación prolongada de fármacos (Korsatko et al. 1983) que son inmovilizados u ocluidos en la matriz polimérica y liberados en forma continua. Sin embargo, se ha reportado la obtención del copolímero poli-3-hidroxi-butirato(co-3-hidroxi-valerato) (P-3-HB-co-3-HV, o PHBV) a partir de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* UWD utilizando glucosa y melazas como fuente de carbono (Page et al. 1997). *Azotobacter* sp. produce polímeros lineales que pueden tener elevado peso molecular, de acuerdo a las condiciones de cultivo y extracción. El máximo peso molecular reportado para PHB fue con la cepa UWD, llegando a 4.000 kDa (Chen y Page, 1996). Un alto peso molecular es una propiedad altamente deseable con respecto a sus propiedades físicas y aplicaciones de un polímero. *Azotobacter* sp. tiene la peculiaridad de mostrar pleomorfismo cuando existe peptona o aminoácidos como glicina en el medio de cultivo (Vela y Rosenthal, 1972). El agregado de peptona de pescado a un medio mineral con glucosa indujo la generación de formas aberrantes utilizando *Azotobacter vinelandii* UWD (Page et al., 1995). Esto es de interés ya que los gránulos de PHBV deforman la pared bacteriana, y por lo tanto la debilitan, habiendo la posibilidad de que el poliéster pueda ser extraído más fácilmente (Page y Cornish, 1993). El agregado de 0.1-0.5% de peptona estimuló la producción de PHB en la cepa UWD (Page 1992).

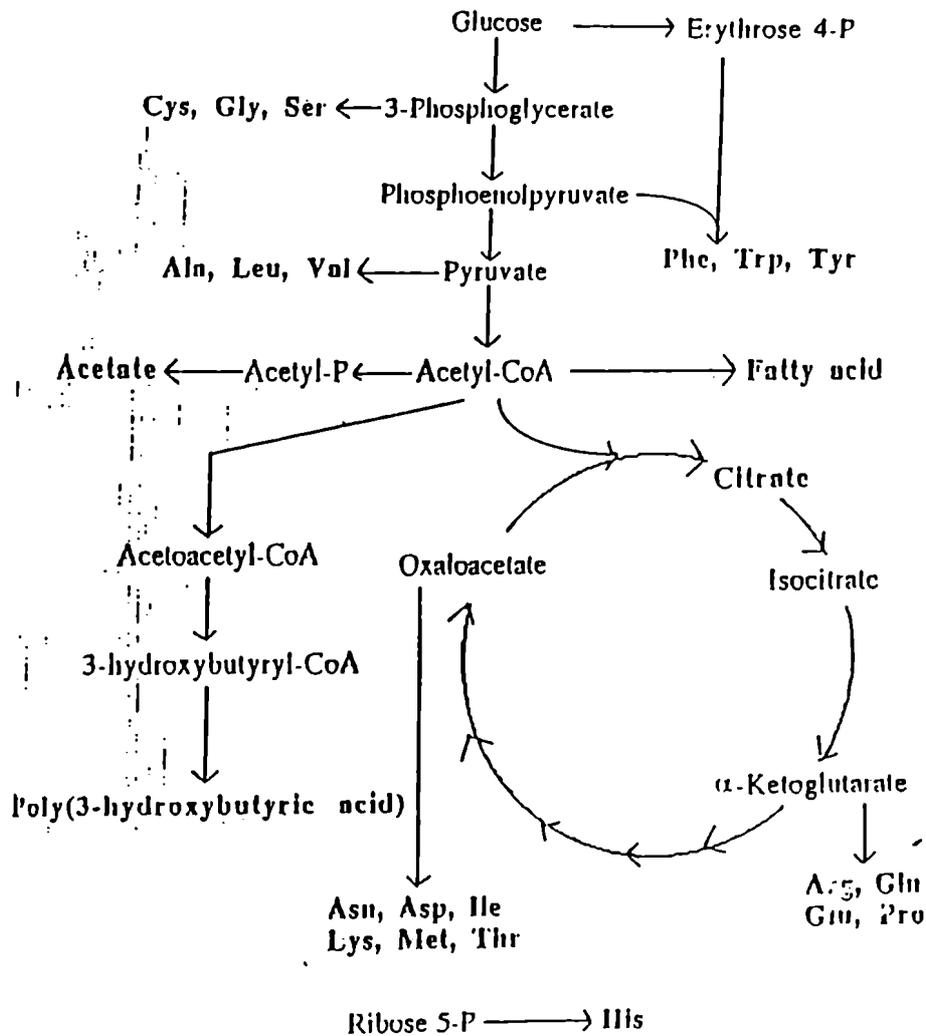
*Azotobacter* sp. tiene la capacidad de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono (Gerhardt, 1984; Quagliano y Miyazaki, 1994). La producción de PHB a partir de *Azotobacter chroococcum* ha sido investigada bajo cultivo en fuentes de carbono recalitrantes, como el residuo del prensado de aceite de oliva, llamado alpechín (González et al. 1994). Todas las especies de *Azotobacter* metabolizan compuestos aromáticos como fenol y ácido benzoico (Krieg y Holt 1984). La resistencia a

compuestos tóxicos como algunos fungicidas disminuyó la acumulación de PHB y en consecuencia su sobrevivencia y competencia en el suelo cuando es aplicado como biofertilizante (Miclaus et al. 1992). El efecto de la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en cultivo continuo fue descrito en una cepa de *Azotobacter chroococcum* (Santek y Maric 1995) encontrando que 30°C y 1 vvm eran adecuadas para la obtención de biomasa. El efecto del nitrógeno y del oxígeno en forma simultánea fue ensayado en una cepa de *A. chroococcum*, se observó que debía mantenerse el oxígeno debajo de una concentración límite para alcanzar altas productividades de PHB (Lee et al., 1995).

### **Aspectos bioquímicos y rol metabólico de los PHAs**

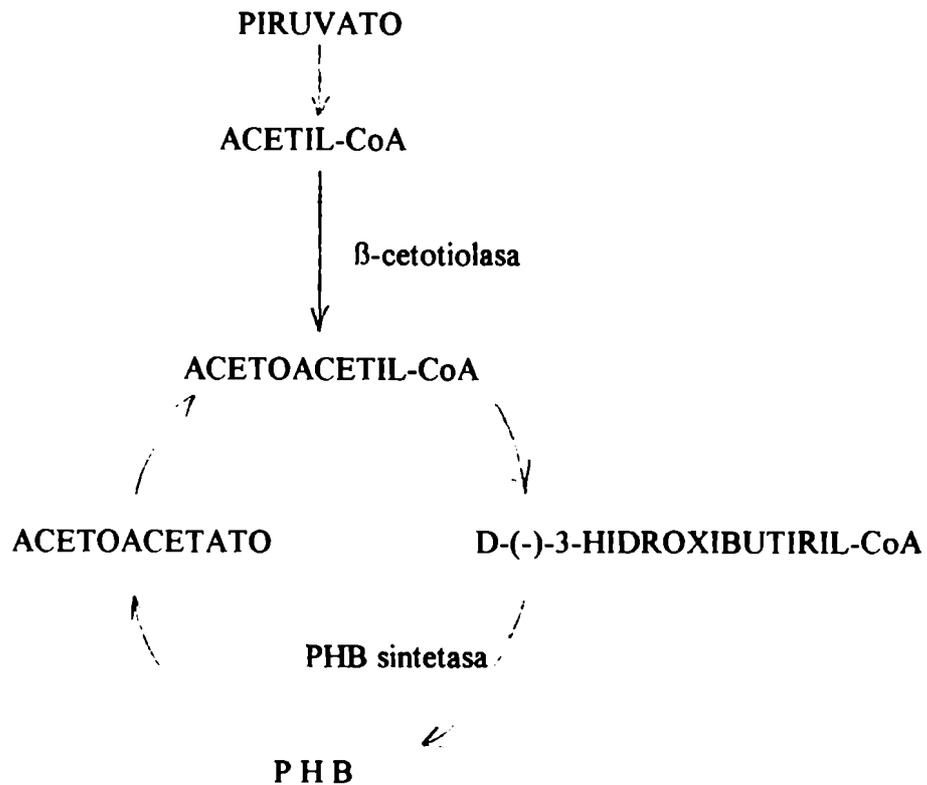
Con respecto a los aspectos bioquímicos actuantes, dos tipos de poliésteres, de cadena corta y de cadenas medias y largas, son generalmente biosintetizados con los sustratos carbonados usuales, como ser glucosa o sacarosa (Steinbüchel y Wiese 1992). Los de cadena corta incluyen el 3-hidroxipropionato, 3 y 4-hidroxibutirato (3HB-4HB) y 3 y 5-hidroxivalerato (3HV-5-HV) (Kunioka et al. 1988; Doi et al. 1987; Valentin et al. 1992). Los poliésteres de cadena larga poseen de 3 a 9 carbonos más que los de cadena corta en su unidad monomérica. Las bacterias *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodospirillum rubrum* y *Pseudomonas pseudoflava* son conocidas por acumular copoliésteres compuestos por cadenas cortas exclusivamente, mientras que *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* y otras pseudomonas fluorescentes biosintetizan copolímeros compuestos principalmente por cadenas medias y largas. PHAs de cadenas ramificadas con grupos aromáticos y halógenos han sido reportados, así como una gran variedad de copolímeros con unidades monoméricas inusuales (Steinbüchel, 1991a).

El camino de formación de PHA está favorecido en condiciones de deficiencia de nutrientes (oxígeno, nitrógeno, fosfato, también se ha reportado formación de PHA bajo limitación de hierro, magnesio, manganeso, potasio y sodio). En esa forma el acetyl-CoA es derivado al ciclo de los PHA en lugar de canalizarse hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Fukui et al. 1976). En el siguiente Esquema se indican las relaciones entre los principales caminos metabólicos de las bacterias y el de formación de PHB.



*.Relaciones entre los principales caminos metabólicos presentes en las bacterias y el camino metabólico de biosíntesis de PHB.*

El primer metabolito involucrado es el piruvato, que se transforma en acetil-CoA, el cual es requerido en grandes cantidades para la síntesis de PHB, así como equivalentes de reducción, ya sea como NADH o NADPH. El camino biosintético de formación del ácido poli-β-hidroxibutírico se detalla a continuación:



La  $\beta$ -cetotiolasa cataliza la conversión de acetil-CoA en acetoacetil-CoA. Se ha demostrado que es la enzima controlante de la biosíntesis de PHB en *Alcaligenes eutrophus* (Oeding y Schlegel 1973; Haywood et al. 1988a). Luego la acetoacetil-CoA reductasa reduce el acetoacetil-CoA a D-(-)-3-hidroxiacetil-CoA, el cual es sustrato de la PHB sintetasa, que es la enzima encargada de la polimerización. Su asociación con la membrana de los gránulos de PHB es conocida desde hace muchos años (Merick y Doudoroff 1960; Haywood et al. 1988b).

La biosíntesis de PHB es un ejemplo de una condensación biológica de Claisen catalizada por la  $\beta$ -cetotiolasa, donde el sitio activo cisteína ataca el acetil-CoA para dar el acetil-S-enzima intermediario, luego el anión de la segunda molécula de acetil-CoA completa la condensación para formar la unidad de cuatro carbonos acetoacetil-CoA (Masamune et al., 1989).

La regulación de la biosíntesis de PHB estaría dada por la acetoacetil-CoA reductasa en *Alcaligenes eutrophus* bajo limitación de carbono, dado que su concentración es similar en condiciones de producción y de ausencia de producción de PHB (Doudoroff y Stanier

1959); paralelamente, los niveles de acetil-CoA eran tres veces más altos cuando no había síntesis de PHB, confirmando el rol regulador del acetil-CoA sobre la  $\beta$ -cetotiolasa (Mansfield et al., 1995).

Los microorganismos que producen gran cantidad de polímero poseen actividad de PHB sintetasa unida al gránulo, mientras que en los organismos con bajo contenido de PHB se encuentra en forma soluble. Existen tres principales proteínas asociadas al gránulo de PHA: la PHA sintetasa, la PHA depolimerasa (Delafield 1965; Fukui et al. 1988; Satio et al. 1989, 1992; Odani et al. 1989; Muller y Jendrossek 1993) y una tercer clase de proteínas denominadas fasinas, que influirían sobre el tamaño de los gránulos intracelulares (Steinbuchel et al., 1995; Wieczorek et al. 1996). Una característica de la enzima PHA sintetasa es que también es específica para el D (-) enantiómero. La incorporación de 4-hidroxi-butirato en los PHAs de *Alcaligenes eutrophus* sugiere que la enzima es activa con 4-hidroxi-butiril-CoA, o alternativamente, que una sintetasa adicional este presente. En otras bacterias, como *Rhodospirillum rubrum* y *Pseudomonas sp.*, la PHA sintetasa o PHA polimerasa es inespecífica, permitiendo la incorporación de diferentes monómeros en los PHAs (Haywood et al. 1989b; Gross et al., 1989). En los microorganismos en los que fue investigada se halló que su peso molecular se encuentra entre 100 y 200 KDa.

Existen tres tipos diferentes de PHA sintetasas, para hidroxiácidos de 3 a 5 carbonos, sustratos de longitud media (6 a 14 carbonos) y las que utilizan sustratos de cadena corta, la organización de los genes para cada una de ellas ha sido descrita (Steinbuchel et al., 1992).

Luego el camino metabólico se completa con la depolimerización del PHB, efectuada por la PHB depolimerasa, que produce unidades de 3-hidroxi-butiril-CoA, el cual es oxidado a acetoacetato por la enzima D(-) $\beta$ -hidroxi-butiril-deshidrogenasa (Jurtshuk et al. 1968; Daniel et al. 1992b). Por último, el acetoacetato es convertido nuevamente a acetil-CoA.

En bacterias del genero *Azotobacter*, el control del sistema de polimerización-depolimerización se ejerce por inhibición competitiva del NADH, ya que la polimerasa es muy sensible a la relación NADH/NAD<sup>+</sup> (Carter y Dawes 1979, Senior y Dawes 1971, 1973, Senior et al. 1972) la cual depende de imponer o no una limitación de oxígeno al crecimiento. El polímero no se degrada en sistemas oxigenados hasta que la concentración de NAD<sup>+</sup> haya aumentado y la concentración de piruvato haya decrecido, la última condición lograda limitando el aporte externo de glucosa.

Por lo tanto, en condiciones donde la concentración de NAD(P)H es alta (por ejemplo: en cultivos limitados en oxígeno) la síntesis de polímero procede. Con respecto a la fuente de carbono, la acumulación de polímero se produce cuando el carbono se halla en exceso con respecto a los requerimientos para el crecimiento y mantenimiento del cultivo, y sólo se degrada cuando disminuye el suministro de carbono exógeno. La degradación está acompañada por la formación de NADH, que puede ser reoxidado con la concomitante producción de energía, de allí el rol del polímero como sustancia de reserva.

En general, el camino biosintético de formación de PHB está conectada con el ciclo de  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, en el cual los sustratos son oxidados resultando en monómeros conteniendo dos o más átomos de carbono menos que el sustrato original (Brandl et al., 1988; Lageveen et al., 1988; Eggink et al., 1995). También con la biosíntesis de novo de ácidos grasos, donde los sustratos son reducidos, agregándose dos o tres unidades adicionales de átomos de carbono (Huijberts et al., 1992) y a la oxidación directa, donde el número de carbonos del sustrato es igual al del PHA obtenido (Haywood et al., 1989). En relación con esto, el agregado de ácido valérico produjo una reducción en el rendimiento de PHBV en *A. vinelandii* UWD, la inducción de la  $\beta$ -oxidación ha sido indicada como el mecanismo que indujo la disminución en el rendimiento (Page y Manchak, 1995).

Los PHA tienen un rol taxonómico limitado a ser un indicador del estado fisiológico en el que se halla una determinada comunidad microbiana. La presencia o no de PHB es función de las condiciones del medio externo, además de ser producido por una gran

variedad de microorganismos, en consecuencia no puede utilizarse como marcador (Odham et al. 1986; Mas-Castellá y Guerrero, 1995).

## 7. Clonado de los genes para la biosíntesis de PHB

Con relación a los estudios realizados a través de los métodos de ingeniería genética, varios investigadores han clonado los genes para la producción de PHB y los han expresado en la bacteria *Escherichia coli* (Slater et al., 1988; Schubert et al., 1988) y *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (Pries et al. 1990). Las bacterias recombinantes eran capaces de acumular una sustancial cantidad de poli- $\beta$ -hidroxibutirato como gránulos intracelulares. Sin embargo, la introducción de los nuevos genes resulta en el establecimiento de un nuevo camino metabólico, que compete con los ya existentes como los de síntesis de citrato, acetato y de ácidos grasos. Además se requiere de un plásmido muy estable, ya que los plásmidos recombinantes se pierden fácilmente durante la etapa de formación de PHB. Concentraciones de PHB de 81 g/l a 41 h de cultivo fed-batch a pH constante pudieron ser obtenidas con la bacteria recombinante XL1-Blue(pSYL105) (Lee y Chang, 1995). El gen estructural de la enzima PHB depolimerasa, encargada de la biodegradación en el ambiente del PHB para dar los monómeros 3-HB utilizables como nutriente microbiano, también ha sido clonada en *E. coli* a partir de *Alcaligenes faecalis* (Saito et al., 1989); genes para la biosíntesis de PHA han sido estudiados en bacterias anoxigénicas fototróficas (Liebergessell et al. 1993). La posibilidad para transferir los genes de la biosíntesis de PHB entre bacterias no relacionadas permitiría la producción de distintos polihidroxialcanoatos en bacterias que actualmente se cultivan en escala. También se han clonado los genes para la biosíntesis de PHB en la planta *Arabidopsis thaliana* (Poirier et al. 1995; Van der Leij F. y Witholt 1995). De las tres enzimas involucradas en la biosíntesis de PHB, sólo la 3-cetotiolasa (gen *phb a*) se encuentra presente en forma endógena en las plantas. Los otros dos genes, que codifican para la acetoacetyl-CoA reductasa (gen *phb b*) y la PHA sintasa (gen *phb c*) fueron introducidas a la planta de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* (Poirier 1992). El PHB obtenido en plantas posee una distribución mucho más amplia que el del PHB obtenido de bacterias, además los rendimientos son muy bajos, por lo que se necesitan

superar muchos obstáculos antes de que la producción de PHB en plantas sea factible (Page 1995).

### **8. El rol del PHB en las bacterias fijadoras de nitrógeno**

El PHB comienza a acumularse durante la fase exponencial de crecimiento, y continúa acumulándose hasta fase estacionaria temprana, donde se alcanza su concentración máxima. La producción de PHB ha sido investigada en distintos géneros fijadores de nitrógeno: *Azotobacter sp.*, *Beijerinckia sp.*, *Azospirillum sp.* y *Derxia sp.* (Bleakley et al. 1988; Stockdale et al., 1968). La biosíntesis de PHB ha sido vista como un mecanismo para la acumulación de una fuente de carbono, poder reductor y energía; otros autores han postulado que también posee una función regulatoria de la fijación de nitrógeno y de la utilización de glucosa (Senior y Dawes 1971, 1973; Senior et al. 1972; Jackson y Dawes 1976). Estos autores encontraron que *Azotobacter beijerinckii* forma PHB bajo condiciones de limitación de oxígeno, pero con la presencia de cantidades adecuadas de nitrógeno y glucosa.

El PHB juega también un rol en el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno entre las bacterias *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y las plantas leguminosas. Esta asociación lleva a la producción de nódulos radiculares en los cuales el microorganismo existe como bacteroide: células pleomórficas incapaces de reproducirse independientemente y que poseen una nitrogenasa activa no presente en la bacteria. En estos bacteroides se observó una acumulación de PHB de cerca del 50% de su biomasa, a pesar que la fijación de nitrógeno y la síntesis de PHB son procesos que compiten simultáneamente por los equivalentes de reducción disponibles. Permite una mayor sobrevivencia y adaptabilidad de los microorganismos en condiciones en las que debe competir con otros (Stokes y Parson 1968; Wong y Evans 1971, Karr et al. 1986), como es el caso de *Rhizobium*, que se utiliza como inoculante de leguminosas a campo. Es por ello deseable obtener cepas de rizobios que acumulen PHB para mejorar los inoculantes. La dificultad principal en este caso radica en que para obtener alta biomasa en los biorreactores debe utilizarse un medio de cultivo rico en nutrientes (por ejemplo, nitrógeno) condiciones que no son

favorables para la acumulación de PHB. Sin embargo, cada sistema de cultivo debe estudiarse de manera de llegar a una solución de compromiso entre ambas condiciones.

La limitación de oxígeno es una condición óptima para la fijación de nitrógeno, ya que no se requiere del uso de nucleótidos reducidos para la exclusión del oxígeno del sistema de la nitrogenasa. Sin embargo, las grandes cantidades de NADH y NADPH que se acumulan en esas condiciones dentro de las células de *Azotobacter* pueden inhibir algunas enzimas del camino de Entner-Doudoroff, así como enzimas involucradas en la oxidación del acetyl-CoA, lo que puede afectar negativamente la fijación de nitrógeno. La utilización de NADPH para la síntesis de PHB a partir de acetyl-CoA, que también se acumula en deficiencia de oxígeno, previene esta inhibición, favoreciendo indirectamente la fijación de nitrógeno (Mulder y Botoronegoro 1974).

La producción de mucílagos o exopolisacáridos (EPS) es una característica importante de *Azotobacter* (Cohen y Johnstone, 1964; Kamat et al. 1995). A pesar de que su formación está relacionada a factores nutricionales como el tipo de fuente de carbono y de nitrógeno, principalmente se trata de una característica genética propia de cada especie. La producción de EPS compite con la biosíntesis de PHB por la fuente de carbono. Se ha visto que cuando se incrementó la concentración de la fuente de carbono aumentó la producción de EPS en *Azotobacter sp.* (Stockdale et al., 1968). El incremento en la biosíntesis de EPS contribuye a la creación de un ambiente anaerobio intracelular, favoreciendo la fijación de nitrógeno. Una forma de reducir la formación de EPS es por medio del agregado de antibióticos (Portoles et al., 1967). Otras bacterias, como una cepa mutada de la metilótrofa *Methylobacterium rodhesianum*, produjeron grandes cantidades de EPS y menores de PHB, pero solamente bajo limitación de nitrógeno y no de fósforo y oxígeno. Se sugirió que esto sólo sería posible si la energía estaba disponible como ATP, ya que la biosíntesis de EPS a partir de metanol requiere 1 mol de ATP/mol de metanol para producir 1 mol de EPS por el camino de la serina (Breuer et al., 1995).

Es una característica de *Azotobacter* la producción de formas de resistencia llamadas cistos, una vez que la máxima concentración de PHB haya sido alcanzada (Krieg y Holt

1984). Los cistos tienen alta resistencia a la desecación, sonicación, rayos UV y gamma, pero sólo una pequeña resistencia a la calor, contrariamente a las esporas bacterianas. Se ha demostrado que los productos de degradación del PHB se utilizan para la formación de cistos, que además requieren de la presencia de calcio para su formación (Sillman y Casida 1986). A pesar que una considerable parte del PHB es utilizada para la formación de cistos, microfotografías electrónicas han demostrado la presencia de PHB dentro de la estructura del cisto. Estas estructuras responden inmediatamente al agregado de carbono externo a través de la respiración y síntesis de proteínas. Se ha reportado que la sacarosa y algunos metales pueden inducir la formación de cistos (Foda et al., 1983).

### **9. Ventajas de los PHAs como bioplástico y obtención industrial**

Una de las áreas donde más se está trabajando es en la búsqueda de nuevos materiales que puedan incorporarse más racionalmente a los ciclos biológicos. El manejo de los residuos sólidos urbanos y dentro de ellos el aumento de la proporción de plásticos en ellos (cerca de un 7 a 10% del peso total, y 20% del volumen total) provoca un impacto negativo sobre el medio ambiente debido a que no se degradan en tiempos razonables. Adicionalmente, los sitios para la disposición final de los residuos son cada vez menos disponibles, a medida que los centros urbanos crecen. Se ha estimado que el 30% de los residuos municipales provienen de bienes que tienen menos de un año de utilización, sobrepasando ampliamente una capacidad razonable de reciclaje (Hangii 1995; Luzier 1992; Stein 1992).

En 1990, casi 7 millones de toneladas de resinas termoplásticas, o el 25% del mercado actual de plásticos, fueron usadas para fines de envasamiento (Page 1995). Los estudios sobre contaminación ambiental predicen que para el año 2000 el total de desperdicios en plásticos será de aproximadamente 800.000 a 1,36 millones de toneladas y al mismo tiempo la capacidad de incineración disminuirá en 360.000 toneladas por diversos motivos (Brandl et al., 1990, 1995). Varios métodos de reciclaje de polímeros han sido propuestos, como incineración, bio y fotodegradación, compostado y reciclado-post-consumo. La incineración no es recomendada por las emisiones gaseosas que producen, sin embargo de esta forma se recicla actualmente el 15% de los residuos sólidos

mundiales. La biodegradación y compostado requieren de la separación de los materiales no degradables, lo que influye en los costos monetarios, de igual forma que en el reciclado-post-consumo, que necesita ser incentivado por una política de premios, educacional o de reembolsos que normalmente es onerosa de practicar (Swift 1992, Stein, 1992).

Teniendo en cuenta lo mencionado, y que el tiempo de vida media de plásticos como el polietileno (PE) o policloruro de vinilo (PVC) ha sido estimado en casi 100 años, investigadores e ingenieros de la ex-ICI de Inglaterra (Zeneca Bioproducts, Billingham) han capitalizado su experiencia en fermentaciones industriales para la producción de polihidroxialcanoatos derivados de microorganismos (Hughes y Richardson 1981; King 1982). En 1990 la empresa Wella de Alemania utilizó el copolímero PHBV de Zeneca para presentar uno de sus productos en el primer envase totalmente biodegradable. El PHBV (conocido comercialmente como "Biopol") es obtenido por cultivo en fermentadores de la bacteria *Alcaligenes eutrophus*, que llega a acumular hasta un 80% de su peso seco en PHA, cultivando la bacteria durante 110 horas. En la primer etapa todos los nutrientes están en exceso, incluyendo la glucosa. Aquí es poca o nula la acumulación de PHB. En la segunda etapa se alimenta con glucosa, y como las células no pueden producir proteína debido a la baja cantidad de fosfato se acumulan grandes cantidades de PHB. Ácidos orgánicos como el propiónico se agregan al medio para la obtención del copolímero más flexible (Luzier 1992; Lee et al. 1996). El efecto de la deficiencia de fosfato ha sido investigado en *Azotobacter chroococcum* 23, observando que promueve la formación de PHB pero con menor biomasa (hasta 90% del peso seco con 4 g/l de biomasa) con una concentración óptima de fosfato de 0.5 g/l (Gertsberg et al., 1998).

La principal ventaja de los PHAs con respecto al medio ambiente es la de ser completamente biodegradables, por lo tanto son desintegrados completamente en dióxido de carbono y agua luego de tiempos relativamente reducidos. Como ventajas adicionales, es 100% resistente al agua, biocompatible y termoplástico (Hrabak 1992). Los PHAs poseen amplia versatilidad, pues es posible mezclarlos o copolimerizarlos con plásticos sintéticos de uso corriente derivados de la industria petroquímica, los cuales

son muy difícilmente biodegradables, como así también con almidón (Verhoogt et al. 1995). Esta compatibilidad permite que gradualmente puedan incorporarse los PHAs en las formulaciones de los plásticos en variadas aplicaciones, de manera de conjugar las propiedades útiles de ambos tipos de compuestos, ya que no deben olvidarse virtudes de los plásticos no biodegradables sintéticos como la flexibilidad, dureza, resistencia y otras propiedades de los polietilenos, policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (telgopor), poliésteres sintéticos como el nylon o perlon, resinas y elastómeros de estireno y butadieno (Bergen 1968).

La principal desventaja actual consiste en el alto costo de producción (U\$S 16/kg, comparado con U\$S 1/kg del polipropileno (PP)). En particular, el sustrato carbonado para los microorganismos, como ser la glucosa, influye directamente en el precio final de los PHAs (Page 1989, 1992a,b). Adicionalmente, el proceso de extracción demanda el uso de solventes orgánicos (lo cual exige la instalación de una planta recuperadora de solventes); por estos motivos el costo de producción del PHBV era 30 veces mayor al del polietileno en 1990. No obstante, los costos se han reducido a U\$S16/kg de PHBV contra U\$S1/kg del PP en 1995. Ese año se produjeron cerca de 500 toneladas, a un costo comparativo cada vez menor.

La recuperación del PHB a partir de la biomasa (“downstream processing”) es el paso crítico del proceso total influyente sobre el costo final. Las extracciones en gran escala con solventes orgánicos, a pesar de dar un alto rendimiento, son técnicas caras e implican el manejo de grandes volúmenes de líquidos volátiles, además de necesitar, como se dijo, una amplia inversión en una planta recuperadora de solventes. Para reducir costos, Zeneca Bioproducts ha desarrollado un proceso que no requiere el uso de solventes: las células desintegradas por un shock de calor son tratadas con una serie de enzimas y detergentes en un proceso digestivo que solubiliza los componentes distintos del PHB. El biopolímero luego es lavado, se flocula y recupera como un polvo blanco, que se convierte en chips o pastillas por los procesos usados en la industria plástica (Holmes y Lim, patente US 4910145, 1990).

A pesar de los avances realizados, mientras no pueda reducirse considerablemente el costo de producción, las aplicaciones estarán limitadas a aquellas muy especializadas (Stein, 1992). Esto ha llevado a la utilización de los PHAs como material para suturas, implantes, placas óseas, microcápsulas para la liberación lenta de fármacos. Drogas y hormonas han sido ocluidas en la matriz polimérica del PHB y luego liberadas en forma prolongada fármacos (Korsatko 1983; Domb 1992, 1993). El PHB se degrada lentamente en el organismo, en periodos que van de meses al año, en contraste con el más utilizado ácido poliláctico (Hrabak, 1992).

#### **10. Métodos para mejorar las propiedades del PHB**

Su aplicación masiva en packaging por ahora se ha circunscripto a las pruebas piloto realizadas en Alemania por Wella AG con el copolímero PHBV "Biopol", que es más flexible que el PHB, aunque tiene la desventaja de tener baja velocidad de cristalización, causando ciclos de mayor duración en las máquinas de inyección, siendo entonces más susceptible a la degradación térmica (Hrabak 1992, De Koning 1995). La utilización generalizada como termoplástico del PHB está limitada por el inconveniente de volverse quebradizo por envejecimiento (Scandola et al. 1989) y de perder sus propiedades de barrera a los gases (Hanggi 1995), lo que también sucede con los copolímeros (De Koning 1995). Sin embargo, estas desventajas pueden evitarse fácilmente calentando el PHB o los productos hechos con él a 150°C en hornos, de manera de inducir un proceso de fusión y recristalización, resultando en una estructura laminar más gruesa. Así, las regiones cristalinas no aprisionan las amorfas de la misma forma que en el PHB sin calentar, dando lugar a una mejor resistencia a la fractura. Por este sencillo procedimiento, puede aumentarse la tensión de fractura de 2 a 30%, reteniendo un módulo tensil de 2-3 GPa (De Koning, 1995).

Otra forma de mejorar las propiedades del PHB, como se mencionó, es por mezcla ("blending") con otro tipo de polímeros, como almidón o ésteres de celulosa, polietileno (PEO), etilvinilacetato (EVA), PHB atáctico sintetizado químicamente y varios otros (Abbate et al. 1991; Timm et al. 1990; Lotti y Scandola 1992; Scandola et al., 1992; Kumagai y Doi 1992). Estas mezclas resultan en un incremento significativo de

la flexibilidad de estos plásticos con poca o reducida pérdida de resistencia mecánica, tensión de ruptura y módulo de Young (Bergen 1968; Kumagai y Doi 1992). Existe otra posibilidad de evitar el carácter quebradizo uniformando el proceso de nucleación y cristalización del PHB por el agregado de nucleantes, como por ejemplo, talco, cloruro de amonio o más sorprendentemente sacarina, que ha probado encajar perfectamente en la estructura cristalina del PHB (Barham 1984).

Además de los biopoliésteres PHAs, existe un limitado número de poliésteres sintéticos que son completamente biodegradables. Entre estos se encuentran aquellos con uniones éster alifáticas en la cadena principal, como por ejemplo, policaprolactona, ácidos poliláctico y poliglicólico (Sasikala y Ramana 1996). En el caso de la policaprolactona (PCL) su obtención es más económica que la del PHB, sin embargo, su punto de fusión es muy bajo: 60°C. Constituyen entonces, como se detalló, materiales muy promisorios las mezclas o composites de plásticos sintéticos, microbianos y de almidón o sus derivados, actualmente estudiados y ensayados con creciente interés para adecuar sus propiedades a los usos deseados.

Los PHAs también pueden ser sintetizados por vía química a partir de  $\beta$ -alquil- $\beta$ -propiolactonas por ruptura del anillo utilizando catalizadores organometálicos. Por ejemplo, el PHB se obtiene a partir de la  $\beta$ -butirolactona con un catalizador de aluminoxano (Lenz et al. 1995; Hori et al., 1995). El inconveniente es que los pesos moleculares son usualmente mucho menores que los de los PHAs obtenidos biosintéticamente (Sasikala y Ramana, 1996) y que la biodegradabilidad se ve grandemente reducida.

## **11. Condiciones metabólicas y biotecnológicas utilizadas para la obtención de PHAs**

Para la producción de polihidroxicanoatos se debe crear un estrés metabólico en el medio de cultivo por medio de condiciones de limitación de nutrientes en presencia de una fuente en exceso de carbono y energía. La producción de PHA puede alcanzarse ya sea simultáneamente con la producción de biomasa microbiana (por ejemplo, en

*Alcaligenes latus* (Hrabak 1992) o *Azotobacter vinelandii* UWD (Page y Knosp 1989)) o bien en un proceso serial donde los microorganismos son inicialmente crecidos en un medio completo para obtener alta biomasa, y en segundo lugar, el medio es depletado en un nutriente esencial para inducir la bioacumulación (caso *Alcaligenes eutrophus*, utilizada en la producción industrial de PHBV). En la mayoría de las bacterias, el PHA se forma durante la fase estacionaria.

El cultivo en fermentador alimentado (cultivo fed-batch) consiste en el suministro de una solución nutritiva al medio original una vez obtenida la biomasa en la etapa de crecimiento (Mc Neil y Harvey 1990). Se distingue del método de cultivo continuo en que el volumen en un proceso fed-batch no es constante, característica principal del cultivo continuo, que es operativamente más complejo y difícil de mantener en condiciones estables. Ya que la fuente de carbono es agotada en la etapa de producción de biomasa, el cultivo fed-batch permite agregar un fuente de carbono en el momento adecuado para iniciar la bioconversión a PHA. La administración de la fuente de carbono en baja concentración ha sido indicada como necesaria para alcanzar altas concentraciones de PHB, evitando inhibiciones por sustrato (Mulchandini et al, 1989; Wulfes et al., 1998).

El cultivo por fed-batch ha sido aplicado a fermentaciones industriales para la producción de penicilina, levadura para panadería y en el tratamiento biológico de efluentes. En este sistema de cultivo puede evitarse el efecto de represión por catabolito de la formación de producto por las altas concentraciones de fuente de carbono (Wang 1979).

Se ha sugerido la posibilidad de obtener alta biomasa en un bioreactor y de transferir las células a un segundo recipiente tipo “plug flow” para la etapa de bioacumulación de PHB (Braunegg et al., 1995). Esto reduciría notablemente los tiempos de proceso, desde más de las 100 horas insumidas actualmente hasta menos de 50, haciendo más económico el proceso total.

## **12. Propiedades físico-químicas de los PHAs**

### 12.1. Biodegradabilidad

La propiedad fundamental por la que se estudian los PHAs es inherente a su forma de obtención: la biodegradabilidad. Las principales técnicas usadas para determinar la biodegradación son: a) como pérdida de peso de cintas de PHB incubadas en ambientes naturales o en laboratorio (Mergaert et al. 1995) b) como pérdida de turbidez de placas con medio mineral conteniendo PHB (Brandl et al., 1995) o c) midiendo el monómero formado como resultado de la biodegradación de PHB (Shirakura et al, 1986).

Existen numerosos factores que pueden afectar la biodegradación, entre algunos de ellos pueden citarse: a) los parámetros físico-químicos del ecosistema (temperatura, pH, humedad, oxígeno, luz, requerimientos nutricionales de los microorganismos, b) población microbiana c) propiedades físicas y morfología del PHA (cristalinidad, porosidad, grosor, aditivos o cargas presentes, peso molecular, grupos funcionales y configuración estérica, mezclas con otros polímeros) y d) método de contacto entre la muestra y los microorganismos.

El PHB y el copolímero PHBV han sido los más estudiados, se ha demostrado su biodegradación en suelo, agua y compost (Mergaert et al., 1992). Fue observada la biodegradación de PHAs bajo condiciones anaeróbicas, considerando que la digestión anaeróbica puede ser la forma de eliminar plásticos hechos con PHA, con la ventaja de la conservación de la energía debida a la recuperación de metano (Budwill et al., 1992). El PHB puede ser degradado por una amplia variedad de microorganismos, tanto bacterias como hongos (Schirmer et al., 1995; Matavulj y Molitoris, 1992). Se ha estimado que los microbios degradadores de PHA representan hasta el 10% del total de microorganismos presentes en el medio ambiente. Entre 325 microbios aislados de suelos neutros, 47% fueron bacterias, 24% streptomyces y 29% hongos, siendo *Acidovorax facilis* la bacteria gram-negativa dominante en cuanto a la biodegradación de PHB (Mergaert, 1992).

Otros autores encontraron *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. como bacterias predominantes, y *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* y *Verticillium* sp. entre los hongos (Matavulj y Molitoris, 1992). Como es esperable,

debido a la mayor actividad microbiana, la biodegradación es más rápida a mayores temperaturas (Mergaert et al., 1992).

A pesar que los PHAs pueden ser convertidos por los microorganismos en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en semanas o meses, se requiere de mayor velocidad de biodegradación para adecuarse a los sumideros de residuos urbanos (o landfills). Para ello se ensayaron mezclas de PHB o P(HB-co-HV) con almidón: películas de 150  $\mu\text{m}$  conteniendo partes iguales de almidón y P(HB-co-HV) perdieron el 100% de su peso en 8 días, mientras que se necesitaron 30 días para la completa biodegradación de P(HB-co-HV) (Ramsay et al., 1995). Películas de 800  $\mu\text{m}$  necesitaron 21 días para su completa biodegradación. Se han encontrado pérdidas del 18 al 40% de masa luego de 12 semanas de exposición de placas de PHB de 2 mm a compost (Hrabak 1992).

La biodegradación del PHB obtenido de *Azotobacter chroococcum* 23 fue estudiada en muestras de suelos, registrándose pérdidas del 20-25% del peso de las películas en 20-22 días de incubación (Dzene et al., 1998). Mergaert y colaboradores (1992, 1995) encontraron que no se detectaron apreciables cambios en el peso molecular durante la biodegradación, concluyendo que la degradación se produce en la superficie del polímero. Encontraron disminución de peso molecular recién a altas temperaturas ( $40^\circ\text{C}$ ) en suelos, y una tendencia del PHBV a degradarse más rápidamente que el PHB. Doi y colaboradores (1990) no halló correlación entre la pérdida de masa y disminución en  $M_r$ , también encontró que el copolímero P(3-HB-co-4-HV) se biodegradaba más rápidamente que P(3-HB-co-3-HV), debido al menor impedimento estérico del monómero 4-hidroxibutirato comparado con el del 3-hidroxibutirato. Brandl y colaboradores (1995) concluyeron que no podía medirse la biodegradación de los PHAs por medio de mediciones del  $M_r$ ; también observaron que el PHB pierde resistencia mecánica durante el curso de la biodegradación debido a la erosión superficial. Esto ha sido explicado considerando una erosión primaria de las regiones amorfas, que dejan intactas las fracciones cristalinas más quebradizas. Doi e Iwata (1998) no encontraron disminución en el peso molecular durante la hidrólisis enzimática del PHB, confirmando resultados anteriores (Doi et al., 1990).

En general, la copolimerización aumenta la tasa de biodegradación (Doi 1990). El método de contacto microorganismos-polímero afecta la biodegradación: se observó que la pérdida de peso de películas de P(HB-co-HV) era menor cuando se muestreaba la misma película mensualmente comparada con otra película que se mantenía sin alteración durante el experimento completo (Gilmore et al., 1992). Películas de PHB obtenidas por evaporación resultaron menos susceptibles a la biodegradación que películas tipo latex obtenidas por prensado en caliente, debido a la mayor cristalinidad de las primeras (Marchessault et al., 1994).

Como se indicó más arriba, además de los PHAs completamente biodegradables, existen poliésteres sintéticos que muestran cierto grado de biodegradación, entre ellos el polietilenadipato, poliglicolato, poliláctico y policaprolactona, siendo este último el más estudiado, que puede biodegradarse en un año una vez enterrado (Kumagai y Doi, 1992). Sin embargo, no son inherentemente biodegradables ya que no han existido suficientemente para que los microorganismos produzcan las depolimerasas adecuadas para biodegradar cada uno de ellos (Timmins y Lenz, 1994); no así en el caso del polietilenglicol, presente en el ambiente desde más de 40 años, y para el cual se han seleccionado en la Naturaleza diol dehidratasa específicas en bacterias aeróbicas y anaeróbicas (Schink et al., 1992).

## **12.2. Peso molecular**

De todas las propiedades físicas de los polihidroxicanoatos la que más influye sobre las características mecánicas y estructurales es el peso molecular ( $M_r$ ). El peso molecular y la distribución de pesos moleculares afectan fuertemente las propiedades mecánicas y de procesabilidad de los polímeros (Bradel y Reichert, 1993; Dennis et al., 1994). El grado de polimerización debe ser controlado ya que afecta las propiedades mecánicas y de biodegradabilidad. Además, con el fin de adecuar cada PHA a aplicaciones específicas, pesos moleculares mayores que  $10^5$  no son convenientes como soportes de biodegradación en la administración prolongada de medicamentos (Korsatko et al., 1983, Suzuki et al. 1988). No todos los microorganismos productores de PHAs son adecuados para la producción industrial de estos polímeros, debido en la mayoría de

los casos a los bajos pesos moleculares del polímero sintetizado y a la elevada polidispersión (Reusch et al. 1987; Asenjo et al., 1995). Este es afectado principalmente por las condiciones de cultivo y los procedimientos utilizados para la extracción.

De las condiciones de cultivo que influyen sobre  $M_r$ , se han estudiado la temperatura, pH, concentración y tipo de la fuente de carbono, la relación carbono/nitrógeno y la limitación de nutrientes, como ser magnesio y fósforo. La evolución del peso molecular durante el curso de las fermentaciones fue estudiada en bacterias metilótrofas, observándose que el  $M_r$  varió dependiendo de la concentración del sustrato, de la temperatura y del pH medio, encontrando que 30°C y pH 7.0 eran óptimos para la biosíntesis de PHB.  $M_r$  varió considerablemente de acuerdo a la concentración de metanol, siendo 0.5 g/l la concentración óptima (Suzuki et al., 1988). El efecto de la aireación y la relación C/N fue reportado en *Azotobacter chroococcum* 6B (Quagliano y Miyazaki, 1997) encontrando que  $M_r$  disminuyó a mayor tasa de aireación y a menor relación C/N. La influencia de sustratos complejos ha sido estudiada en *Azotobacter vinelandii* UWD, los más altos pesos moleculares de PHB reportados de  $4 \cdot 10^6$  han sido obtenidos creciendo este microorganismo en 5% de melazas de remolacha (Chen y Page, 1994). Estos autores propusieron que componentes de naturaleza distinta a carbohidratos promueven la formación de PHB de alto peso molecular. También observaron que  $M_r$  disminuyó a medida que aumentó la concentración de melaza de remolacha de 5 a 10% en el medio de cultivo. Asimismo,  $M_r$  igualmente elevados ( $3.4 \cdot 10^6$ ) han sido obtenidos de *Azotobacteriaceae*, a partir de la cepa *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 (Akita et al., 1976). Con células jóvenes de la cepa *A. vinelandii* UWD se obtuvieron valores de  $M_r$  de  $1 \cdot 10^6$  a  $2 \cdot 10^6$ , la dispersidad era relativamente alta en células activas en crecimiento, indicando que había una mezcla de cadenas cortas y largas en los gránulos. Luego de 24 h, el peso molecular aumentó a  $4 \cdot 10^6$ , con baja polidispersión. Se ha sugerido que *A. vinelandii* UWD está incapacitada de terminar la formación del polímero, o bien que el polímero sintetizado no tiene turn-over dentro de la célula (Manchak y Page, 1994).

Respecto de la limitación de nutrientes, en *Alcaligenes eutrophus*, bajo limitación de amonio y exceso de glucosa,  $M_r$  disminuyó de  $2 \cdot 10^6$  a  $0.9 \cdot 10^6$ , cuando la concentración

de magnesio se redujo al 50% de su valor en el medio basal. También bajo limitación de amonio y exceso de glucosa el fosfato no influyó sobre el  $M_r$  del PHB o su distribución, mientras que con glucosa limitante o no en exceso el  $M_r$  disminuyó cuando el fosfato se redujo al 50% de su valor en el medio basal. Un ensanchamiento de la distribución de pesos moleculares al final de cultivos fed-batch se atribuyó a una limitación de fosfato y/o a un exceso de glucosa (Asenjo et al., 1995). Taidi y colaboradores (1992) encontraron que bajo condiciones de deficiencia prolongada de nitrógeno y carbono *A. eutrophus* utilizó su reserva de PHB, que fue acompañada de una disminución en  $M_r$ . Chen y colaboradores (1992) vieron que sin fuente combinada de nitrógeno el  $M_r$  era menor que en presencia de una fuente de nitrógeno. El peso molecular no guardó correlación con el contenido o con la velocidad de formación del PHB, como también observaron Suzuki y colaboradores (1988) con *Methylobacterium extorquens*. El efecto de la deficiencia de nutrientes se estudió en la metilótrofa *Pseudomonas cepa 135*, siendo los  $M_r$  del PHB obtenido a partir de medios limitados en amonio, fosfato y magnesio de  $3.7$ ,  $3.1$  y  $2.5 \cdot 10^5$ , respectivamente (Daniel et al., 1992).

Con relación a la influencia de la fuente de carbono, Bradel y Reichter (1993) encontraron que en cultivos en erlenmeyers  $M_r$  disminuyó notablemente a altas concentraciones de la fuente de carbono (glucosa), asimismo disminuyó durante el transcurso de la fermentación ( $1.5$  a  $1.3 \cdot 10^6$  a 17 y 27 h de cultivo, respectivamente). Esto podría deberse a un balance entre la síntesis y degradación del PHB, o a la síntesis de PHB de menor  $M_r$  hacia el final de la fermentación. También observaron que  $M_r$  disminuyó desde  $1.7 \cdot 10^6$  hasta  $1.2 \cdot 10^6$  durante el cultivo en fermentador de *Alcaligenes eutrophus* con fructosa, además de un efecto muy pronunciado del pH, obteniéndose pesos moleculares desde  $0.1 \cdot 10^6$  hasta  $3.4 \cdot 10^6$ , con un índice de polidispersión de entre 1.3 y 2.0 a pH 6.5-7 y 5.5-6.0, respectivamente. Kawaguchi y Doi (1992) encontraron que  $M_r$  disminuyó durante el cultivo batch de *A. eutrophus* con fructosa. Contrariamente a lo obtenido por otros autores con otros sustratos, no se encontraron variaciones significativas en el peso molecular con *Alcaligenes eutrophus* al modificar la concentración del 3-hidroxi-butirato utilizado como fuente de carbono (Doi 1990). Shimizu y colaboradores (1993) no encontraron variación de  $M_r$  durante el cultivo de *A. eutrophus* a una concentración constante de ácido butírico como fuente de carbono. En

*Alcaligenes latus* se encontró que la fuente de carbono (sacarosa) afectaba sensiblemente el  $M_r$  del PHB, 20 g/l de sacarosa fue la concentración óptima hallada respecto del peso molecular (Chen et al., 1992). En *Pseudomonas putida* el  $M_r$  del PHA producido disminuyó durante el cultivo en batch con octanoato como fuente de carbono (Hori et al., 1994). Una cepa recombinante de la misma especie produjo poli-4-hidroxivalerato (P-4-HV) de  $M_r$  entre  $3.3 \cdot 10^5$  y  $9.4 \cdot 10^5$ , con un índice de polidispersión entre 2.5 y 3.6 (Gorenflo 1998).

El efecto de la concentración de la fuente de carbono fue estudiado, como se adelantó, también en bacterias metilótrofas. Hasta 1990-92 era aceptado que las metilobacterias producían PHB de bajo peso molecular (hasta 400 kDa) (Anderson y Dawes, 1990; Byrom 1987; Daniel et al. 1992a; Suzuki et al. 1986). Sin embargo, concentraciones bajas de metanol (menores a 0.01 g/l) contribuyeron no solo a prevenir una limitación de oxígeno sino también a llegar a pesos moleculares entre 900 y 1800 kDa con la bacteria metilótrofa *Methylobacterium extorquens*, mientras que con 1.4 g/l de metanol solamente se obtenía PHB de cerca de 300 kDa (Bourque et al., 1995). Se ha sugerido que la concentración de la fuente de carbono estaría relacionada con el número de precursores de la biosíntesis de PHB, estando limitada la cantidad de precursores a bajas concentraciones de sustrato. Consecuentemente, se sintetizarían una menor cantidad de cadenas poliméricas con mayor longitud que en el caso de un exceso de fuente de carbono (Suzuki et al., 1986). Por otro lado, Bourque et al (1995) proponen que la concentración de oxígeno es el factor regulador del  $M_r$ , ya que cuando el metanol se agregó en forma proporcional a la cantidad de oxígeno disponible (de manera que los cultivos nunca estuvieran limitados en oxígeno) se obtuvieron los altos  $M_r$  reportados. Se comprobó que el  $M_r$  del PHB producido por *M. extorquens* decreció cuando se aumentó la concentración de succinato sódico en el medio de cultivo de 5 a 25 g/l ( $16$  y  $9.9 \cdot 10^5$ , respectivamente), aún cuando aumentaba el contenido de PHB (Taidi et al., 1992).

El peso molecular de los PHAs es diferente de acuerdo al tipo de microorganismo utilizado, por ejemplo en *Alcaligenes eutrophus* (Taidi et al. 1994, Shimizu et al, 1993) y *Pseudomonas putida* (Hori et al. 1994) se han hallado  $M_r$  de muy diferente tamaño; con *Pseudomonas oleovorans* crecida en varios metiloctanoatos se obtuvieron pesos

moleculares de entre 200.000 y 400.000 (Fritzche et al. 1990). Kim y colaboradores (1995) obtuvieron  $M_r$  menores a 100.000 para el copolímero PHBV a partir de *Pseudomonas putida* utilizando octanoato más derivados con grupos ciano y nitrofenoxi como fuente de carbono. También se ha obtenido PHB de alto peso molecular a partir de la bacteria metanótrofa *Methylocystis* sp. ( $M_r$  1.5 a  $1.8 \cdot 10^6$ ) bajo deficiencia de amonio (Wendlandt 1998). Scandola y Doi (1990) obtuvieron  $M_r$  de 100.000 a 800.000 para el copolímero P(3-HB-co-4-HV) con una cepa de *Alcaligenes eutrophus*.

Los microorganismos recombinantes *Klebsiella aerogenes* y *Escherichia coli* a los que se les introdujo los genes de biosíntesis de PHB produjeron polímeros de alto peso molecular, de 1 a  $2 \cdot 10^6$  (Dennis et al., 1994).

El efecto de los métodos de extracción sobre el peso molecular fue descrito por varios autores, observándose que el uso de hipoclorito de sodio e hipoclorito y surfactante durante la extracción reducen considerablemente el peso molecular, cerca de 30 y 50%, respectivamente, aún cuando aumentaba la pureza del PHB (Ramsay et al., 1990; Berger et al., 1989, Lundgren et al., 1965). Un proceso acuoso de extracción de PHBV a partir de *Alcaligenes eutrophus*, desarrollado y patentado por ICI, que involucra un tratamiento térmico seguido de uno enzimático, produjo pesos moleculares de  $6 \cdot 10^5$ , mientras que la extracción efectuada con solventes rinde  $M_r$  promedio de  $1 \cdot 10^6$  (Luzier 1992). Nuti et al. (1972) observaron que el peso molecular viscosimétrico del PHB obtenido de células liofilizadas era cinco veces mayor que el encontrado a partir de células húmedas. En *Rhizobium meliloti* un método de extracción suave utilizando acetona rindió  $M_r$  del orden de  $10^6$ , mientras que extraído con HCl 1M a  $100^\circ\text{C}$  y cloroformo produjo PHB de 2 y  $4.5 \cdot 10^5$  (Scandola et al., 1988).

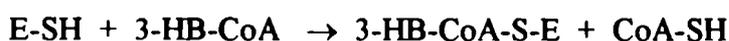
La posibilidad de modular el  $M_r$  del PHB por adición de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo ha sido ensayada en *A. eutrophus* (Shi et al., 1996) pudiéndose reducir el  $M_r$  de 455000 a 19400 con 10% PEG de  $M_w$  106 (dietilenglicol).

El índice de polidispersión ( $M_w/M_n$ ) permaneció aproximadamente constante en los estudios de Mansfield et al. (1995) con *A. eutrophus*, mientras que el  $M_r$  varió entre 1.4 y  $2.4 \cdot 10^6$ . Estos autores sugirieron que una baja concentración de 3-hidroxibutiril-CoA

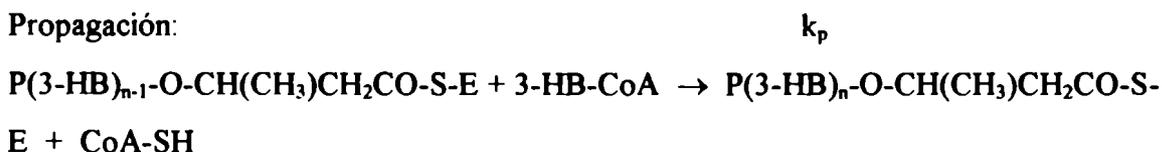
puede favorecer la formación de PHB de alto peso molecular. Bradel y Reichter (1993) notaron un aumento de  $M_w/M_n$  durante el curso de la fermentación en fructosa de *A. eutrophus*, contrariamente a Kawaguchi y Doi (1992) que obtuvieron un índice de polidispersión constante. Asenjo et al. (1995) encontraron un aumento de la polidispersión hacia el final de la fermentación en *A. eutrophus*.

Doi y colaboradores (1992) propusieron una cadena de reacciones para la formación de PHB, por un mecanismo de tres etapas, de iniciación, propagación y transferencia de cadena:

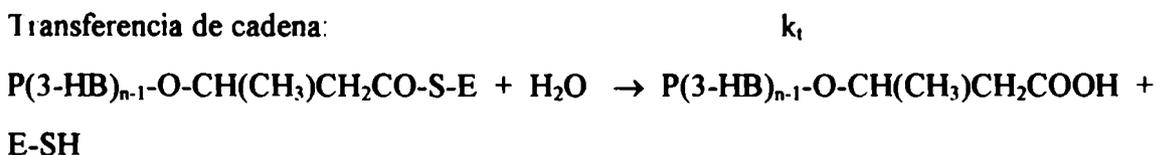
Iniciación:



Propagación:



Transferencia de cadena:



La reacción de transferencia de cadena con agua podría tener lugar en el sitio activo de la PHB polimerasa. El largo de la cadena de PHB está limitado por la etapa de transferencia de cadena. Se han estimado (en *A. eutrophus*) valores de  $k_p$  de  $2 \text{ s}^{-1}$ , lo cual indica que 2 moléculas de D-(-)-3-HB-CoA se incorporan por segundo a la cadena de propagación P(3-HB) en el sitio activo de la PHB polimerasa. A su vez,  $k_t$  se estimó en  $0.9 \text{ h}^{-1}$ , señalando que el tiempo de vida promedio de una cadena de P(3-HB) en propagación es de 1 hora.

### 12.3. Cristalinidad, propiedades térmicas, viscoelásticas y de resistencia mecánica

El poli-3-hidroxitirato posee propiedades físicas adecuadas para ser utilizado en manera similar a los plásticos sintéticos. Puede ser moldeado, convertido en fibras (Holmes, 1984, patente EP 104731; Nozawa et al., 1993, patente JP 05,209,314) o películas y reforzado con rellenos inorgánicos (Lageveen et al., 1988). Sin embargo, es

relativamente duro y quebradizo e inestable a temperaturas mayores a su punto de fusión, degradándose térmicamente durante su procesamiento.

Una vez aislado, e independientemente de la forma de extracción a partir de la biomasa, el PHB es un sólido cristalino con un punto de fusión de 177°C. Sin embargo, dentro de los gránulos in vivo el PHB nativo se comporta como un elastómero amorfo, posiblemente plastificado por lípidos de la membrana del gránulo y/o por agua, con una temperatura de transición vítrea estimada en -40°C (Harrison et al. 1992; Ceccorulli et al., 1992). Sin embargo, otros autores han postulado que la baja velocidad de cristalización es la que permite que se mantenga amorfo in vivo (De Koning y Lemstra, 1992). La remoción de los lípidos de la membrana del gránulo indujo la cristalización del PHB, indicando la importancia que éstos tienen en la preservación del estado amorfo y móvil in vivo (Kawaguchi y Doi, 1990; Barnard y Sanders, 1989).

La cristalización del PHB se produce rápidamente una vez que el polímero fundido comienza a enfriarse, no así en el caso de los copolímeros (Hangii, 1995). Cuando el PHB cristaliza desde el fundido forma esferulitas. El radio de las esferulitas aumenta con la temperatura a la que se produce la cristalización (Barham et al., 1994). El porcentaje de cristalinidad de muestras de PHB envejecidas a temperatura ambiente es de 55 a 60%. Esta fracción aumenta cuando se calienta a temperaturas cercanas a la temperatura de fusión (Scandola et al., 1988; Barham et al., 1984).

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que tratamientos de alta temperatura o el procesamiento de polímeros fundidos puede influenciar las propiedades químicas de los mismos, debido a degradación térmica. Se ha sugerido que la escisión de cadena al azar es el principal mecanismo por el cual se degrada térmicamente el PHB, con sensible disminución del peso molecular (Grassie et al., 1984; Sivasamy et al. 1992; Lehrle et al. 1995). Manteniendo muestras de PHB a 190°C durante cerca de 1 hora produjo que el  $M_r$  se redujera a la mitad (Barham et al., 1984). Recién a temperaturas mayores a 230°C existe pérdida apreciable de masa (Scandola et al., 1988). Koning y Lemstra (1993) han demostrado que por medio de un simple tratamiento de “annealing” el PHB puede ser endurecido, además el subsecuente envejecimiento del material se ve reducido. Se demostró que un tratamiento térmico mayor a 50°C restauró la ductilidad del poliéster

original no envejecido. Calentando "Biopol" por periodos de entre 5 segundos hasta 30 minutos a 80-150°C, preferiblemente por irradiación infrarroja, se obtuvo una mayor resistencia mecánica (Liggat y O'Brien, 1994, patente WO 94 28 049).

Cuando el novel poli-4-hidroxivalerato P(4-HV) fue procesado para ser convertido en fibras, se verificó una reducción en el peso molecular respecto del P(4-HV) sin procesamiento; este nuevo PHA tiene características físicas muy diferentes a su homólogo P(3-HV) (Gorenflo et al., 1998).

La resistencia mecánica del PHB ha sido investigada por medio de la realización de curvas de estrés aplicado (MPa) vs. el estiramiento producido. Estas indicaron que, contrariamente al comportamiento demostrado por otros polímeros semicristalinos, el PHB se extiende hasta un estiramiento de ruptura de 1.8-2%, comportándose como un material quebradizo. Esto se ha explicado considerando que la temperatura de ensayo es cercana a la de transición vítrea ( $T_g$ ). De esta manera, la fase amorfa que conecta las regiones de esferulita y las cristalinas está impedida de fluir, entonces la fractura se produce a estiramientos bajos (Abbate et al., 1991).

### **13. Aplicaciones de los PHAs**

#### **13.1. En medicina**

Se han utilizado los PHAs en aplicaciones en medicina, como por ejemplo en suturas, implantes quirúrgicos, en la protección de heridas, reemplazos ortopédicos y placas (aprovechando la estimulación que producen en el tejido óseo, dadas sus propiedades piezoeléctricas), formulaciones médicas en polvo (Holmes, 1985, patente GB 2160208) y como matriz o soporte biodegradable para la liberación prolongada de fármacos (Akhtar et al. 1992, Pouton y Akhtar 1996). La principal ventaja que ofrece el PHA en este caso es que permite que la droga se encuentre disponible en alta concentración en el sitio de acción, evitando someter a todo el cuerpo a la acción de las drogas. Han sido aplicados sistemas de liberación lenta en la terapia del cáncer, para evitar los terribles efectos negativos de la quimioterapia (depresión hematopoiética, dolor, pérdida del cabello) en contraposición con la administración endovenosa de quimioterápicos.

También puede aplicarse a otras drogas como antibióticos (y así reducir la frecuencia de aparición de nuevas cepas microbianas resistentes), insulina, estrógenos y otras.

### **13.2. En agricultura**

Pueden liberarse en forma lenta productos de interés en agricultura (herbicidas, fungicidas, insecticidas o fertilizantes) utilizando PHB como carrier biodegradable (Sasikala y Ramana 1996). Además, pueden aplicarse películas de PHB para el peleteado o recubrimiento de semillas. El peleteado de semillas para siembra ha sido un técnica utilizada por más de 30 años con gran éxito. Jansen (1994) detalló algunas de las razones por las que el peleteado de semillas contribuye a factores como la protección de nódulos de bacterias, protección de condiciones de stress (roedores, pájaros), efecto tóxico de fertilizantes, así como de actuar como soporte de nutrientes y materiales protectores, reduciendo costos de trabajo. Otra posible aplicación es la de filme para la protección temprana de cultivos (Miyazaki 1997).

### **13.3. Aplicaciones industriales varias**

Se ha utilizado el copolímero PHBV, Biopol, como envases, envoltorios, bolsas y películas, filtros autoseparativos, en productos de higiene como toallas, pañales, trapos y pañuelos descartables (Mochizuki et al., patente JP 05,93,317) y en productos donde se requiere alta resistencia mecánica, como por ejemplo, en cascos para ciclistas reforzados con fibras (Brandl et al., 1995). También como recubrimiento de láminas de papel para empaque de alimentos (De Koning, 1995), vajilla descartable, como componente de electrolito conductivo sólido aplicable a baterías (Rosetta y Williams, 1993, patente US 05,266,422), como absorbente de tintas residuales, o hasta los pins utilizados en el juego del golf. Actualmente la empresa norteamericana Monsanto comercializa el Biopol, y ha sido utilizado hasta para la confección de las tarjetas de crédito.

## **I I. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS**

El primer objetivo fue el de **optimizar un medio definido de cultivo** para que la cepa de *Azotobacter chroococcum* aislada y caracterizada crezca alcanzando un alto crecimiento celular y contenido de PHB, estudiando, entre otros parámetros, la concentración de nutrientes, pH y la relación del volumen del recipiente a la del medio de cultivo.

Luego se determinó el comportamiento de la cepa en **fermentadores** en condiciones controladas, evaluando distintas condiciones de cultivo en el medio optimizado, como ser el efecto de la fuente de carbono, tasa de aireación y relación C/N sobre la acumulación de PHB o el efecto del agregado por fed-batch de fuente de carbono simple o compleja en distinta etapa de cultivo sobre el contenido de PHB; comparando los resultados con aquellos obtenidos con el mismo medio de cultivo pero en este caso con un sustrato derivado de la agroindustria, como melaza de caña de azúcar.

Una vez fijados los parámetros fundamentales que incidieron sobre la bioacumulación de PHB (aireación y relación carbono/nitrógeno), la siguiente etapa fue la de estudiar cómo influían estos factores sobre **las propiedades físico-químicas** del PHB obtenido. De estas propiedades, el **peso molecular** relativo es aquella de mayor importancia en cuanto a la estructura del PHB producido.

Por último, se planteó estudiar posibles **aplicaciones** para el PHB. En primer lugar probamos si el PHB podía utilizarse como base para el crecimiento de keratinocitos en el cultivo in vitro de células de piel para trasplante en quemaduras extensas y graves. Aplicaciones agronómicas como la protección temprana de cultivos requiere de la producción de biofilmes en mayor escala, lo cual no es asequible en nuestro laboratorio debido a los volúmenes reducidos de cultivo. Teniendo esto en cuenta, estudiamos el efecto del peleteado de semillas de alfalfa con PHB, ocluyendo bacterias específicas del género *Rhizobium meliloti*, con el objetivo de evaluar si puede evitarse la práctica de inoculación de las semillas y si el peleteado afecta el crecimiento de las plantas.

También se ensayó el microencapsulado de una enzima (celulasa) en una película de PHB, con el objetivo de extender su actividad bajo condiciones adversas, como por ejemplo las existentes cuando es aplicada en un ensilado de pasturas para el ganado.

**En resumen, el plan de trabajo global consistió en el estudio de las condiciones de cultivo de una cepa de *Azotobacter chroococcum* aislada de muestras de suelos para la obtención del polímero biodegradable de origen microbiano poli-3-hidroxi-3-oxobutirato, el estudio de sus propiedades físico-químicas y la evaluación y desarrollo de sus potenciales aplicaciones prácticas.**

### III. MATERIALES Y METODOS

---

#### 1. Microorganismos

*Azotobacter chroococcum* 6B y 11 fueron aislados de muestras de suelo rizosférico del campus de la Facultad de Agronomía. Se conservaron en estrías con tapa a rosca con medio productivo de Burk modificado (Bm) agarizado a 4°C. *Azotobacter chroococcum* CR fue aislado de una muestra de suelos empetroados de Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina provista por la Estación Experimental del INTA de Trelew. *Azotobacter chroococcum* DSM 377 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) fue utilizado como cepa patrón.

*Pseudomonas oleovorans* SK2669 y *Pseudomonas aeruginosa* 01 pertenecen al cepario de la Facultad de Agronomía, World Federation of Culture Collections N°307. Se conservan en glicerol a -20°C.

#### 2. Medios y procedimiento para el cultivo de *Azotobacter* sp.

Para *Azotobacter* sp. se utilizó el medio de Burk y el medio Bm con glucosa como fuente de carbono. El medio Bm posee la siguiente composición (g/l): glucosa 10, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,012; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,01; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 y NaCl 0,4. El pH se ajusta a 7,0. Cuando se utilizó otra fuente de carbono simple o compleja distinta de glucosa como fuente de carbono, ésta última es suprimida del medio de cultivo. Cuando indicado se utilizó una solución de microelementos (1 ml/l) de la siguiente composición (mg/l):

ZnCl<sub>2</sub> 70, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 100, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 60, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 200, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 20, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 20, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 40, H<sub>2</sub>O c.s.p. 1 l.

En los cultivos en fermentador cuando se utilizó melaza (ya sea como única fuente o como sustrato de alimentación) ésta tuvo la siguiente composición porcentual aproximada:

sacarosa: 35-38, glucosa: 9-10, fructosa: 10-11, sustancias gomosas y coloidales 9-10, fósforo como  $P_2O_5$  0.1-0.15, nitrógeno total: 0.4-0.5, agua 15-16 y pH 5.5-5.8. También tiene vitamina B1: 140  $\mu\text{g/g}$ , vitamina B2 700  $\mu\text{g/g}$ , ácido pantoténico 5-1.2 mg/g y biotina 200-300  $\mu\text{g/g}$ . Tiene 86-90 grados Brix. La melaza fue provista por el Programa de Investigaciones en Microbiología Industrial, PROIMI, Universidad Nacional de Tucumán.

Para el tratamiento de la melaza se utilizaron dos métodos:

a) con resina de intercambio iónico Amberlite 120: se trató en batch dejando la resina en contacto con la solución de melaza en una proporción de 10 g de resina húmeda cada 200 ml de solución.

b) precipitación con superfosfato: se calentó 1 litro de solución de melaza con el agregado de 10 g de superfosfato triple, durante 10 minutos cerca de ebullición. Luego se filtró por filtro Whatman N°1 y se diluyó en medio Bm en la proporción requerida.

Para los precultivos de *Azotobacter chroococcum* se utilizaron erlenmeyers de 125, 250 y 500 ml con la décima parte en volumen de medio de cultivo, incubándose en agitador rotatorio a 220 rpm y 30°C, durante 48 horas.

Cuando se cultivó en fermentadores, se utilizaron dos modelos diferentes (Bioflo III, New Brunswick Scientific Co., USA y Gallenkamp Sanyo, England) ambos con 4 litros de capacidad útil máxima. Se mantuvieron condiciones controladas de agitación (por medio de paletas de lámina plana) y de temperatura, a través de un calentador (“dedo”) sumergido (Gallemkamp Sanyo) y de una camisa de acero inoxidable con circulación de agua termostatzada a la temperatura fijada de 30°C (Bioflo III). La aireación fue provista por medio de un compresor de 1 HP, filtrando el aire por medio de filtros Wathman. Ambos fermentadores están equipados con un sistema de baffles para evitar la adherencia de los microorganismos a las paredes del recipiente de fermentación.

Una vez finalizada la incubación, en todos los casos los microorganismos fueron cosechados por centrifugación en una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, USA) a 10.000 rpm durante 15 minutos y a una temperatura entre 5 y 15°C. Se lavó con buffer fosfato o solución fisiológica y se congeló el pellet obtenido a -20°C. A continuación el mismo fue liofilizado durante 24 horas a -53°C y  $3 \times 10^{-3}$  Mbar (Labconco Corp., USA).

### **3. Procedimiento de extracción de PHB**

El liofilizado (pulverizado en mortero) fue pesado y colocado en cilindros de extracción de papel de filtro dentro de un aparato de extracción continua de Soxhlet y se extrajo durante 24 horas utilizando cloroformo como solvente de extracción (Merck Química Argentina).

### **4. Procedimiento de purificación de PHB**

El extracto clorofórmico se concentró por destilación simple desde un volumen variable entre 200 y 250 ml hasta un volumen de 25 ml. Luego un volumen de extracto concentrado fue reprecipitado tres veces en 10 volúmenes de etanol en baño de hielo. El biopolímero reprecipitado fue filtrado por un filtro de cerámica sinterizado o de papel Wathman N°1. Alternativamente, fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos y recuperado el pellet de PHB. El PHB obtenido se secó en estufa a 60°C hasta llegar a peso constante.

Para las muestras destinadas a la determinación de peso molecular relativo se siguió el siguiente procedimiento:

- El extracto clorofórmico se filtra por medio de filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de nitrocelulosa.
- Se rotoevapora el extracto clorofórmico filtrado hasta 5-10 ml.
- El PHB se precipita sobre metanol (200 ml) y se lava con el mismo solvente.

-Se resuspende en benceno y se lleva al freezer (-20°C) para luego liofilizar.

## **5. Determinaciones cuali/cuantitativas**

### **5.1. Tinciones**

Para la evaluación cualitativa de la bioacumulación de PHA se tiñieron los cultivos con el colorante lipofílico Sudan Black, observándose en caso de acumulación gránulos intracitoplasmáticos de polímero teñidos de color azul intenso y el resto del citoplasma rosado. Se siguió el protocolo:

1. Se prepara un extendido en un portaobjetos
2. Se tiñe con Sudan Black entre 15 y 30 minutos (determinar experimentalmente)
3. Se elimina el colorante y se lava 3 veces con xilol
4. Se deja secar y se tiñe con el colorante de contraste fucsina
5. Se lava con agua y se seca bajo corriente de aire caliente

También se efectuaron tinciones con el colorante Azul de Nilo, observándose en un microscopio iluminado por una fuente de luz a 466 nm (se observó fluorescencia anaranjada de los gránulos teñidos de PHA). El procedimiento es el siguiente:

1. Se prepara un extendido en un portaobjetos
2. Se sumerge en jarros Coplin 10 minutos a 55°C
3. Se lava con agua
4. Se lava con ácido acético al 8% durante 60 segundos y se deja secar

### **5.2. Determinación de PHB (espectrofotométrico)**

Se realizó midiendo la absorbancia a 235 nm del ácido crotónico formado por deshidratación del PHB con ácido sulfúrico concentrado (Slepecky y Law, 1961).

**Solución patrón:** Pesar 1 mg de PHB (Sigma Co., USA) y llevar a 10 ml con cloroformo (1 mg/ml)

- Agregar 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ l. de la solución patrón en tubos de ensayo grandes.
- Agregar 2.5 ml de ácido sulfúrico 100%.
- Calentar 10 minutos en baño de agua hirviente.
- Efectuar un barrido espectral desde 300 a 200 nm, determinando la absorbancia a 235 nm.

**Tratamiento extractivo previo:**

- Centrifugar 5 ml de cultivo.
- Lavar el pellet con solución fisiológica.
- Extraer 1 hora con 1-2 ml de  $\text{CHCl}_3$  (de acuerdo al peso del pellet)
- Tomar 250  $\mu$ l de extracto y evaporar en los tubos de ensayo, previo al agregado de ácido sulfúrico.
- Leer la absorbancia a 235 nm.

### **5.2.1. Validez del ensayo espectrofotométrico**

Para la determinación espectrofotométrica del PHB se hace uso de la absorción en el ultravioleta de su producto de deshidratación con ácido sulfúrico concentrado: el ácido crotónico (Materiales y Métodos). Se probó que el ácido crotónico es estable hasta 24 h de finalizada la reacción, dado que la lectura de densidad óptica a 235 nm fue constante. La correlación obtenida entre masa de PHB y densidad óptica a 235nm (promedio de diez curvas de calibración) fue:

$$m_{\text{PHB}} (\mu\text{g}) = 0.0322 (\text{OD}_{235\text{nm}})$$

### **5.3. Determinación de PHB (por cromatografía gaseosa)**

Para la determinación cuantitativa por cromatografía gaseosa de PHB se convirtieron previamente los biopoliésteres en derivados volátiles (derivatización):

Derivatización: Células enteras liofilizadas provenientes de 3 ml de cultivo se hicieron reaccionar con 1 ml de cloroformo más 1 ml de una mezcla metanol: ácido sulfúrico concentrado 85:15. Luego se calentó a 100°C durante 140 minutos (Braunegg et al., 1978). Se utilizaron tubos Pyrex de cierre hermético con tapa a rosca y sello de Teflón. Luego se agregaron 0.5 ml de agua bidestilada y se aguardó a la separación de las fases. Se inyectaron 3 µl de la fase orgánica inferior en un cromatógrafo de gases (Gow-Mac Series 7850, Irlanda) con detector FID y una columna con Reoplex 400 como fase líquida y Chromosorb 80/100 como fase estacionaria. El gas carrier fue N<sub>2</sub> a 30 psi y las corridas fueron efectuadas isotérmicamente a 150°C. La temperatura del inyector se fijó en 180°C, y la del detector en 210°C.

Los cromatogramas fueron registrados por medio de un integrador Hewlett-Packard 3395.

### **5.3.1. Identificación de los picos presentes en los cromatogramas de gases por medio de espectrometría de masa**

Los picos cromatográficos aparecidos con el equipo Gow-Mac fueron analizados por GC/MS (cromatografía gaseosa asociada a espectrometría de masa) en las siguientes condiciones:

GC: columna de Supelco 2330 de 0.25 mm de diámetro interno y 30 m de largo.

Condiciones de corrida: Temperatura de inyección: 235°C, Temperatura de columna programada: T<sub>i</sub> = 60°C, luego aumentó 8°C/min hasta 230°C.

Gas carrier: N<sub>2</sub> a 69 kPa.

Los metil ésteres fueron detectados a medida que salieron de la columna por ionización por impacto electrónico a 70 eV y el espectrograma de masas obtenido se comparó con los patrones de PHB y de sacarosa.

### **5.4. Determinación de glucosa (enzimático, oxidasa-peroxidasa)**

La glucosa remanente en el medio de cultivo fue determinada por un método enzimático con formación de un compuesto rojizo medido a 505 nm (Wiener Lab., Rosario, Argentina, Henry et al. 1974).

Procedimiento:

- Preparar el reactivo agregando 5 ml de reactivo fenol y 5 ml de reactivo 4-AF. Llevar a 100 ml con agua destilada y agregar 300 µl de enzimas.
- Agregar 20 µl de muestra y 2 ml de reactivo.
- Incubar 10 minutos a 37°C y leer la absorbancia a 505 nm.

Curva patrón:

Pesar 0.1 g de glucosa y llevar a 100 ml en matraz aforado (sc.1)

Llevar 75 ml de sc.1 a 100 ml en matraz aforado (sc.2)

Llevar 66.7 ml de sc.2 a 100 ml en matraz aforado (sc.3)

Llevar 50 ml de sc.3 a 100 ml en matraz aforado (sc.4)

Glucosa (%) sc.1: 0.1; sc.2: 0.075; sc.3: 0.05; sc.4: 0.025.

### **5.5. Determinación de sacarosa**

Fue determinada utilizando un refractómetro manual Abbe, para el rango de concentraciones de hasta 50%. No se requirió precisión adicional ya que en la melaza la concentración de sacarosa fue mayor a 20%. Se colocó una gota de muestra a analizar entre el prisma y la tapa del aparato y se midió en la escala del ocular la concentración de sacarosa (%).

### **5.6. Determinación de biomasa**

La biomasa bacteriana fue monitoreada en los cultivos por medidas de densidad óptica a 610 nm en un espectrofotómetro de doble haz Gilford Response II.

Peso seco: El peso seco fue determinado por pesada de la biomasa liofilizada proveniente de 2 a 10 ml de medio de cultivo centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos y lavado con solución fisiológica.

### 5.7. Determinación de fosfato

El fosfato inorgánico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) fue determinado por formación de un compuesto azulado con fosfomolibdato de amonio, medido a 660 nm (Tausky y Shor 1953).

Procedimiento:

-Preparar el reactivo agregando 4 ml de molibdato de amonio 10% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. a 2 g de sulfato ferroso heptahidratado. Llevar a 10 ml con agua destilada.

-Agregar 175  $\mu\text{l}$  de reactivo a 1 ml de sobrenadante. Incubar 2 minutos a  $30^\circ\text{C}$  y leer a 660 nm.

Curva patrón:

Preparar una solución (Sc) de 440 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 100 ml de agua destilada. Diluirla 1:100.

tubo	reactivo (ml)	$\text{H}_2\text{O}$ (ml)	Sc (ml)	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
B	1	0	0.175	0
1	0.8	0.2	“	8.8
2	0.6	0.4	“	17.6
3	0.4	0.6	“	26.4
4	0.2	0.8	“	35.2
5	0	1	“	44.0

Blanco (B): 1 ml agua destilada

### 5.8. Determinación de amonio (método del nitroprusiato)

El amonio fue determinado por reacción con el reactivo de fenol y nitroprusiato, cuantificando espectrofotométricamente el color verde producido a una longitud de onda de 635 nm.

Procedimiento:

-Agregar 1 ml de muestra, 0.4 ml de reactivo fenol y 0.6 ml de reactivo hipoclorito.

-Dejar 45 minutos a temperatura ambiente y leer a 635 nm.

Curva patrón:

tubo	H <sub>2</sub> O (ul)	sn.std. (μl)	N (mg/l)
B	1000	0	0
1	800	200	0.2
2	600	400	0.4
3	400	600	0.6
4	200	800	0.8
5	0	1000	1

Sn. stock: 0.472 g de sulfato de amonio en 1 l. de agua destilada (0.1 g de N/l)

Sn. std: 1 mg N/l (1 ml de sn. stock a 100 ml)

Buffer: Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, Citrato de sodio 3 g, EDTA sódico 0.3 g. V final: 100 ml, pH=12

Reactivo fenol: 6 g de fenol en buffer, luego agregar 20 mg de nitroprusiato de sodio y llevar a 100 ml con buffer (pH=9).

Reactivo hipoclorito: hipoclorito en NaOH 1N (conc. cloruro 0.08-0.11%)

### 5.9. Determinación de sodio y potasio

El contenido de sodio y potasio fue determinado por fotometría de llama.

### 5.10. Determinación de exopolisacáridos (EPS)

Los EPS fueron determinados gravimétricamente a partir del sobrenadante del cultivo (Gerhardt 1994).

Procedimiento:

- Se tomaron 45 ml de sobrenadante y se les agregó 0.05 g de NaCl
- Se precipitaron los EPS con 200 ml de acetona dejando overnight a 4°C.
- Se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos.
- Se dializó overnight a 4°C contra agua destilada.
- Se liofilizó y se peso el EPS obtenido.

### 5.11. Determinación del peso molecular relativo ( $M_r$ ) del PHB

Por viscosimetría: El peso molecular relativo promedio fue determinado por viscosimetría utilizando un viscosímetro de Ostwald, midiendo con un cronómetro a la décima de segundo el tiempo en que una solución clorofórmica de PHB atraviesa dos enrasas del bulbo del viscosímetro respecto del solvente puro (viscosidad relativa,  $\eta_{rel}$ ), termostaticado a 30°C. Las medidas se realizaron por quintuplicado y se interpoló luego en la ecuación de Mark-Houwink, utilizando constantes bibliográficas (Akita et al., 1976):

$$[\eta] = k M_v^a \quad (1)$$

donde  $k = 1.9 \times 10^{-2}$  y  $a = 0.78$

Para el cálculo del  $M_v$  se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp} / c = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{rel} - 1) / c \quad (2)$$

Por lo tanto, el  $M_v$  se obtuvo a partir de (1), previo cálculo de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  de las fórmulas indicadas en (2).

Por cromatografía de permeación de geles: Se inyectaron soluciones clorofórmicas de PHB en un cromatógrafo líquido LKB Bromma 2249 con 5 columnas en serie con relleno de Ultrastyrigel, de diámetro de poro de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  Å. Se detectó el polímero por detector de infrarrojo fijado a  $5.75 \mu\text{m}$ . La velocidad de flujo del solvente (cloroformo, Merck Química Arg.) fue de 0.5 ml/min. El pico de PHB se obtuvo representado en un integrador por medio de un programa de computadora.

## **6. Determinaciones de estructura y constantes físicas de PHB**

### **6.1. Determinación de grupos funcionales presentes en el producto obtenido por medio de un espectro de absorción infrarroja (FT-IR)**

El espectro infrarrojo se realizó en Centro de Investigaciones Científico-Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA), sobre una película de PHB, utilizando transformada de Fourier. El barrido espectral se realizó entre  $500$  y  $4000 \text{ cm}^{-1}$ .

### **6.2. Análisis de la estructura del producto por medio de espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ( $^1\text{H}$ -RMN) y carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN)**

Para la determinación del tipo de hidrógenos presentes en el producto obtenido se realizó un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en las siguientes condiciones: solvente: cloroformo deuterado, frecuencia: 100 Mhz, velocidad de spin: 30 rps y n° de transientes  $30(\times 10^3)$ .

El tipo de carbonos distintos fue elucidado por medio de un espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN. Se realizó a una frecuencia de 80 Mhz, barriendo un total de 4000 Mhz de frecuencia. El n° de transientes fue de 25.000, mientras que el tiempo de relajación fue de 2 segundos.

Los espectros fueron realizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

### **6.3. Determinaciones por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Fueron efectuadas calorimetrías de barrido sobre muestras de PHB con el fin de determinar temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_f$ ) y la temperatura de descomposición ( $T_d$ ) y el porcentaje de cristalinidad. La técnica consiste en determinar la temperatura a la cual se producen los cambios de entalpía (de transición vítrea, fusión o descomposición,  $\Delta H_g$ ,  $\Delta H_f$  o  $\Delta H_d$ , respectivamente) experimentados por la muestra cuando es sometida a un barrido de temperaturas (-60 a 250°C).

Los espectros de DSC fueron realizados en un calorímetro Mettler TA 9000, entre -60 y 250°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Primeramente se calentó en el rango de temperaturas indicado y luego se enfrió el PHB fundido (“quenching”) hasta -60°C a 100°C/min. Por último se realizó el segundo barrido de -60 hasta 250°C a 10°C/min. Esto debe hacerse porque en el primer barrido no es posible determinar el pico de  $T_g$ , mientras que si puede hacerse en el segundo barrido de temperaturas, ya que el primer barrido borra la historia o memoria térmica del PHB. Luego durante el quenching el polímero se reordena y estructura de manera que al calentarlo nuevamente evidencia la temperatura en la cual comienza a fluir ( $T_g$ ).

Los estudios se realizaron con el calorímetro perteneciente al Centro de Tecnología para la Industria Plástica, CITIP, del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

#### **6.4. Determinaciones por termogravimetría (TGA)**

La estabilidad térmica del PHB obtenido se determinó midiendo la pérdida de masa en función de la temperatura creciente. Esto permitió obtener la curva de estabilidad térmica, de gran utilidad para establecer los rangos y condiciones de procesabilidad.

Las termogravimetrías (TG) se efectuaron en un aparato Mettler TA 9900, barriendo temperaturas desde 25 hasta 800°C a 10°C/min, a un flujo de nitrógeno de 200 ml/min. (Laboratorio de Polímeros de la Universidad de Pisa, Italia). Otros efectuados en el CITIP, INTI se realizaron en las mismas condiciones en una termobalanza Mettler TG 50.

#### **6.5. Determinación de la tensión de ruptura y módulo de Young**

La tensión y extensión a la cual se produjo la ruptura de probetas de PHB fue medida determinando la fuerza aplicada al material en función del estiramiento producido. Se utilizó un tensiómetro Instron 1122, a una velocidad de estiramiento de 1 mm/min. Los datos fueron procesados con un paquete de software. La probeta de PHB fue confeccionada conforme a la norma ASTM D 1708-84. Esta es colocada y ajustada por medio de broches a los extremos del tensiómetro. Luego se aplicó una fuerza por extensión a la muestra hasta el momento en que el material cedió y se fracturó.

Las medidas se efectuaron en el Laboratorio de Propiedades Mecánicas, CONEA, Sede Constituyentes.

#### **6.6. Determinación de cristalinidad**

Se realizó un espectro de difracción de rayos X para determinar la cristalinidad de una muestra de PHB proveniente de una de las fermentaciones realizadas, en un difractómetro de rayos X provisto con lámpara de cobre a 40 KV y 30 MA. La longitud de los rayos X incidentes fue de 1.5406 Å.

La muestra fue molida en un mortero de ágata y se dispuso en un marco que se insertó en la cámara del difractómetro. Por medio de un integrador se calculó la radiación dispersada para cada ángulo incidente del haz de rayos X. De Tablas se obtuvieron los valores  $2\theta$ , de los cuales se obtuvieron distancias intramoleculares a partir de la ley de Bragg:

$$2d\sin\theta=n\lambda$$

donde  $d$  es una distancia intramolecular propia de la estructura del PHB,  $\theta$  es el ángulo de incidencia del haz de rayos X y  $n\lambda$  representa un número entero de longitudes de onda de los rayos X.

Este estudio fue efectuado en el Laboratorio de Rayos X de la Facultad de Ingeniería, UBA.

## 6.7. Análisis termomecánico (TMA)

Se utilizó un aparato Mettler TA 3000 y consistió en aplicar una presión continua a una frecuencia constante por medio de una barra o punzón a una película de PHB en función de un barrido de temperaturas, desde -10 a 170°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se realizó en el CITIP del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

## 7. Determinaciones enzimáticas

### 7.1. Preparación del extracto crudo

En primer lugar se preparó el extracto crudo bacteriano centrifugando los cultivos de *Azotobacter* en una centrífuga Sorvall RC-5B refrigerada a 10.000 rpm durante 15 minutos, resuspendiendo el pellet por vortexeado, lavándolo con agua destilada, centrifugando nuevamente y resuspendiendo en 1 ml de buffer de reacción (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, DTT 1mM).

Las bacterias fueron rotas en un disruptor de células (Branson Co., USA) en recipientes adecuados bajo hielo para disipar el calor generado, utilizando un transmisor de ondas de punta ("horn"). Se efectuaron pulsos de 1 minuto, adecuando la amplitud experimentalmente. Luego las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm en frío y se pasó un volumen de sobrenadante a tubos de hemólisis, donde se prosiguió con el protocolo de medición.

### 7.2. Medición de la actividad de la acetoacetyl-CoA reductasa (biosíntesis)

El ensayo se realizó a 30°C en un volumen total de 0.5 ml y se determinó el descenso de la absorbancia a 340 o 365 nm.

Tris/HCl 100 mM (pH=7.8)	480 µl
NADPH 25 mM	2.5 µl
Extracto crudo	10 µl

La reacción se inició con el agregado de 6 µl de acetoacetyl-CoA 2.5 mM. Se calcularon luego las unidades enzimáticas como se indicó arriba.

### **7.3. Actividad 3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa (3-HBDH) (degradación)**

Se determinó el aumento de OD a 340 nm del NADH formado al oxidarse el sustrato 3-hidroxiacetylato a acetoacetylato.

La mezcla de reacción posee los siguientes componentes:

3-hidroxiacetylato	2 mg/ml	0.05 ml
extracto crudo		0.1 ml
NAD	5 mg/ml	0.2 ml
Buffer Tris pH=8		1.00 ml

### **7.4. Medición de proteínas en extracto crudo**

Se midieron proteínas utilizando el método de Bradford, agregando 2.5 ml del colorante (Bio-rad, USA) a 1 ml de muestra extraída overnight con 1 ml de hidróxido de potasio 10N y midiendo la densidad óptica a 595 nm.

## **8. Técnicas especiales para aplicaciones del PHB**

### **8.1. Peleteado de semillas de alfalfa con PHB ocluyendo *Rhizobium meliloti* B36**

#### **8.1.1. Procedimiento de peleteado:**

- Se sumergieron 10 minutos las semillas en un caldo de cultivo de *Rhizobium meliloti* B36 con  $10^9$  UFC/ml
- A continuación se mezclaron las semillas con un extracto clorofórmico de PHB durante 3 minutos y se eliminó el solvente por evaporación rápida con aire caliente a 45°C.

8.1.2. Procedimiento para la observación de semillas y bacterias por microscopía electrónica:

- Fijado de las semillas con glutaraldehído 3% durante 3 horas.
- Lavado con solución fisiológica durante 1 hora
- Deshidratación con un gradiente de acetona 25, 50, 75, 80, 95 y 100%, cada solución durante 5 minutos
- Finalmente se observó en un microscopio electrónico (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Morón) a 5000X.

## **8.2. Ensayo de actividad de enzimas celulolíticas libres y microencapsuladas en películas de PHB**

Se determinó la actividad enzimática de celulasa libre (Carolina Biological Co., USA) y microencapsulada ensayando la actividad celulolítica sobre celulosa microcristalina (Avicel), y determinando la glucosa liberada por el método enzimático descrito más arriba.

### **8.2.1. Medición de la actividad de la enzima celulasa (Leisola y Linko, 1976)**

- Se preparó suspensión de Avicel al 1 % en buffer de acetato de sodio 0,1 M de pH 4,8.
- Se incubó la mezcla de reacción durante 2 h a 28°C con 1 ml de la suspensión y diferentes concentraciones de celulasa.
- Se centrifugaron las muestras a 30.000 g durante 1 min.
- Se tomaron 0,5 ml de sobrenadante y se determinó la concentración de glucosa.

La actividad se expresó como mg de glucosa liberada por ml de sobrenadante de la reacción, o como actividad específica.

### **8.2.2. Microencapsulado de celulasa en PHB**

- Se tomaron diferentes cantidades (4, 6, 8 mg) de PHB de diferente peso molecular y se disolvieron en 1 ml de cloroformo a temperatura ambiente.

- En cada una de ellas se agregaron 0,5 mg de celulasa y se agitó suavemente hasta emulsionar.
- Se dejó en contacto la enzima y el extracto de PHB durante 5, 10 y 15 min.
- Se evaporó rápidamente el cloroformo remanente utilizando una bomba de vacío.

#### 8.2.3. Determinación del porcentaje de proteína retenida

-Se tomaron 100  $\mu$ l del sobrenadante remanente luego de poner en contacto la celulasa y el PHB y se determinó la concentración de proteína (por el método de Bradford). El valor obtenido indica la cantidad de proteína no retenida por el PHB.

Como testigo se determinó por el mismo método la proteína presente en una solución de 0,5 mg de celulasa sin microencapsular, resuspendida en 1 ml de agua destilada. La proteína retenida en cada ensayo se expresó como porcentaje del total utilizado para microencapsular.

#### 8.2.4. Actividad de la celulasa microencapsulada

Sobre el pellet con la enzima microencapsulada se agregó 1 ml de la suspensión de Avicel 1 % en buffer de acetato de sodio a pH 4,8 y se siguió el mismo protocolo que en el resto de los ensayos de actividad de celulasa.

### **8.3. Verificación del crecimiento de células animales (keratinocitos) sobre un soporte de PHB**

-Se obtuvo una película de PHB en la base de una placa de Petri por evaporación (“casting”) de un extracto clorofórmico de PHB.

-Sobre las cajas con la película de PHB se agregó medio líquido para el cultivo de los keratinocitos y se incubó en estufa termostaticada a 37°C.

-Luego de 72 h se observó al microscopio óptico (1000X) con el objetivo de verificar cuando las células llegan a confluencia.

## IV. RESULTADOS

---

### 1. Aislamiento de cepas de *Azotobacter* sp.

#### **1.1. Métodos de enriquecimiento para *Azotobacter* sp. Screening por tinciones de los aislamientos.**

*Azotobacter* sp. representa el grupo principal de bacterias libre fijadoras de nitrógeno atmosférico. Estas bacterias fueron aisladas por primera vez a comienzos de siglo (Beijerinck 1901). La especie *A. chroococcum* se encuentra en suelos neutros o alcalinos. Microscópicamente se encuentra como bacilos cortos más bien redondeados, y frecuentemente de a pares. En todas las especies de *Azotobacter* el tamaño y forma celular es muy variable, dependiendo de la edad y condiciones de cultivo. En fase estacionaria temprana los cultivos comienzan a formar estructuras de resistencia llamadas cistos. Estos contienen en su parte central una célula bacteriana, cubierta por una capa multilamelar doble (Vela y Rosenthal, 1970, Sillman y Casida 1985).

Cuando se cultiva en medio sólido, *A. chroococcum* forma colonias blanquecinas, de aspecto cremoso, que se oscurecen a tiempos largos de cultivo, debido a la formación del pigmento melanina.

Para el aislamiento de *Azotobacter chroococcum* se enriquecieron en primer lugar muestras de suelos de diverso origen: Campus de la Facultad de Agronomía, UBA, Carlos Casares (Provincia. de Buenos Aires) y Comodoro Rivadavia Km 9 (Chubut) por medio de tres métodos (Allen 1954, Gerhardt 1994):

- a) método de suelo empastado,
- b) método de superfosfato,
- c) método térmico.

El método a) consiste en humedecer muestras de suelos hasta un 75% de su capacidad de campo con solución de glucosa (1% p/v) para favorecer el desarrollo de

microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico. Dado que las características culturales de las colonias de *Azotobacter* sp. son muy particulares (mucosas, blanquecinas, irregulares, de 3 a 6 mm de diámetro a los 7 días de incubación a 30°C) fue posible distinguirlas de otros fijadores libres de nitrógeno (*Beijerinckia* y *Derxia* sp.) y continuar así con el protocolo de aislamiento por repiques sucesivos en cajas de Petri utilizando el medio de Burk agarizado (ver Materiales y Métodos). Se comparó con suelos preinoculados con una cepa patrón de *Azotobacter chroococcum*. Se observó al microscopio óptico (aumento 1500x) colonias de cajas de *Azotobacter chroococcum* de más de 24 horas de incubación, observando formas esféricas y mayoritariamente de a pares (Krieg y Holt, 1984).

En el método b) se toma ventaja de la característica de *Azotobacter* sp. de crecer en forma radial alrededor de un gránulo de superfosfato triple colocado sobre la superficie de una muestra de suelo deficiente en nitrógeno en cajas de Petri. Se observó un halo blanquecino alrededor del gránulo, luego de 48 horas de incubación a 30°C. Posteriormente se continuó con el procedimiento standar de repique para purificación descrito anteriormente.

Por último en el método térmico se sometieron las muestras de suelos a tres ciclos de calentamiento a 40°C de 40 minutos cada uno, dejando las muestras a temperatura ambiente durante otras 24 horas entre los ciclos. El objetivo fue el de enriquecer las muestras en formas de resistencia típicas de *Azotobacter* sp. llamadas cistos. Estas formas tienen mayor resistencia a la desecación que las células vegetativas si bien no alcanzan a tener las características de una spora bacteriana. Luego se tomó una alícuota de cada muestra de suelo y se repicó a cajas de Petri con medio de sílica gel (Materiales y Métodos) y se continuó con el protocolo de aislamiento y purificación standar.

De esta manera se aislaron y purificaron inicialmente diez cepas de *Azotobacter* sp., teniendo como criterio preliminar de diferenciación de las cepas sus características culturales en medio sólido. *A. chroococcum* puede ser identificada dentro del género *Azotobacter* en forma presuntiva por su característica única mencionada anteriormente

de producir el pigmento melanina a más de 48 horas de incubación, lo que confiere a las colonias una coloración amarronada.

Sobre cada una de las diez cepas purificadas se realizaron tinciones con los colorantes Sudán Black B y Azul de Nilo para detectar la presencia de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) (Materiales y Métodos).

Se observó acumulación de PHB a 48 h en tres de ellas, denominadas: CR, 6B y 1C. La cepa CR fue aislada de una muestra de suelo empetroado de Comodoro Rivadavia, Chubut, provista por la Estación Experimental del INTA de Trelew. Las cepas 6B y 1C fueron aisladas de muestras de suelo rizosférico del campus de la Facultad de Agronomía, UBA y de Carlos Casares, respectivamente. Por último *Azotobacter chroococcum* cepas 6B, 1C y CR fueron incluidas en la colección de cultivos de la Facultad de Agronomía, UBA (WDC307).

## 1.2. Caracterización morfofisiológica del aislamiento seleccionado

El aislamiento 6B fue caracterizado por medio de sus características morfofisiológicas y de pruebas bioquímicas para identificar la cepa y descartar la posibilidad de que se trate de especies relacionadas dentro del género, como *A. beijerinckii* o *A. vinelandii* (Krieg y Holt 1984, Stockdale 1968).

En la Tabla N° 1 se indican algunas características morfofisiológicas de la cepa 6B. La bacteria aislada es gram (-), muestra pleomorfismo al microscopio de contraste de fase, variando la morfología desde cocos (usualmente de a pares) hasta bacilos cortos. En cultivos en medio de Burk con glucosa al 1% sin nitrógeno se observó la producción de pigmentos difusibles de color marrón luego de tres días de incubación. La cepa fija nitrógeno atmosférico y se consideró no proteolítica, dado que la peptona es utilizada sólo para sostener un crecimiento mínimo. La producción de ácidos se manifestó por el viraje del indicador rojo de metilo al crecer la cepa en el medio de Burk con glucosa y sacarosa como fuente de carbono. En el mismo medio con glucosa y sales minerales sin nitrógeno produce colonias de color blancuzco amarronado, viscosas y mucosas, debido a la abundante producción de polisacárido. Las colonias tienen un tamaño variable, entre

3 y 8 mm. luego de 7 días de incubación a 30°C. A mayor tiempo de incubación se vuelven marrones y menos mucosas. Todas estas características determinan su clasificación dentro del género *Azotobacter* especie *chroococcum*, por contraste con el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Quagliano y Miyazaki, 1994).

Características morfológicas y bioquímicas de la cepa 6B	
Movilidad aparente	+
Pleomorfismo	+
Presencia de cistos	+
Catalasa	+
Pigmentos insolubles en agua	+
Fijación de N <sub>2</sub> atmosférico	+
Proteolítico	
Producción de ácidos	+
pH óptimo	7-7.5
Crecimiento en NaF 0.01M	
Crecimiento en fenol 0.05%	+
Temperatura óptima (°C)	30
Producción de sulfuro de hidrógeno (a partir de cisteína y tiosulfato de sodio)	-

Tabla N°1. Características morfofisiológicas y bioquímicas de la cepa 6B.

En todos los ensayos se utilizó el medio de Burk con glucosa al 1% (Materiales y Métodos) con los compuestos en las concentraciones indicadas

Se determinó el perfil de resistencia a varios antibióticos, utilizando antibiogramas, con fines de caracterización. Se indica en la Tabla N° 2 el perfil de resistencia, comparado con el de una cepa patrón (*Azotobacter vinelandii* CCM 240). Se observó que existe un patrón similar de resistencias, salvo con gentamicina 10 µg.

Antibiótico (mg/disco)	<i>Azotobacter</i> 6B	<i>Azotobacter vinelandii</i>
cloramfenicol (10)	R	R
cloramfenicol (30)	R	R
Gentamicina (10)	R	S
Colicistina (10)	R	R
Ampicilina (10)	S	S
Neomicina (30)	S	S
Ciprofloxacina (5)	S	S
Neomicina (10)	MS	S
Trimetoprima (25) + Sulfametoxazol (75)	S	S
Furazolidona (100)	S	S

Tabla N°2. Resistencia a antibióticos de la cepa 6B utilizando antibiogramas

Medio de Winogradsky con glucosa al 1%. R: resistente MS: moderadamente sensible S: sensible

En la Tabla N° 3 se caracterizó la cepa en cuanto a su utilización de fuentes de carbono, concluyéndose que posee una gran versatilidad en cuanto a la utilización de diferentes compuestos carbonados.

Para evaluar la acumulación del biopolímero PHB, la cepa fue crecida en condiciones de estrés nutricional (deficiente en nitrógeno) en erlenmeyers agitados a 220 rpm y 30°C con 50 ml. de medio de Burk con glucosa 1% (ver Materiales y Métodos). Se verificó la acumulación de PHB, junto con un alto crecimiento en biomasa (2.5 g/l). Se obtuvo una concentración de PHB de 0.8 mg/ml. de cultivo (medido espectrofotométricamente, Materiales y Métodos).

Fuentes de carbono	OD 610nm
Glucosa	2.5
Sacarosa	2.4
Ramnosa	1.5
Lactato	0.9
Glicerol	0.9
Manitol	1.5
Etanol	0.5
Piruvato sódico	1.2
Gluconato sódico	1.2
Propionato sódico	1.1
Acetato sódico	0.35
Galactosa	0.35
Maltosa	0.45
Rafinosa	1.1

Medio de Burk con glucosa al 1% descrito en Materiales y Métodos; fuentes de carbono al 1%, Temperatura de cultivo=30°C; OD medida a 610nm y 72 h de cultivo.

Tabla N°3. Utilización de fuentes de carbono por las cepas 6B, 1C y CR.

## 2. Producción de PHB a partir de *Azotobacter chroococcum*. Estudios en erlenmeyers en agitador rotatorio

### 2.1.1. Obtención de PHB utilizando tres cepas de *A. chroococcum*

En las tres cepas aisladas anteriormente se cuantificó el PHB acumulado intracelularmente por cultivo en medio de Burk usando erlenmeyers agitados.

Con la cepa 1C se obtuvo un contenido de PHB relativo al peso seco bacteriano ( $X_{\text{PHB}}$ ) máximo de 41% del peso seco a las 48 h. Al llegar a 72 horas se observó una disminución en la acumulación de PHB hasta un 25%, en ese momento el contenido final de biomasa ( $X$ ) fue de 3 g/l, y correspondió a una densidad óptica a 610nm de 1,5.

Con la cepa denominada CR el  $X_{\text{PHB}}$  máximo fue de 35% a 48 horas. Con la cepa 6B, también a 48 horas de cultivo,  $X_{\text{PHB}}$  fue de 55%, mientras que a 24 h fue de un 20%. Cuando se agregó sulfato de amonio a una concentración final de 0.1 g/l en el medio de Burk, no hubo acumulación de PHB con ninguna de las tres cepas. Los contenidos de PHB fueron determinados por cromatografía gaseosa (ver Materiales y Métodos). En los cromatogramas obtenidos en todos los casos solamente se encontró el pico correspondiente al 3-hidroxibutirato de metilo, lo que indicó la acumulación exclusiva de poli-3-hidroxibutirato en las tres cepas. Los resultados se resumen en la Figura 1.

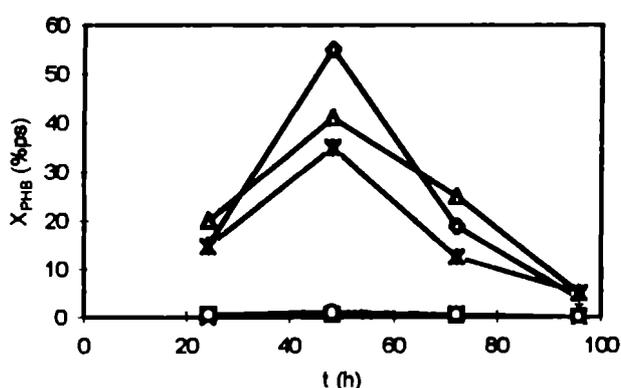


Figura 1: Contenido de PHB ( $X_{\text{PHB}}$ ) para las cepas de *A. chroococcum* 6B, 1C y CR sin amonio ( $\diamond$ ,  $\Delta$ ,  $\times$ ) y con 0.1 g/l de sulfato de amonio ( $o$ ,  $\square$ ,  $*$ ); respectivamente.

### **2.1.2. Estudio genético de las tres cepas aisladas originalmente de *Azotobacter chroococcum*.**

Para dilucidar si las variaciones en los contenidos de PHB pueden ser asociadas a alteraciones en los perfiles del material genético de las cepas se realizaron estudios comparativos de corridas electroforéticas del ADN. Se utilizó la técnica RAPD (random amplified polymorphic DNA). Esta técnica es una modificación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usada para obtener patrones de bandas característicos de genomas útiles para comparar cepas con fines de identificación y diferenciación (“genotyping”).

La técnica RAPD fue utilizada para determinar bandas características. A diferencia de la PCR convencional, no utiliza un par de primers sino un único primer, de manera tal que cada banda de amplificación observada resulta de un evento en que dicho primer se aparee a ambas hebras del ADN en dirección invertida y a una distancia de separación tal que permita a la enzima *Taq* completar la extensión del fragmento que se amplifica. La posibilidad de que esto ocurra depende del ADN a analizar.

Las diferencias observadas en los patrones de bandas para cada cepa (en términos de presencia o ausencia de bandas) se conocen como polimorfismos y refleja la existencia de variaciones genéticas. Otra diferencia con la PCR es que el primer usado es de una longitud de 10 bases (en lugar de aproximadamente 20 bases en PCR) lo que permite que el mismo pueda encontrar regiones complementarias con mayor probabilidad. Esto requiere que la temperatura de annealing también sea menor (30-40°C).

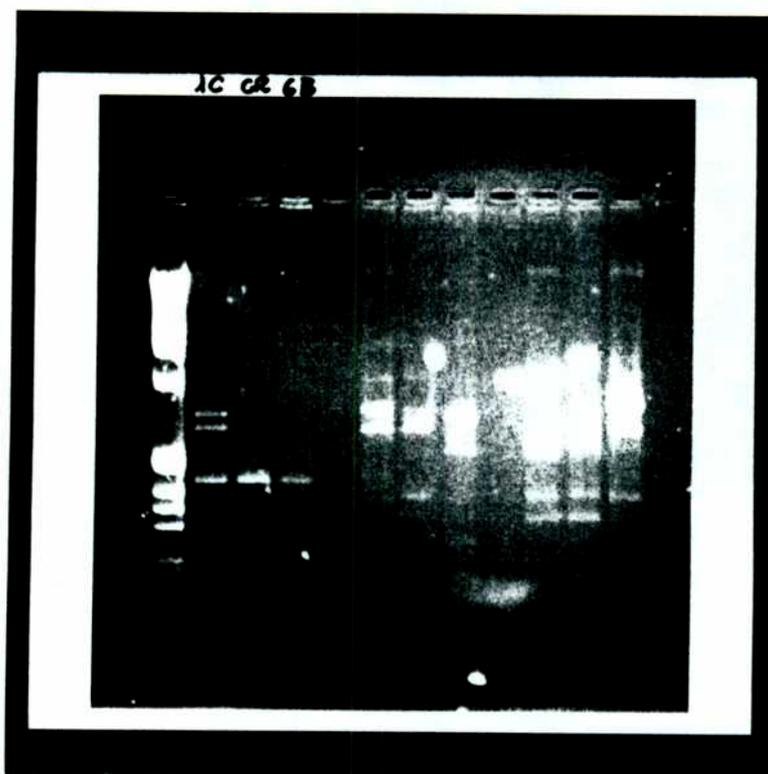


Figura 2: Perfiles de bandas de ADN amplificadas por medio de la técnica de RAPD de cepas de *Azotobacter chroococcum* aisladas. calle 1: cepa 1C, calle 2: cepa CR, calle 3: cepa 6B. Primer terna: primer OP 02, segunda terna: primer OP 04, tercer terna: primer OP 06.

Se observó en los perfiles la presencia de 3 bandas comunes con el primer OP 02 y el OP 06. La existencia de 2 bandas cercanas con el primer OP 02 y la cepa 1C estableció que es diferente a las otras dos. Adicionalmente, la ausencia de bandas comunes con el primer OP 04 confirmó que las tres cepas estudiadas son diferentes genéticamente. La asociación con acumulaciones relativas mayores o menores en el contenido de PHB requiere del estudio de primers específicos para los genes de la biosíntesis de PHB. Sin embargo, los resultados obtenidos son compatibles con la obtención de contenidos diferentes en un medio de cultivo idéntico para las tres cepas.

### 2.1.3. Cultivo en distintos medios

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: de Burk, de Winogradsky, de Brown y de manitol para el cultivo de la cepa 6B en erlenmeyers agitados a 220 rpm en las condiciones de cultivo descritas en Materiales y Métodos, obteniéndose un máximo contenido de 45% de PHB en el medio de Burk a 48 h de cultivo (Figura 2). En segundo lugar se obtuvo un  $X_{\text{PHB}}$  de 35% con el medio de Winogradsky a 48 h.

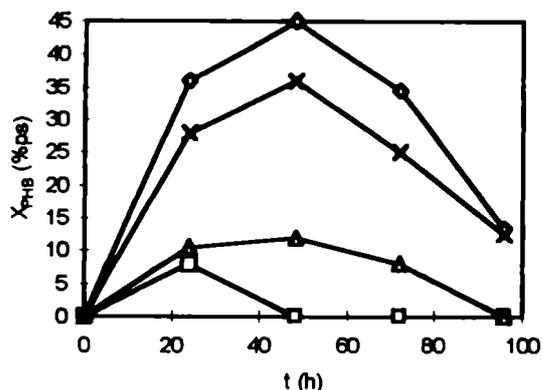


Figura 2: Acumulación de PHB en distintos medios de cultivo. ◇ : Burk, × : Winogradsky, △ : Brown, □ : manitol. (Los medios de Burk, Winogradsky y Brown llevan glucosa al 1%).

## **2.2. Optimización de la concentración de los componentes del medio basal de Burk**

Si bien muchos microorganismos pueden crecer sobre un medio compuesto por glucosa, amonio y sales minerales, este medio no siempre es adecuado para los fines de fermentación (Microbiología Industrial II, 1986). Originalmente, los microorganismos fueron cultivados en medios compuestos por extractos de origen vegetal o animal, que proveen de todos los nutrientes necesarios (componentes mayores C,H,O y N; menores como P, K, S y Mg; vitaminas y elementos traza). Sin embargo, tienen la desventaja de ser indefinidos y variables en composición. Para la obtención de un producto fermentativo en condiciones reproducibles, es necesario definir cuali y cuantitativamente los requerimientos nutricionales (Pirt 1975). El medio debe proveer la fuente de energía necesaria para la biosíntesis y para el mantenimiento celular (Wang 1979).

Adicionalmente, el medio debe ser estable, y sus componentes no deben reaccionar entre sí, particularmente durante la esterilización por autoclave.

Se utilizó en adelante la cepa 6B, que fue la que demostró mayor contenido y mejores características culturales en el medio basal de Burk con glucosa al 1% como fuente de carbono. Se obtuvieron las curvas de crecimiento, producción y los perfiles de consumo en erlenmeyers agitados al variar cada componente del medio basal de Burk, a fin de encontrar las concentraciones óptimas con relación a la obtención de PHB (evaluando biomasa, X (g/l), y contenido de PHB respecto del peso seco celular, X<sub>PHB</sub> (%peso seco)).

### **2.2.1. Fosfato**

El fosfato es requerido por las células para su incorporación a los ácidos nucleicos, fosfolípidos y componentes de la pared celular. *Azotobacter chroococcum* requiere altas concentraciones mínimas de fósforo. Cultivos crecidos con bajas concentraciones de fósforo tuvieron muy baja actividad respiratoria, seguida de una muerte celular masiva en pocas horas (Mulder y Botoronegoro 1974). La máxima producción de PHB (33%) se obtuvo con una concentración de 0.25 g/l de  $K_2HPO_4$  a 48 h de cultivo (Figura 3). Cuando la concentración se aumentó hasta 0.75 g/l contenido de PHB disminuyó hasta un 12%. Se verificó que el contenido de biomasa y el de PHB están inversamente relacionados, por lo que es conveniente la utilización de concentraciones de fosfato de 0.75-1 g/l de manera de obtener un contenido de biomasa elevada.

El fosfato fue completamente consumido entre 35 y 40 h de cultivo en los distintos cultivos ensayados.

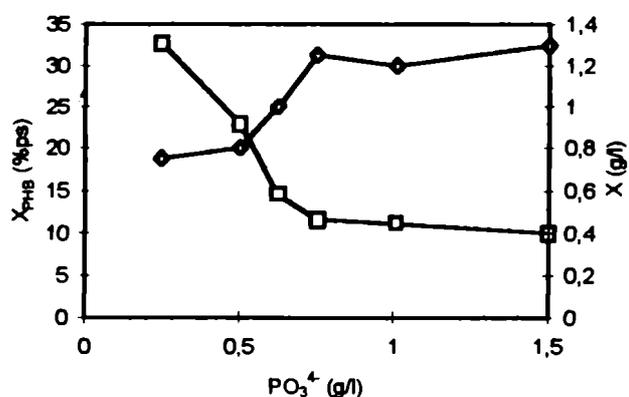


Figura 3: Efecto de la concentración de fosfato en el medio basal de Burk sobre la acumulación de PHB.  $\square$  :  $X_{PHB}$  (% peso seco),  $\diamond$  : peso seco (g/l).

### 2.2.2. Calcio

El calcio es a menudo esencial para el crecimiento de los microorganismos. El máximo contenido de PHB se obtuvo con una concentración de 0.11 g/l de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 24 h de cultivo (Figura 4). A concentraciones mayores no hubo aumento significativo en el contenido de PHB. En el sistema control sin calcio se obtuvo una biomasa de 0.45 g/l con un 6% de PHB. El calcio presente originalmente en el medio de cultivo con 0.11 g/l se consumió en un 37% a 24 h de cultivo.

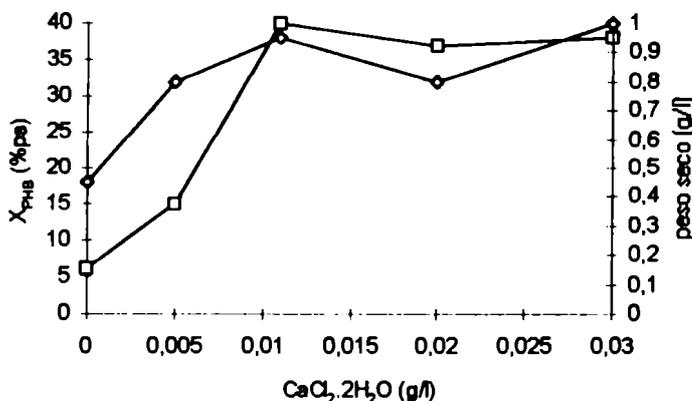


Figura 4: Contenido de PHB y biomasa a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en medio basal de Burk. □ :  $X_{\text{PHB}}$  (% peso seco), ◊ : peso seco (g/l)

Estos resultados confirman el conocimiento desde hace años del bajo requerimiento de calcio por parte de *Azotobacter* (de 1 a 4 ppm) (Mulder y Botoronegoro 1974). La cepa 6B requirió de aproximadamente 2 ppm para obtener alta biomasa y PHB.

### 2.2.3. Magnesio

El magnesio es cofactor en gran cantidad de reacciones enzimáticas y está también asociado a la formación de la pared celular (Pirt 1975, Andersen 1989). En muchos microorganismos se ha hallado una relación en el contenido de magnesio y ARN (Tempest 1969). En la Figura 5 se indica el efecto del magnesio sobre la producción de PHB, observándose que con 0.3 y 0.4 g/l de magnesio (como sulfato heptahidratado) se obtuvieron las acumulaciones máximas (12 y 11.5%), pero en menor tiempo de cultivo en este último caso (70 y 48 h, respectivamente). En general las curvas de máximo de PHB y tiempo de entrada en fase estacionaria tienen la misma tendencia.

Se observó además la producción de un pigmento soluble difusible al medio de cultivo, de color marrón. Este pigmento corresponde a melanina, característica propia de *Azotobacter chroococcum* al ser incubado durante tiempos prolongados. Se observó en el medio basal de Burk con 0.2 g/l de magnesio, a 72 horas de cultivo, manteniéndose hasta 96 horas en las condiciones ensayadas. Con 0.4 g/l, que es la concentración del medio basal, a 72 h, hubo también producción del pigmento en una concentración aproximadamente tres veces menor (determinado espectrofotométricamente por comparación con un patrón). Con 0.6 g/l de magnesio, también a 72 h, hubo pigmento detectable por el barrido espectral, visualmente los cultivos son blancuzcos sin evidencia aparente de producción de pigmentos. La biosíntesis de melanina se debe a la oxidación del aminoácido tirosina por la enzima tirosinasa, y subsecuente polimerización. La síntesis del pigmento depende de la presencia de cobre en el medio, fundamental para la actividad de la tirosinasa. Como el pigmento fue observado en forma no relacionada a alguna condición bioquímica o fermentativa, se supone que su producción puede asociarse con la presencia de cobre como impureza en alguno de los reactivos utilizados para la formulación del medio de cultivo.

El magnesio fue consumido en un 20% de la concentración inicial, en los cultivos con una concentración inicial de 0.4 g/l.

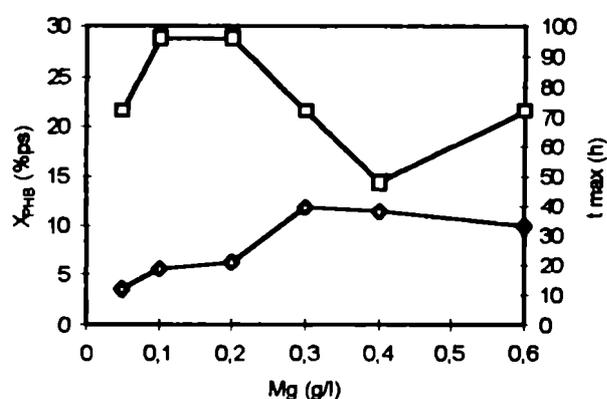


Figura 5: Efecto del magnesio en el medio basal de Burk sobre el contenido de PHB ( $\diamond$ ) y tiempo de cultivo al cual se produce el máximo de acumulación ( $\square$ )

#### 2.2.4. Hierro

Cuando se varió la concentración de hierro (como  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) entre 8 y 14 ppm, no se observó efecto sobre la acumulación de PHB. Asimismo la biomasa obtenida en cada caso no demostró diferencias significativas (medida como OD a 610nm). Se verificó un consumo completo del hierro (concentración inicial 0.012 g/l de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a las 24 h de cultivo.

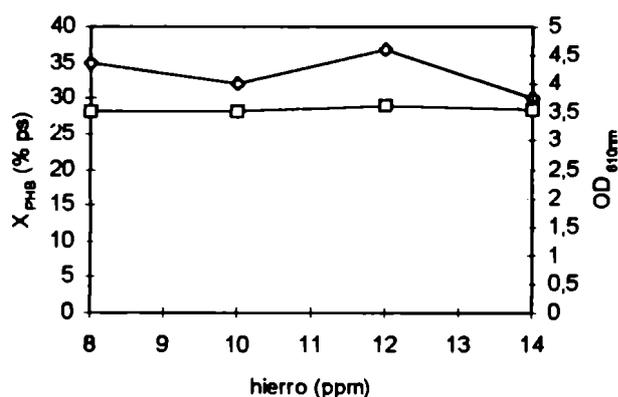


Figura 6 : Efecto de la concentración de hierro sobre la biosíntesis de PHB en el medio basal de Burk ( ● ) y la biomasa final ( □ )

### 2.2.5. Sodio y potasio

El sodio raramente ha sido señalado como esencial para el crecimiento, probablemente debido a la dificultad de obtener medios libres de sodio. El potasio funciona como coenzima y asociado a la estructura del ARN y otras estructuras aniónicas de las células. En el medio de Burk el sodio se encuentra como cloruro a una concentración de 0.1 g/l y el proveniente del agregado de molibdato de sodio, (0.01 g/l). El consumo de sodio no representó una fracción significativa de la cantidad inicial (25%, promedio de cuatro determinaciones). Cuando se aumentó en tres veces la concentración de sodio del medio basal de Burk no se encontró variación en el contenido de PHB a 48 h de cultivo (17 y 16.5%, respectivamente) ni tampoco en la velocidad de consumo de sodio o biomasa final.

El potasio en el medio basal de Burk proviene del agregado de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en una concentración de 1 g/l. El consumo de potasio fue de un 10% del inicialmente presente (0.45 g/l) (promedio de cuatro determinaciones). Al aumentarse seis veces su concentración en el medio basal tampoco se hallaron diferencias significativas en los contenidos celulares de PHB (17 y 21% respectivamente).

### 2.2.6. Fuentes de carbono

La fuente de carbono es uno de los principales componentes del medio de cultivo, ya que provee la energía necesaria para la biosíntesis y mantenimiento, a través de su oxidación controlada, y satisface el balance y requerimientos de carbono elemental en la célula. El carbono representa aproximadamente el 50% en peso de la composición elemental de un microorganismo (Crueger y Crueger 1985).

Se ensayaron diferentes fuentes simples de carbono (en erlenmeyers agitados) para evaluar las más adecuadas para la producción de PHB. La Tabla N° 4 muestra una serie de fuentes simples de carbono y el contenido máximo de PHB y tiempo en que fue alcanzado. De lo expuesto aquí se deduce que la glucosa y la sacarosa son los sustratos más adecuados para la síntesis de biomasa con alto contenido de PHB, utilizando la cepa 6B.

Fuente de carbono	n° de carbonos	X <sub>PHB max</sub> (%ops)	t <sub>máx</sub> (h)
glucosa	6	63.5	47
sacarosa	12	42	48
fructosa	6	15	48
lactato	3	0	
succinato	4	4	40
octanoato	8	0	
manitol	6	15	48
glicerol	3	0	-

todas las fuentes de carbono al 1%, excepto octanoato al 0.5%

Tabla N° 4: Fuentes de carbono en el medio basal de Burk y contenidos de PHB.

### 2.2.6.1. Efecto de la concentración de glucosa

Se probó el efecto de distintas concentraciones de glucosa en el medio basal de Burk. En la Figura 7 puede observarse que a medida que aumentó la concentración de glucosa aumentó también la bioacumulación desde 1 hasta 5%:

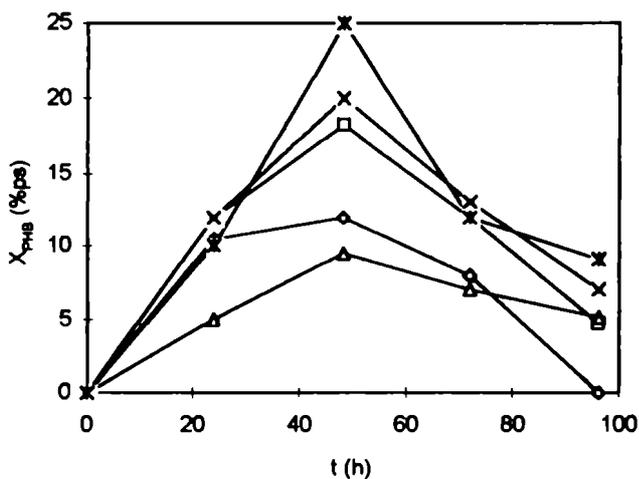


Figura 7: Contenidos de PHB a distintas concentraciones de glucosa en el medio Bm. ◇ : 1%, △ : 2%, □ : 3%, × : 4%, \* : 5%.

Las velocidades de crecimiento (unidades de OD/h) fue mayor cuando en los cultivos se reguló el pH a neutralidad

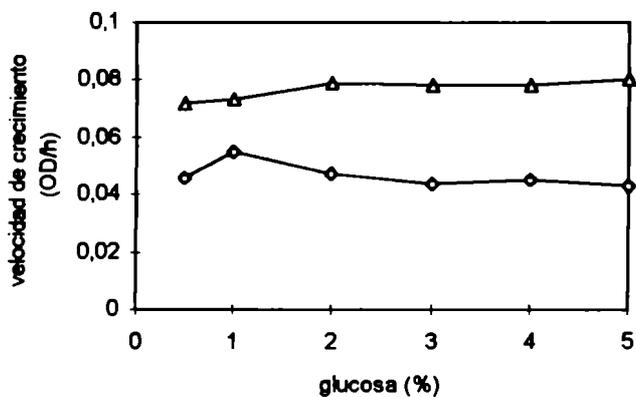


Figura 8 : Velocidades de crecimiento (OD/h) a distintas concentraciones de glucosa. ◇ : sin regulación de pH, △ con regulación de pH.

### 2.2.7. Fuentes del nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno pueden ser simples o complejas. Entre las primeras las más utilizadas son las sales de amonio, como sulfato, cloruro o nitrato, urea o amoníaco.

Fuentes complejas como vinazas (residuos de la destilación de mostos fermentados, ricas en proteínas, aminoácidos y factores de crecimiento), líquido de maceración o remojo del maíz (aprox 4-10% de N total) y tortas agotadas de cereales (residuos del prensado para la elaboración de aceites, que poseen proteínas), peptonas o extracto de levadura no son aprovechables como una fuente o sustrato principal en el caso de la producción de PHB, ya que interfieren con las condiciones de deficiencia nutricional necesaria para la bioacumulación (Anderson y Dawes 1990, Prescott 1950, Holmes 1985).

En la Tabla N° 6 se detallan las fuentes de nitrógeno ensayadas y los rendimientos de PHB a 48 horas de cultivo en erlenmeyers agitados a 220 rpm. En cuanto a las fuentes simples, se dedujo que el sulfato de amonio fue la fuente más adecuada para la biosíntesis de PHB con la cepa 6B, acidificando el medio (hasta pH 5-6). Esto es debido a que el amonio es incorporado dentro de la célula como  $R-NH_3^+$  donde R es el esqueleto carbonado. De esa manera, se libera  $H^+$  al medio, disminuyendo el pH. Las otras dos fuentes simples de nitrógeno mantuvieron un pH neutro. A un pH levemente alcalino, en el caso del cloruro de amonio, sólo un 10% del nitrógeno se encontrará como amonio, produciendo el amoníaco en equilibrio un efecto tóxico sobre la célula (Neijssel 1993). Por otro lado, dado que el amoníaco es gaseoso, parte del nitrógeno se perderá por volatilización en los cultivos aireados o altamente agitados.

Respecto de las fuentes complejas de nitrógeno, la peptona fue la más efectiva para inducir la bioacumulación. Aquí se verificó un aumento del pH (hasta 8-8.5). Esto es debido a que los compuestos orgánicos nitrogenados son deaminados para ser incorporados (Wang 1979).

Fuente de nitrógeno	X <sub>PHB</sub> (%ps)
simples	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	49
NH <sub>4</sub> Cl	5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	21
complejas	
extracto de levadura	2
peptona	27

Tabla N°7: Fuente de nitrógeno y producción de PHB

Se observó que en erlenmeyers agitados los cultivos con nitrógeno combinado rindieron biomasa final no significativamente diferentes a condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	X (g/l)	X <sub>PHB</sub> (% ps)
0	1.8	15
0.025	1.6	20
0.05	1.6	22
0.1	1.9	49
0.2	1.7	30
0.3	1.7	33.5

Tabla N° 8: Biomasa producida, X (g/l) y contenido de PHB, X<sub>PHB</sub> (% peso seco) a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

### 2.2.8. Aireación y agitación

El método más utilizado para proveer de una eficiente aireación a un cultivo sumergido es el de frascos agitados, que permite la obtención de altas densidades celulares en cultivo homogéneo, simplificando el estudio de la fisiología de los microorganismos. En

segundo lugar, la agitación y aireación debe mantener a los microorganismos en suspensión en fase homogénea. En laboratorio, la agitación es provista por agitadores rotatorios, mientras que en escala piloto y de producción se utilizan fermentadores, donde el oxígeno es provisto por burbujeo de aire. Dado que el oxígeno ha sido reportado como un factor crítico en la regulación de los ciclos del PHB y de los ácidos tricarbónicos en *Azotobacter* sp. (Senior y Dawes 1973, Carter y Dawes 1977) la agitación y aireación suministrada a la cepa 6B debe ser estudiada especialmente.

### 2.2.8.1. Efecto de la relación Vrecipiente:Vol medio ( $V_r:V_m$ )

Se varió la relación de volúmenes entre el recipiente y el medio de cultivo con el objetivo de modificar la tasa de aireación aplicada a los microorganismos en cada caso. La relación  $V_r:V_m$  se varió entre 1:2 y 1:20. En la Figura 9 se observa que con una  $V_r:V_m$  de 1:10 se obtuvo la mayor biomasa, medida como densidad óptica a 610 nm, con el mayor contenido de PHB (medido en g/l).

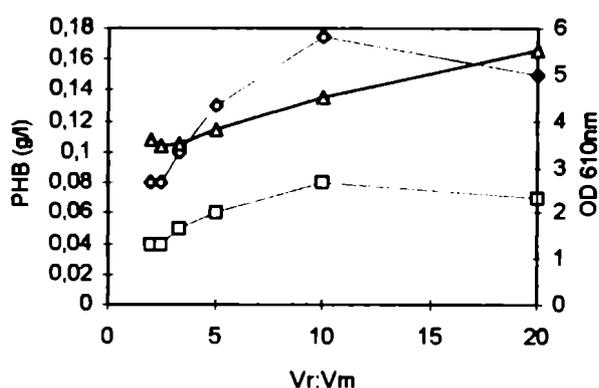


Figura 9: Efecto de la relación  $V_r:V_m$  sobre el contenido de PHB (g/l) a 24 ( $\square$ ) y 48 h ( $\circ$ ) y la biomasa final (como OD a 610nm) ( $\triangle$ ).

A menores relaciones  $V_r:V_m$  (mayor volumen de cultivo) el contenido de biomasa fue menor. Esto es debido a que la transferencia de oxígeno a las células disminuye cuando el volumen del medio de cultivo es aumentado (Wang 1979; Pirt 1975).

### 2.2.8.2. Variación en la velocidad de agitación (rpm) en agitador rotatorio

La agitación rotatoria es usualmente preferida ya que evita el salpicamiento del cultivo en las paredes del recipiente, y formación de adherencias de biomasa en las mismas.

Se ensayaron dos velocidades de agitación en agitador rotatorio: 90 y 220 rpm, ambas a 30°C y  $V_r:V_m$  de 5. Con la menor velocidad se obtuvo una biomasa 50% menor que con 220 rpm (0.9 y 2.1 g/l, respectivamente), y contenidos de PHB 80% menores (12 y 60%). La mayor biomasa se obtuvo a la mayor velocidad de agitación, consistentemente con la mayor transferencia de oxígeno. Se ha reportado que en sistemas con baffles, la constante de transferencia de oxígeno ( $K_{L,a}$ ) es proporcional a la potencia cúbica de la velocidad de agitación, en rpm (Pirt 1975). Sin embargo, los contenidos de PHB fueron menores con una agitación de 90 rpm, sugiriendo que es necesario alcanzar una biomasa o actividad metabólica mínima o residual para que la acumulación masiva de PHB pueda iniciarse (Aragao et al. 1994).

### 2.2.9. Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y producción de PHB

La temperatura óptima que conlleva la mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.1 \text{ h}^{-1}$  fue de 30°C. A 20°C se obtuvo un valor promedio de  $0.037 \text{ h}^{-1}$ , mientras que a 37°C de  $0.05 \text{ h}^{-1}$  (Figura 10):

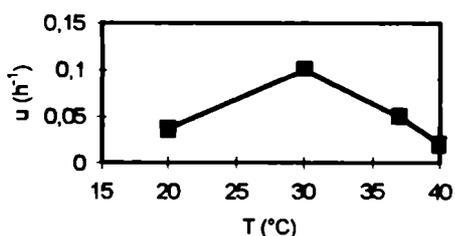


Figura 10: Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento en el medio basal de Burk

El principal motivo para una disminución de  $\mu$  cuando la temperatura es aumentada se debe a un aumento en los requerimientos de mantenimiento de la estructura celular, transporte activo de moléculas, gradientes de concentración entre la célula y su medio ambiente y movilidad (Wang 1979). Estos resultados son concordantes con las temperaturas óptimas obtenidas para el género *Azotobacter* sp. (Bergey 1984, Page et al. 1997).

### 2.2.10. Efecto del pH sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y contenido de PHB

A pH 7.0 se obtuvo la máxima velocidad específica de crecimiento ( $0.11 \text{ h}^{-1}$ ). El valor se mantuvo en el rango alcalino hasta un pH de aproximadamente 8.5. Hacia el rango ácido se verificó un descenso abrupto de  $\mu$  a pH menor a 6.0 (Figura 11). *Azotobacter* sp. es un género bacteriano frecuentemente encontrado en suelos neutros o alcalinos (Quispel 1974). El contenido de PHB y biomasa fue determinado a pH 6.5, 7.0 y 8.0, siendo de 22, 35 y 25% del peso seco y 1.3, 1.9 y 1.7 g/l, respectivamente.

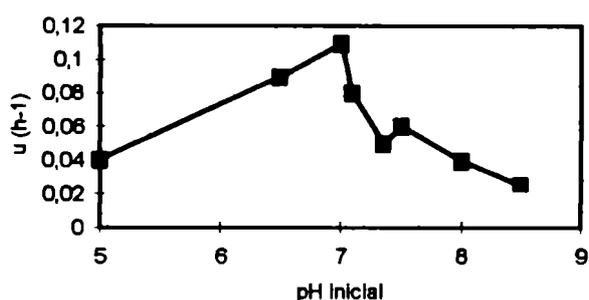


Figura 11: Efecto del pH inicial en el medio basal de Burk sobre la velocidad específica de crecimiento

Se concluyó que el pH tuvo un efecto significativo sobre la acumulación (pH 6.5 y 8 respecto de 7.0), probablemente debido a los contenidos de biomasa alcanzados a cada pH (ver 2.2.8.2).

### 2.2.11. Regulación del pH. Efecto de la adición de carbonato de calcio.

Con el fin de mantener el pH del medio basal de Burk cercano a la neutralidad durante todo el cultivo se agregó carbonato de calcio 1 g/l, ya que los cultivos crecidos con sulfato de amonio acidificaron el medio. El pH no disminuyó durante el curso de la fermentación (72 h) con el agregado de  $\text{CaCO}_3$ , la biomasa aumentó cerca de un 15% (medida como OD a 610nm), mientras que la acumulación de PHB no se alteró significativamente:

Medio	V <sub>r</sub> /V <sub>m</sub>	OD <sub>r 610nm</sub> /X (g/l)	pH <sub>r</sub>	X <sub>PHB</sub> (%ps)
Bm sin CaCO <sub>3</sub>	3	6.6/1.5	6.2	35
Bm +CaCO <sub>3</sub>	3	7.3/1.8	7.4	32
Bm +CaCO <sub>3</sub>	5	7.8/1.8	7.8	27

Tabla N° 9: Efecto del agregado de carbonato de calcio al medio basal de Burk sobre la biomasa obtenida y la acumulación de PHB.

### 2.2.12. Efecto de la edad del inóculo

La Figura 12 muestra que cultivos en erlenmeyers (220 rpm, 30°C) inoculados con preinóculos de 48 horas tuvieron una fase lag mínima de 6 horas. Los inóculos de 48 h correspondieron a cultivos entrantes en fase estacionaria, a este tiempo el número de

células/ml en el precultivo fue máximo ( $10^{10}$  UFC/ml, recuento en medio basal de Burk).

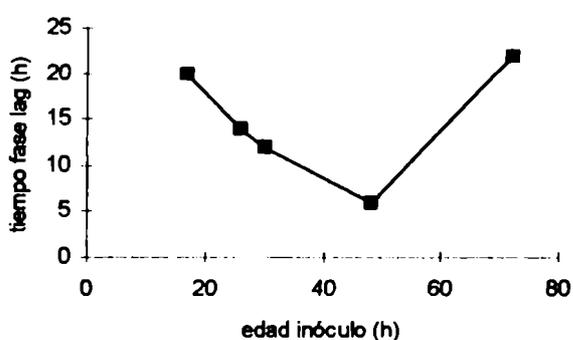


Figura 12: Efecto de la edad del inóculo sobre la duración de la fase lag en el medio basal de Burk

Por lo tanto, el mayor recuento incidió directamente sobre la velocidad con que el cultivo comenzó a crecer activamente. Precultivos jóvenes (de 24 h o menos) a pesar de estar creciendo activamente, tuvieron bajos recuentos (entre  $10^7$  y  $10^8$ , promedio  $3 \cdot 10^7$  UFC/ml). Inóculos viejos (72 h) dieron las mayores fases lag, ya que se encontraban en fase estacionaria ( $10^9$  UFC/ml). Se han encontrado biomásas significativamente mayores cuando se utilizaban inóculos con viabilidad menor al 100% provenientes de cultivos en erlenmeyers respecto de si provenían de fermentador, o si se encontraban en fase logarítmica en lugar de estacionaria (Mc Neil y Harvey 1990).

### **2.2.13. Modificaciones efectuadas en el medio basal de Burk: formulación del medio productivo de Burk**

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se diseñó un medio a partir del basal de Burk con las modificaciones surgidas del estudio de las variaciones en sus componentes, teniendo como criterio el de obtener mayor biomasa con máximo contenido de PHB.

La concentración de magnesio debió duplicarse para obtener máxima acumulación de PHB, mientras que fue necesario controlar la disminución del pH con  $\text{CaCO}_3$  para que los cultivos continuaran creciendo a alta velocidad. El calcio fue aumentado y se agregó amonio para evitar condiciones de fijación durante todo el cultivo, que de otra forma exigirían de la utilización de una mayor cantidad de carbono como fuente de energía. El hierro, sodio y potasio no influyeron sobre la bioacumulación. La ausencia de hierro no impidió el crecimiento, posiblemente debido a que se encontraba en el agua destilada utilizada para la formulación de los medios. El molibdeno debe estar presente solamente como traza porque es cofactor de la enzima nitrogenasa encargada de la fijación de nitrógeno. Respecto de los microelementos, la adición de una solución de los mismos (Materiales y Métodos) en una proporción de 1 ml/l de medio no aumentó significativamente la biomasa obtenida.

Este medio se denominará de aquí en adelante medio productivo de Burk modificado (medio Bm) cuya fuente de carbono fue glucosa al 1%, a menos que sea indicado lo contrario. En la Tabla N° 10 se detalla dicho medio, comparándolo además con los otros medios utilizados para el cultivo de *Azotobacter* sp.

componente (g/l)	basal de Burk	productivo de Burk modificado	Winogradsky	Brown	medio 77
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1	1	-	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	0.8	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.005	0.01	0.05	0.15	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.012	0.012		0.04	-
Fe EDTA 2 g/l	-	-	2 ml	-	-
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	trazas
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20	0.4	0.5	0.2	0.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.01	0.01	-	0.03	-
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	trazas
CaCO <sub>3</sub>	-	1	-	-	-
NaCl	0.1	0.1	0.5	-	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	0.1	-	-	-
pH final	7.0	7.0	7.2	7.0	7.0

\*glucosa al 1% como fuente de carbono, excepto en el medio de Winogradsky, que lleva manitol 0.3%.

Tabla N° 10: Comparación entre distintos medios para *Azotobacter chroococcum* 6B y el medio productivo de Burk modificado (Bm)

### 3. Diseño del proceso. Sistemas de cultivo utilizando fuentes de carbono simples

Existen diferentes tipos de sistemas de cultivo, desde el más simple tipo batch, en donde los nutrientes y el microorganismo se colocan en el reactor y al cabo de un tiempo se

cosecha el producto deseado); cultivos fed-batch o alimentados, donde se agrega un nutriente (normalmente carbono) a tiempos definidos de cultivo; otros basados en la utilización secuencial de medios distintos; sistemas semicontínuos donde se cosecha periódicamente el líquido del reactor, administrando cantidades equivalentes de medio fresco y sistemas contínuos en donde se agrega en forma contínua medio fresco, manteniendo al cultivo en un estado estacionario y a volumen constante.

En el caso de la producción industrial del copolímero PHBV (Biopol) se adoptó un sistema de cultivo en batch en reactores agitados de mezcla completa donde se cultiva *Alcaligenes eutrophus* en un medio con una concentración de fosfato tal que se torne deficiente luego que la biomasa ha sido formada, induciendo de esa forma la acumulación de PHBV (Luzier 1992).

A continuación se describen los experimentos realizados tendientes a encontrar el sistema de cultivo más adecuado para la obtención de PHB con la cepa 6B, primeramente en erlenmeyers y luego en un reactor agitado de mezcla completa.

### **3.1.1. Cultivo en dos etapas: medio completo (primera etapa)**

Se ensayó un proceso de cultivo utilizando en una primera etapa en caldo nutritivo (CN) para obtener alta biomasa y una segunda etapa con medio deficiente en nitrógeno Bm para inducir la acumulación de PHB. La velocidad de crecimiento en CN fue baja (0.01 unidades OD/h), pero con la suplementación de fósforo (como fosfato monoácido de potasio) hasta una concentración final de 2 g/l se logró aumentar diez veces la  $\mu$ . Se centrifugó la biomasa final en esterilidad (rendimiento  $X=2.1$  g/l, respecto de 1.5 g/l del control CN sin fosfato agregado) y se sembraron iguales volúmenes de inóculo en tres medios deficientes en nitrógeno (segunda etapa).

### **3.1.2. Segunda etapa: crecimiento en medios de cultivo deficientes**

Se ensayaron los medios productivo de Burk modificado (Bm), de Winogradsky y de manitol en erlenmeyers agitados a 220 rpm y 30°C ( $V_r:V_m$  1:5) como posibles medios para la etapa de bioacumulación. Se ensayaron también los cultivos con una concentración final aumentada de 1.5 g/l de fosfato.

La biomasa final fue de 3.3, 2.5 y 0.9 g/l para el medio Bm, de Winogradsky y manitol (medio Bm con manitol 1%), respectivamente. No hubo diferencia considerable entre el contenido de PHB con bajo (1 g/l) y alto (1.5 g/l) fosfato (8.5% fosfato normal-7.2% con fosfato suplementado a 48 h) en medio Bm, así como tampoco con el medio de Winogradsky. Esto es consistente con lo observado anteriormente (2.2.1). Las células crecidas en el medio de manitol no acumularon PHB. Se observó la producción de melanina sólo en el caso del medio Bm a partir de 48 horas de incubación, tanto en medio líquido como en medio sólido. Los resultados se muestran en la Tabla N°11.

Medio	t (h)	OD <sub>610nm</sub>		X <sub>PHB</sub> (%ps)	
		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (a)	+PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (a)	+PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
manitol	0	0.3	0.3	0	0
	22	0.3	0.35	0	0
	24	0.34	0.4	0	0
	48	0.43	0.55	0	0
Winogradsky	0	0.15	0.15	0	0
	22	0.57	0.76	8.5	11
	24	0.7	0.77	7.3	9.7
	48	0.73	0.84	4.7	5.1
Bm	0	0.1	0.1	0	0
	22	0.91	0.8	13.2	9
	24	0.9	0.89	9	8
	48	0.9	0.83	8.5	7.2

(a) PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: no suplementado, +PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: suplementado concentración final 1.5 g/l

Tabla N° 11: Cultivo en dos etapas y efecto de la suplementación de fosfato en el medio Bm sobre la biomasa (como densidad óptica a 610nm) y contenido de PHB.

### 3.2. Sistemas de cultivo en una etapa. Cultivo en batch

Se cultivó la cepa 6B en medio Bm en erlenmeyers agitados ( $V_r:V_m$  1:10) a 220 rpm y 30°C durante 96 h. Los parámetros que se midieron para seguir el proceso fueron: absorbancia a 610nm y peso seco como medidas del crecimiento bacteriano, pH, consumo de glucosa, amonio y fosfato y producción de PHB (como porcentaje del peso seco). En la Figura 13 se muestra la evolución en el tiempo de estos parámetros para uno de los cultivos. Se observó que los cultivos entraron en fase estacionaria cerca de las 48 h de cultivo, con una fase lag no mayor que 12 h (ver 2.2.12). El pH decreció en forma continua, con una velocidad entre 0.01 y 0.04 unidades/hora, llegando a valores de 6.5 a 48 h. La glucosa fue consumida a una velocidad ( $q_{glu}$ ) que varió entre 0.2 y 0.15 g/l.h (promedio 0.08 g/l.h). El amonio (concentración inicial 0.1 g/l) fue consumido totalmente a las 20 h de cultivo, mientras que el fosfato entre las 35 y 40 h.

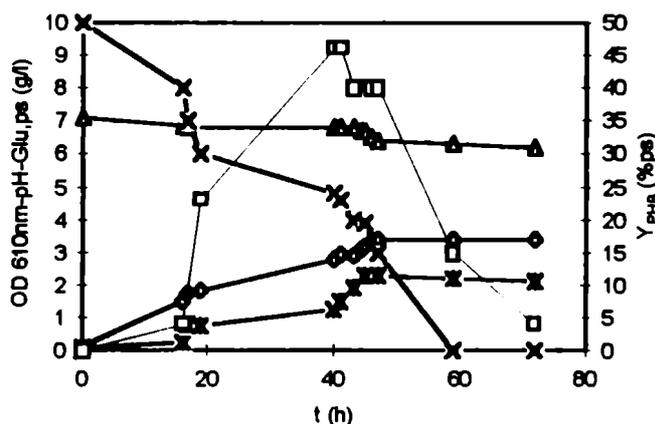
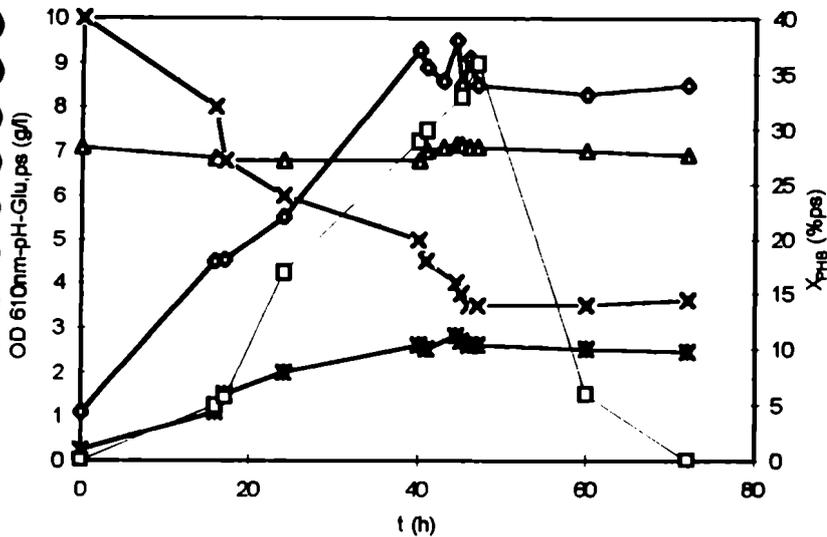


Figura 13: Cultivo batch en erlenmeyer de *A. chroococcum* 6B: evolución en el tiempo de OD<sub>610nm</sub> (◊), peso seco (\*), pH (Δ), glucosa (g/l) (×) y X<sub>PHB</sub> (% peso seco) (◻).

El PHB tuvo una curva de acumulación con un máximo entre las 45 y 50 h de cultivo. Dado que entre 20 a 24 h de cultivo (fase lag) pudo detectarse producción apreciable de PHB (5 a 25% del peso seco) puede clasificarse como un metabolito primario, aunque su función metabólica no es crítica para el crecimiento celular.

Cuando la cepa 6B se cultivó en fermentador con un volumen de medio Bm de 1.5 litros con una agitación de 200 rpm, el comportamiento fue similar al mostrado en erlenmeyers. Sin embargo, los contenidos de PHB se redujeron aproximadamente un 20% (Figura 14).



20% (Figura 14).

Figura 14: Cultivo batch en fermentador de *A. chroococcum* 6B: evolución en el tiempo de OD<sub>610nm</sub> (◇), peso seco (g/l) (\*), pH (Δ), glucosa (g/l) (x) y X<sub>PHB</sub> (% peso seco) (□).

### 3.3. Cultivo en batch alimentado

#### 3.3.1. Alimentación con glucosa (en fase logarítmica)

Cuando se agregó glucosa en fase logarítmica a cultivos en erlenmeyer agitados a 220 rpm (que habían consumido cerca del 50% de la glucosa original) se verificó un aumento del contenido de PHB. Este aumento continuó hasta aproximadamente 20 h de la alimentación, luego comenzó a decrecer el contenido de PHB. Las curvas de absorbancia y peso seco aumentaron en forma paralela a la curva del PHB, aunque la curva de peso seco bacteriano no mostró un aumento paralelo desde las 50 h. Cuando se midieron las proteínas (por el método de Bradford) antes y después de la alimentación con glucosa, se verificó que el cociente PHB/proteínas aumentó luego de la alimentación (se duplicó de 0.5 a 1 g/g a 33 y 48 h, respectivamente), por lo que pudo deducirse que el contenido de PHB no aumentó a expensas de una reducción en el contenido de proteínas o de biomasa no-PHB, sino por síntesis de novo de PHB, a partir de la glucosa alimentada:

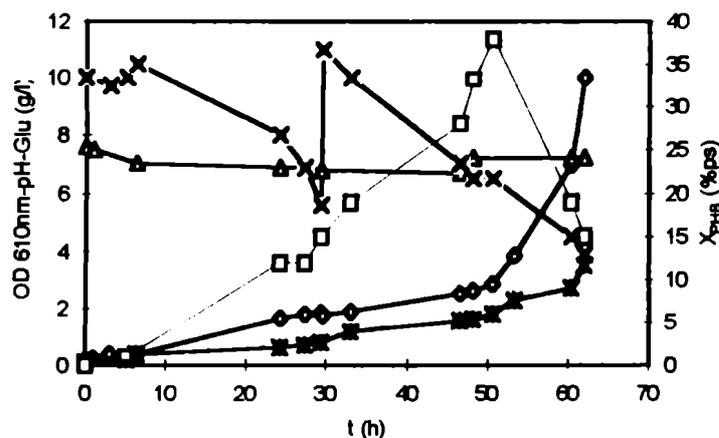


Figura 15: Cultivo en erlenmeyer con alimentación de glucosa en fase logarítmica (33 h). OD 610nm (◇), pH (Δ), glucosa (g/l) (×), peso seco (g/l) (+),  $X_{PHB}$  (% peso seco) (□).

### 3.3.1.2. Cultivo en fermentador alimentado con glucosa en fase estacionaria

Al experimentar las mismas condiciones en fermentador con 4 litros de medio Bm también se repitió el mismo comportamiento. En la Figura 16 se resumen los parámetros medidos. El cultivo fue aireado con un flujo de aire estéril de 2 l/min (0.5 vvm) con glucosa 1% como fuente de carbono. Desde tiempo inicial hasta 53 horas la agitación provista por las paletas del fermentador fue de 100 rpm. El contenido de PHB aumentó acompañando la curva de crecimiento, llegando a un máximo a las 47 horas (63.5% del peso seco). Este máximo coincidió con la entrada del cultivo en fase estacionaria, luego el PHB comenzó a degradarse. El pH se mantuvo constante, cerca de la neutralidad.

A las 53 horas se alimentó el biorreactor con glucosa al 50%, de manera de llevar nuevamente la fuente de carbono a su concentración inicial del 1%, adicionalmente se redujo la agitación a 50 rpm. Este fed-batch produjo un incremento del  $X_{PHB}$  de 26 a 37%, luego de 3 h del agregado de glucosa, además de un aumento del peso seco. El aumento de PHB se debió a la alimentación de glucosa, ya que la biomasa residual (peso seco - PHB, (g/l)) se mantuvo constante en 3 g/l. Finalmente se degradó el PHB

(disminución del contenido) hasta tiempo final de fermentación. La biomasa final fue de 5 g/l a 72 h. Cuando se comparó con el cultivo batch en condiciones similares sin alimentación de glucosa en fase estacionaria (ver 3.7.2.2) se verificó que la biomasa final fue dos veces mayor.

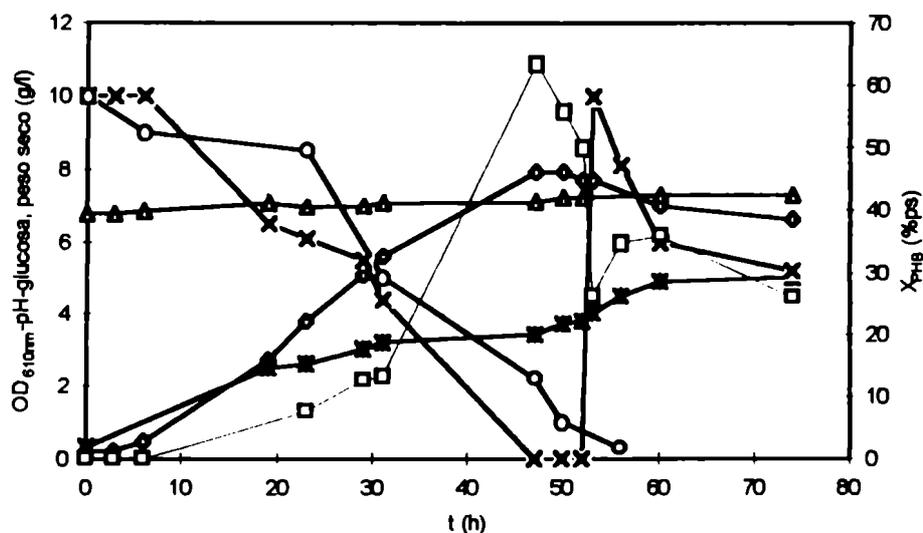


Figura 16: Cultivo en fermentador con alimentación de glucosa. OD 610nm (◇), pH (Δ), peso seco (g/l) (\*), glucosa (g/l) (×), fosfato (g/l.10) (○) y X<sub>PHB</sub> (% peso seco) (□).

### 3.3.2. Alimentación con sulfato de amonio

En un cultivo en fermentador en medio Bm el amonio fue consumido totalmente entre las 35 y 40 h de cultivo. Cuando el amonio había sido completamente agotado (35 h), el contenido de PHB llegaba a su valor máximo a final de la fase logarítmica-comienzo de la fase estacionaria (17%). Al calcular las velocidades específicas de formación de PHB ( $q_{PHB}$ ) (ver 3.7.2.11) se observó que ésta se redujo luego de una hora de producida la alimentación por fed-batch de amonio (se llevó nuevamente a 0.1 g/l) en fase logarítmica tardía a 35 h. El contenido de PHB aumentó a 21% a 43.5 h, mientras que a 46 h fue del 11%. La biomasa aumentó un 10% de 35 a 46 h de cultivo. A medida que el amonio fue consumido nuevamente,  $q_{PHB}$  volvió a aumentar a 43.5 y 47 h (Figura 17).

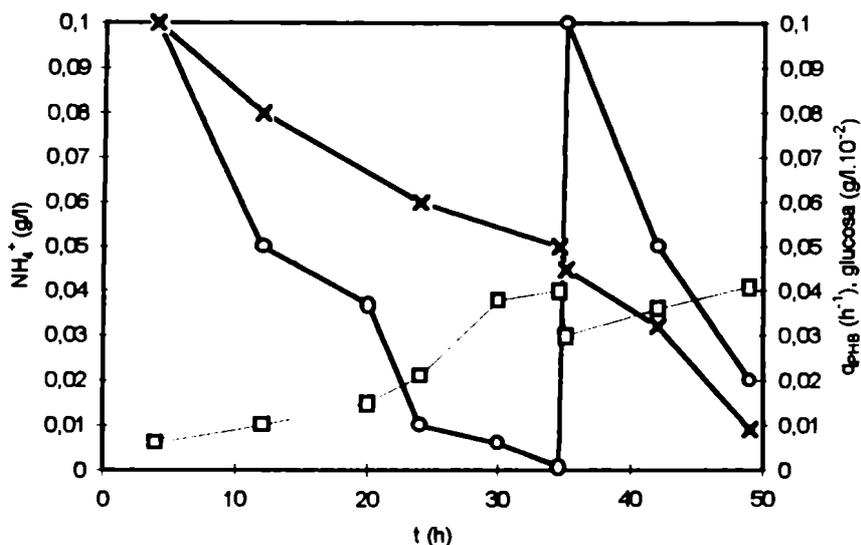


Figura 17: Cultivo batch en fermentador con alimentación de sulfato de amonio a 35 de cultivo y su efecto sobre la velocidad específica de producción de PHB ( $q_{\text{PHB}}$ ) con una relación molar C/N de 69. o :  $\text{NH}_4^+$  (g/l),  $\square$  :  $q_{\text{PHB}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ),  $\times$  glucosa ( $\text{g/l} \cdot 10^{-2}$ ).

Resultados similares fueron observados cuando el sulfato de amonio fue agregado ya entrado el cultivo en fase estacionaria a 44 h (Figura 18):  $q_{\text{PHB}}$  disminuyó (0.03 y 0.015  $\text{h}^{-1}$  a 44 y 45 h, respectivamente). A su vez, la biomasa (como peso seco) aumentó un 10% luego de transcurrida una hora desde la alimentación (de 44 a 45 h), estabilizándose en 2.5 g/l hasta 51 h. La degradación del PHB fue considerable (42 a 30% de 44 a 45 h), sugiriendo que el PHB fue metabolizado intracelularmente para convertirse en biomasa no-PHB (la que aumentó aproximadamente un 15% desde el fed-batch) debido a que el cultivo fue inducido a crecer por el agregado de amonio, pero sin agregado externo de carbono. Este aumento de la biomasa residual no pudo atribuirse a la regulación externa del pH a 43.5 h, ya que la glucosa estaba agotada.

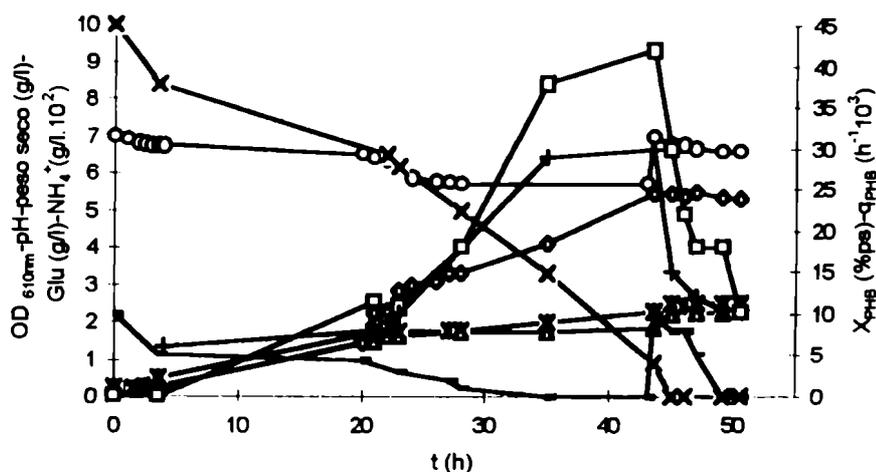


Figura 18: Alimentación con sulfato de amonio en fase estacionaria.  $\diamond$  : OD 610nm,  $\square$   $X_{\text{PHB}}$  (%ps),  $\circ$  : pH,  $\times$  : glucosa (g/l),  $*$  : peso seco (g/l),  $-$  : amonio (g/l. $10^2$ ),  $+$  :  $q_{\text{PHB}}$  ( $\text{h}^{-1} \cdot 10^3$ ).

En conclusión, cuando se alimenta amonio, debe suministrarse paralelamente fuente de carbono para que la velocidad específica de formación de PHB no se reduzca.

### 3.4. Cultivo semicontínuo

Se realizó un cultivo batch en fermentador con un volumen de medio Bm de 3 litros, y agitado a 200 rpm. Estando el cultivo en fase estacionaria (69 h) se cosechó el 80% del volumen total (2.4 l) y se agregó el mismo volumen de medio fresco Bm, continuándose la fermentación en idénticas condiciones. Las células provenientes de los 2.4 l de cultivo fueron cosechadas y el PHB fue extraído y purificado (29% del peso seco).

Se comprobó que luego del agregado de medio fresco se alcanzaba igual contenido de PHB que en el batch inicial a menor tiempo (33 h después del agregado de medio fresco, frente a aproximadamente 45 h en la fase inicial). La densidad óptica disminuyó abruptamente al agregar medio fresco, mientras que el pH se acercó a la neutralidad, en ambos casos debido a la dilución del cultivo remanente. El inconveniente que surgió fue el de la tendencia a la contaminación del batch. La Figura 19 resume los resultados obtenidos con este sistema de cultivo.

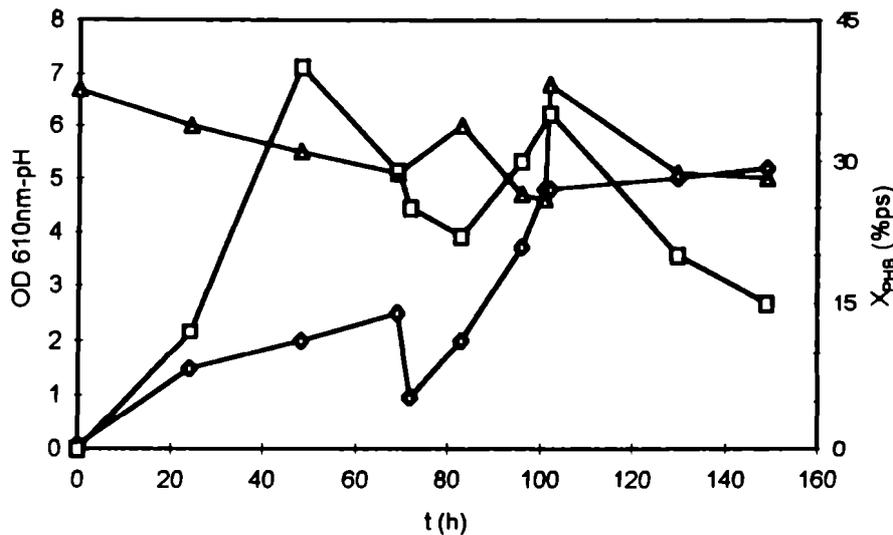


Figura 19: Cultivo en fermentador semi-continuo. □ :  $X_{PHB}$  (%peso seco), Δ : pH, ◇ : OD<sub>610nm</sub>.

Entonces, a continuación se compararon los sistemas de cultivo ensayados en cuanto a los rendimientos de biomasa a partir de la glucosa consumida ( $Y_{x,glu}$ ), de PHB a partir de glucosa ( $Y_{p,glu}$ ) y la productividad de PHB (g/l.h) a tiempo de máxima acumulación para los 4 sistemas de cultivo ensayados: cultivo en batch, en batch alimentado con glucosa, batch alimentado con amonio y cultivo semicontinuo. Dado la dificultad operativa que ofreció el sistema de cultivo en dos etapas (3.1.1) y el bajo contenido de PHB alcanzado no se consideró en la comparación con los otros métodos.

Aún cuando el sistema semicontinuo demostró poseer una conversión de glucosa en PHB y productividad similar al batch y batch alimentado con amonio, el batch alimentado con glucosa dió los valores mayores para los tres parámetros evaluados.

sistema de cultivo	$Y_{x/\text{glu}}$ (g/g)	$Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$ (g/g)	$P_{\text{PHB}}$ (g/l.h)
batch <sub>a</sub>	0.43	0.14	0.02
batch alimentado con glucosa <sub>b</sub>	0.45	0.29	0.07
batch alimentado con amonio <sub>c</sub>	0.5	0.1	0.02
semi-continuo <sub>d</sub>	0.35	0.15	0.015

valores a tiempo de acumulación máxima: a: 45 h, b: 47 h, c: 43.5 h, d: 48 h

Tabla N° 12: Rendimientos de biomasa,  $Y_{x/\text{glu}}$  (g/g) y PHB,  $Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$  (g/g) a partir de la glucosa consumida y productividad de PHB ( $P_{\text{PHB}}$ ) en los cuatro sistemas de cultivo ensayados.

### **3.5. Efecto del agregado de compuestos definidos sobre el contenido de PHB en cultivos batch en medio Bm**

#### **3.5.1. Efecto de la adición de ácidos orgánicos: ácido isovalérico y ácido hexanoico agregados en fase logarítmica y en fase estacionaria**

El efecto de ácidos orgánicos sobre el metabolismo del PHB fue ensayado con el fin de evaluar si el sistema enzimático de la cepa puede incorporar precursores para la formación de copolímeros, o bien si existe un efecto promotor de la biosíntesis de PHB.

El camino metabólico de formación de PHB se halla relacionado con el de la degradación de ácidos grasos por  $\beta$ -oxidación y el la síntesis de ácidos grasos a través de intermediarios 3-hidroxiacilos (Lageveen et al. 1988, De Waard et al. 1993) que podrían canalizarse a la síntesis de PHB.

En la Figura 20 se muestra el efecto del agregado de ácidos isovalérico sobre el contenido de PHB, utilizando cepa 6B. Se observó en general que este ácido inhibió en una pequeña proporción (10%) la biomasa bacteriana respecto del control. El ácido isovalérico agregado a 24 horas (fase logarítmica) y a 44 horas de incubación (fase estacionaria), tuvo efecto promotor pero a diferentes concentraciones (0.1 y 0.05% respectivamente). Pudo observarse que en fase estacionaria 0.1% del ácido es altamente inhibitorio respecto de la acumulación de PHB.

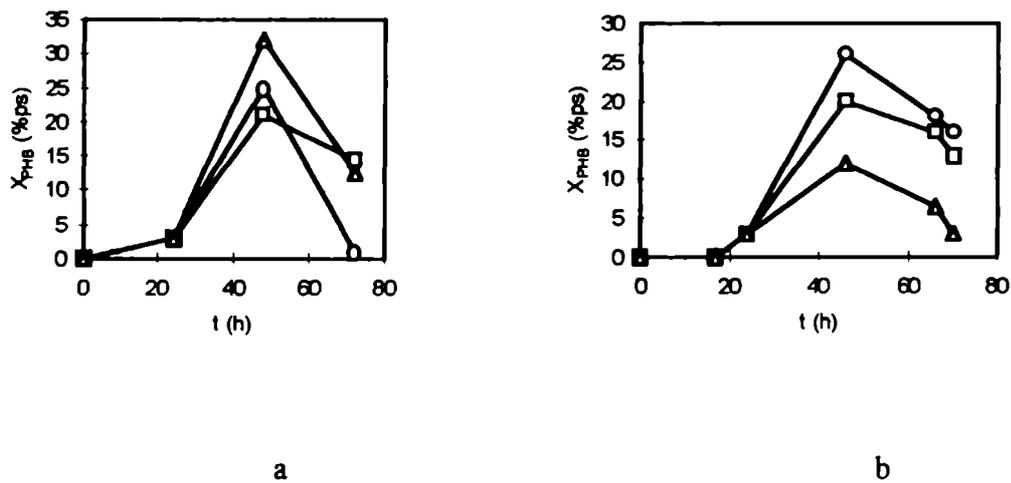
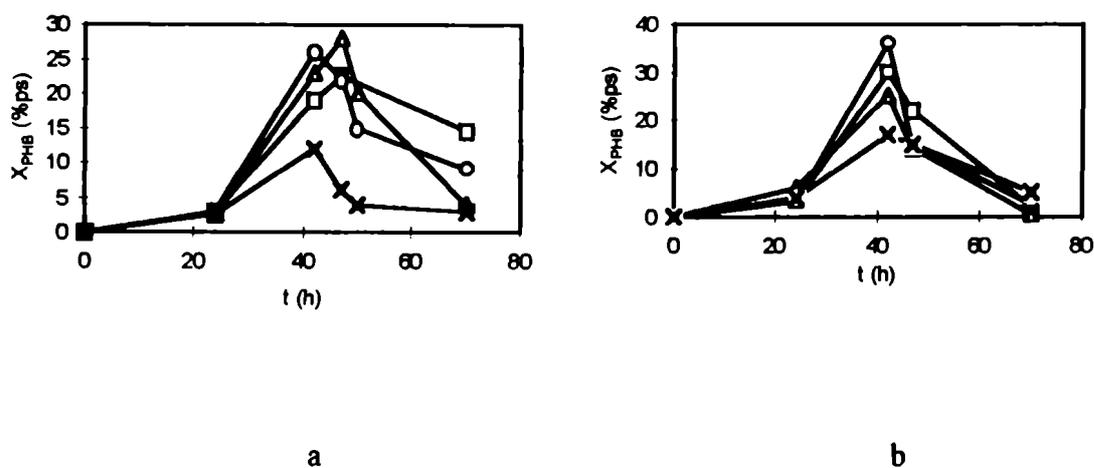


Figura 20: Efecto del agregado de ácido isovalérico sobre el contenido de PHB ( $X_{PHB}$ ). a) en fase logarítmica b) en fase estacionaria.  $\square$  : control,  $\circ$  : 0.05%,  $\Delta$  : 0.1%.

El ácido hexanoico mostró una tendencia similar, observándose ya en fase logarítmica el efecto inhibitorio a 0.2%. En fase estacionaria la tendencia es similar al agregado en fase logarítmica. El ácido orgánico fue agregado en forma estéril a 24 y 44 horas (Figura 21). No se observaron para ambos ácidos la aparición de otros picos cromatográficos indicativos de la biosíntesis de copolímeros.



Figuras 21 y 22: Efecto del agregado de ácido hexanoico sobre el contenido de PHB ( $X_{PHB}$ ). a) en fase logarítmica b) en fase estacionaria.  $\square$  : control,  $\circ$  : 0.05%,  $\Delta$  : 0.1%,  $\times$  : 0.2%.

Se ha reportado previamente que valerato 10 mM promovió la formación de PHBV en *Azotobacter vinelandii* UWD (Page y Manchak 1995).

En la siguiente Tabla se resumen los resultados obtenidos con otros ácidos orgánicos, en cuanto a biomasa final obtenida y acumulación de PHB.

ácido orgánico (como sales sódicas)	X (g/l)	$X_{PHB}$ (% peso seco)
control	1.85	22
propiónico 0.01%	1.1	17.5
butírico 0.025%	1.4	25
octanoico 0.02%	1.5	19
ricinoleico 0.01%	1.4	25
linolénico 0.01%	1.3	11

Tabla N° 13: Contenido de PHB,  $X_{PHB}$  (% peso seco) a 48 h y biomasa final X (g/l) (72 h) en cultivos con el agregado de ácidos orgánicos de diferente longitud de cadena al medio Bm.

En general, el agregado de ácidos orgánicos redujo la biomasa final, siendo el contenido de PHB del mismo orden que el control.

### 3.5.2. Efecto del agregado de alcoholes. 2-propanol, 1- butanol y 1-octanol

Alcoholes como etanol y propanol han sido utilizados como sustrato para la producción de PHB (Alderete 1993). Se ensayaron tres alcoholes de diferente longitud de cadena. Todos los alcoholes se agregaron a una concentración de 0.1%, desde el inicio del cultivo. En la Tabla N° 14 se detallan los contenidos de PHB (% peso seco) y biomasa obtenida (g/l) a 48 h de cultivo en medio Bm con glucosa al 1%.

Alcohol	X (g/l)	X <sub>PHB</sub> (% ps)
control	2	38
2-propanol	2.1	29
1-butanol	2.2	15
1-octanol	1.4	11

Tabla N° 14: Efecto del agregado de alcoholes sobre la biomasa y la acumulación de PHB en medio Bm con glucosa al 1%.

Los alcoholes probados disminuyeron el contenido de PHB. Con 1-butanol el X<sub>PHB</sub> obtenido es menor, posiblemente debido a que es inductor de la formación de cistos, los cuales requieren para su formación de la utilización de PHB (Sillman y Casida 1986). En el caso de 1-octanol se verificó un efecto inhibitor del crecimiento y de la acumulación de PHB. Los cromatogramas de las muestras derivatizadas no indicaron otro 3-hidroxiácido distinto del 3-HB.

### 3.5.3. Efecto del agregado de compuestos polihidroxiados. Polietilenglicol (PEG) y Tween 80

Los polialcoholes Tween 80 (polioxietilensorbitan monoleato) y PEG 200 se ensayaron (agregados al 0.1% desde tiempo cero al medio Bm) para evaluar si estimulaban el

contenido celular y en que manera afectaban la bioacumulación. Se ha reportado que ácidos grasos de cadena larga podrían ser sustratos para la producción de PHB (Eggink et al. 1995) por lo que se ensayó una sustancia anfipática como el Tween 80, ya que ácidos orgánicos de cadena larga no habían promovido la síntesis de PHB (ver Tabla 13).

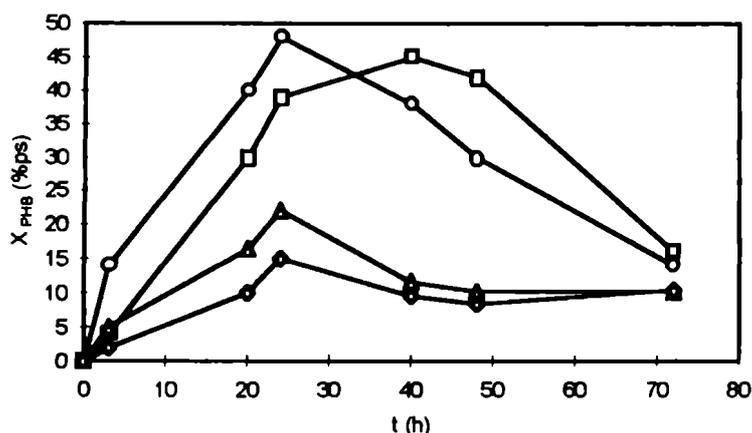


Figura 23: Efecto del agregado de Tween 80 al medio Bm con glucosa al 1% sobre  $X_{PHB}$ . □ : control sin Tween 80, ○ : 0.1%, △ : 0.2%, ◇ : 1%.

Asimismo, PEG de distinto tamaño han sido reportados como agentes moduladores del peso molecular del PHB obtenido de *A. eutrophus* (Shi et al. 1995). Cuando se agregó Tween 80 de manera de llegar a una concentración de 0.1% se verificó un aumento significativo en el  $X_{PHB}$  respecto del control. Sin embargo, hubo una reducción de biomasa (2.2 y 1.8 g/l para el control y con Tween 80 0.1%, respectivamente). Esto podría deberse a que derivados de ácidos grasos en alta concentración pueden inhibir la biosíntesis de membrana, a través de una inhibición de la enzima acetil-CoA carboxilasa, que cataliza la primer etapa de formación de ácidos grasos a partir de acetil-CoA hasta malonil-CoA (Crueger y Crueger 1989).

El PEG inhibió el crecimiento, probablemente debido a un efecto desestabilizador sobre las membranas bacterianas.

Un hecho interesante es que el agregado de Tween 80 al 0.1% mantiene los altos  $X_{PHB}$  del control, pero con la ventaja adicional de que el  $X_{PHB}$  máximo se obtuvo a 24 h (es decir, a menor tiempo de proceso), aún cuando redujera el contenido de biomasa.

### 3.5.4. Efecto del agregado de metabolitos del ciclo de Krebs

Ya ha sido indicado que la fuente de carbono es derivada en mayor proporción al camino metabólico de formación de PHB cuando existe una deficiencia nutricional (en el caso de *Azotobacter*, la de nitrógeno). Esto impide que el carbono sea conducido a otros caminos metabólicos, de los cuales el más importante es el ciclo de Krebs. Si los metabolitos de este ciclo son agregados al medio de cultivo podría ejercerse una retroinhibición que favorezca la incorporación del acetil-CoA en el ciclo del PHB. Por lo tanto se investigó el efecto de algunos metabolitos agregados al medio de cultivo sobre la biosíntesis de PHB.

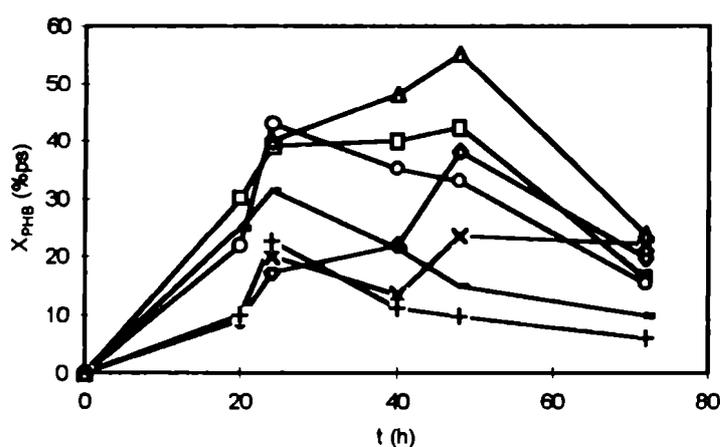


Figura 24: Efecto del agregado de metabolitos del ciclo de Krebs al medio Bm con glucosa 1%. □ : control, ○ : citrato 0.01%, Δ : citrato 0.1%, ◇ : oxalato 0.01%, × : oxalacético 0.01%, + : malato 0.01%, - : fumárico 0.01%

De la Figura 24 sobresale el efecto del citrato al 0.1%, con un  $X_{PHB}$  de 55% a 48 h.  $Y_{PHB/glu}$  fue de 0.10 g/g, mientras que  $Y_{x/glu}$  fue de 0.45 g/g. Excepto citrato, el resto de los metabolitos ensayados tuvo  $X_{PHB}$  menores al control. La alta concentración de citrato (0.1%) produjo la derivación del exceso de acetil-CoA a la formación de PHB, no alcanzado con 0.01% de citrato.

### 3.5.5. Coproducción de PHB y exopolisacáridos (EPS). Fracción de PHB del total de biopolímeros

El PHB y los exopolisacáridos son metabolitos que se producen a partir de la fuente de carbono suministrada. Los EPS pueden representar una fracción considerable de la actividad metabólica bacteriana, considerando que las colonias de *Azotobacter* son mayoritariamente mucosas al ser aisladas de suelos (Kamat et al. 1995; Tavernier et al. 1997).

Dado que la biosíntesis intracelular de PHB es en general acompañada de la excreción de EPS en *Azotobacter* sp., se estudiaron que fuentes de carbono serían más adecuadas para maximizar la relación de contenidos de PHB y EPS producidos. Como luego se presenta el efecto del agregado de antibióticos al medio Bm con glucosa para inhibir la biosíntesis de EPS, se presenta en este momento un estudio acerca de la coproducción de estos polímeros.

#### **3.5.5.1. Curvas de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) con diferentes fuentes de carbono en medio Bm**

Fuentes de carbono simples y complejas fueron utilizadas en el medio Bm con el fin de evaluar la coproducción de PHB y EPS, a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B. La Figura N° 25 a) muestra las curvas de crecimiento para la cepa en glucosa, sacarosa, fructosa y melaza de caña de azúcar, en b) se muestran las mismas curvas con agregado de sulfato de amonio (0.1 g/l). La curva con melaza sólo se muestra en la Figura 25 a) pues la melaza per se contiene una concentración de amonio de 0.1 g/l. Con la excepción de la sacarosa, que muestra la mayor  $\mu$  (0.125 h<sup>-1</sup>), las fuentes simples de carbono estudiadas mostraron una tendencia similar respecto a su cinética de crecimiento. Con melaza  $\mu$  fue similar a glucosa, y 30 y 35% menor que con fructosa y sacarosa, respectivamente. Sin embargo, las absorbancias finales máximas fueron obtenidas con fructosa y melaza. Las curvas de crecimiento con las fuentes simples de carbono con agregado de amonio (al 0.1 g/l) tuvieron  $\mu$  similares, y aproximadamente 60% mayores que con melaza. Aún así, la absorbancia máxima con la fuente de carbono compleja fue significativamente mayor que con glucosa o sacarosa, y en el mismo orden que con fructosa.

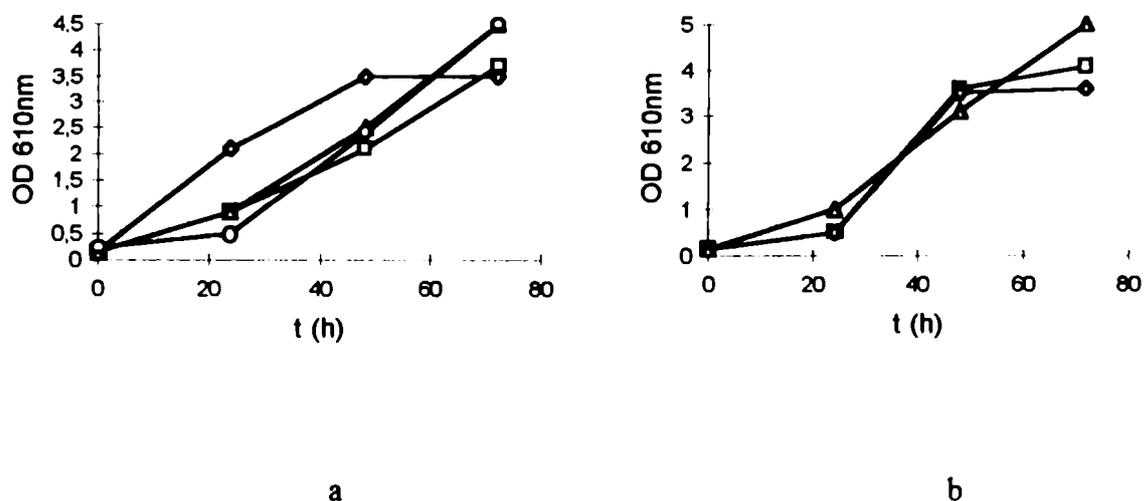


Figura 25: Curvas de crecimiento en medio Bm con distintas fuentes de carbono. a): sin sulfato de amonio. □ : glucosa 1%, ○ : melaza de caña de azúcar 5% (p/v), Δ : fructosa 1%, ◇ : sacarosa 1%. b): con 0.1g/l de sulfato de amonio. □ : glucosa 1%, ◇ : sacarosa 1%, Δ : fructosa 1%.

### 3.5.5.2. Coproducción de PHB y EPS

**Producción de PHB:** La Figura 26 muestra los perfiles de acumulación de PHB en el medio Bm con las fuentes de carbono indicadas y las mismas suplementadas con amonio. Cuando se agregó amonio a cultivos en medio Bm con glucosa y fructosa se obtuvieron biomazas finales mayores pero no significativamente diferentes a las encontradas sin suplementación de amonio. La concentración de proteínas (obtenidas por el método de Bradford) fue dos veces mayor en los cultivos crecidos con amonio. Esto explica el menor contenido de PHB encontrado en cultivos con amonio, ya que éstos últimos derivaron mayor proporción de carbono a la biosíntesis de proteínas respecto de los cultivos crecidos sin nitrógeno (Tabla N° 15). La fructosa no produjo PHB tanto con o sin amonio agregado, y en las condiciones ensayadas probó no ser una fuente de carbono adecuada para la producción de PHB. El contenido de PHB en las células crecidas con

sacarosa fue el mayor alcanzado de todas las condiciones experimentadas (1.1 g/l a 48 h, 40% del peso seco). Las células en medio con melaza 5% p/v (con una composición de 1% de sacarosa, 0.25% de glucosa y 0.25% de fructosa) acumularon PHB (0.7 g/l, 37%) y fueron similares a aquellas obtenidas de células crecidas en glucosa (0.85 g/l, 48%). En todos los casos, la acumulación máxima de PHB fue lograda a 48 h de cultivo.

**Producción de EPS:** La sacarosa y la glucosa biosintetizaron grandes cantidades de EPS (máximo 2.1 y 1.1 g/l, respectivamente a 72 h) mientras que fructosa no produjo EPS. Cuando la melaza fue ensayada, la producción de EPS empezó a las 48 h y continuó hasta un valor máximo de 1.1 g/l a las 72 h. Fue observado que los EPS disminuyeron cuando el medio con glucosa fue adicionado con 0.1g/l de sulfato de amonio (2.1 a 0.3 g/l de 48 a 72 h). La adición de amonio no afectó los otros perfiles de EPS, con la excepción del medio con sacarosa y amonio suplementado, donde se observó un pequeño aumento a 72 h, comparado con el medio con sacarosa. Los resultados se resumen en la siguiente Figura:

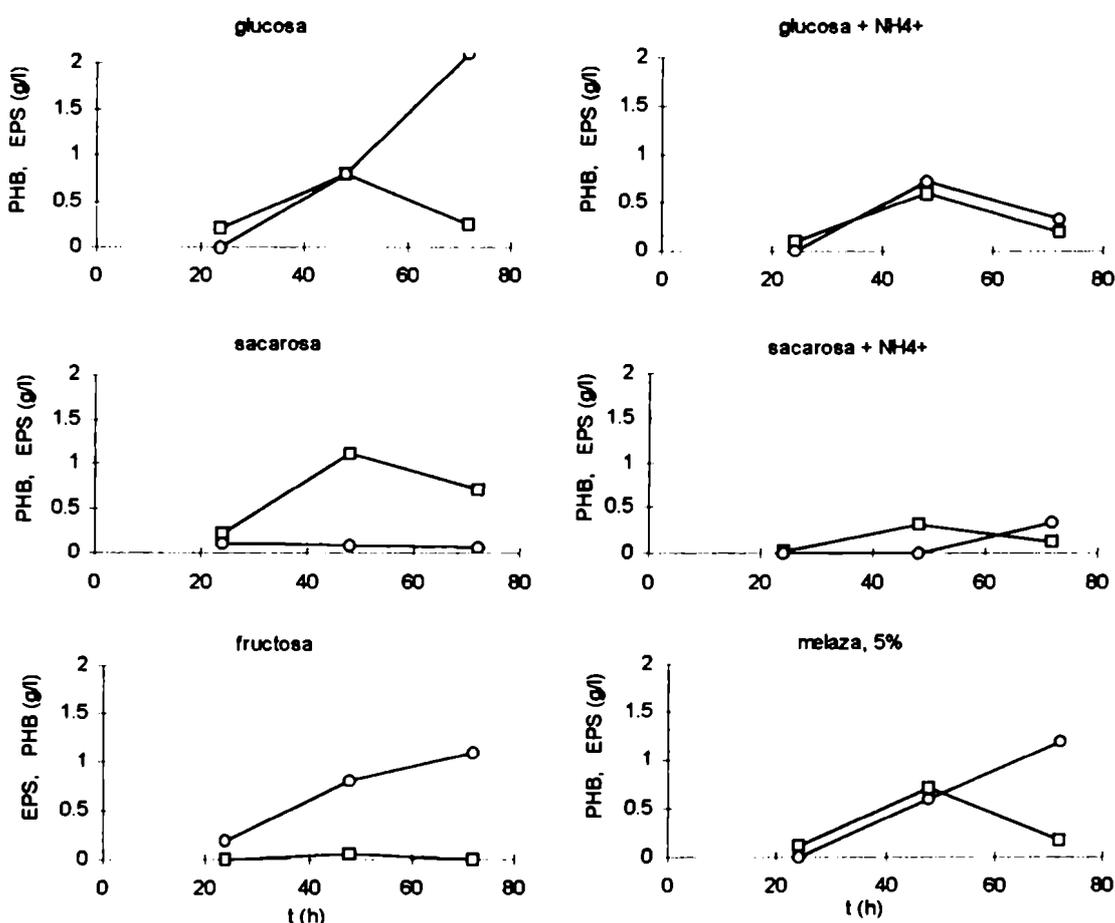


Figura 26: Coproducción de PHB y EPS en el tiempo con distintas fuentes de carbono en medio Bm con y sin amonio agregado: □ PHB (g/l), ° : EPS (g/l).

En cultivos crecidos con glucosa se observó acidificación, pero 20% menos que con las otras fuentes de carbono. En los medios suplementados con amonio el pH se mantuvo cercano a la neutralidad, sólo se observó alcalinización neta con fructosa. Como es lógico, el consumo de la fuente de carbono acompañó las curvas de crecimiento (Tabla N° 15).

Fuente de carbono	pH final	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	consumo de carbono (g/l)	$X_{PHB}$ (%ps)	X (g/l)	proteína (g/l)
glucosa	4.7	0.09	8	48	1.65	0.41
sacarosa	5.8	0.13	7	40	2.75	0.48
fructosa	5.8	0.06	5	a	1.8	0.45
melaza	5.6	0.08	4.5	37	2	0.5
glucosa+ $NH_4^+$	7.2	0.13	9.5	28	1.8	0.75
sacarosa + $NH_4^+$	7	0.13	9.5	16	1.95	0.85
fructosa+ $NH_4^+$	7.5	0.09	6	a	2	0.9

mediciones a 48 h

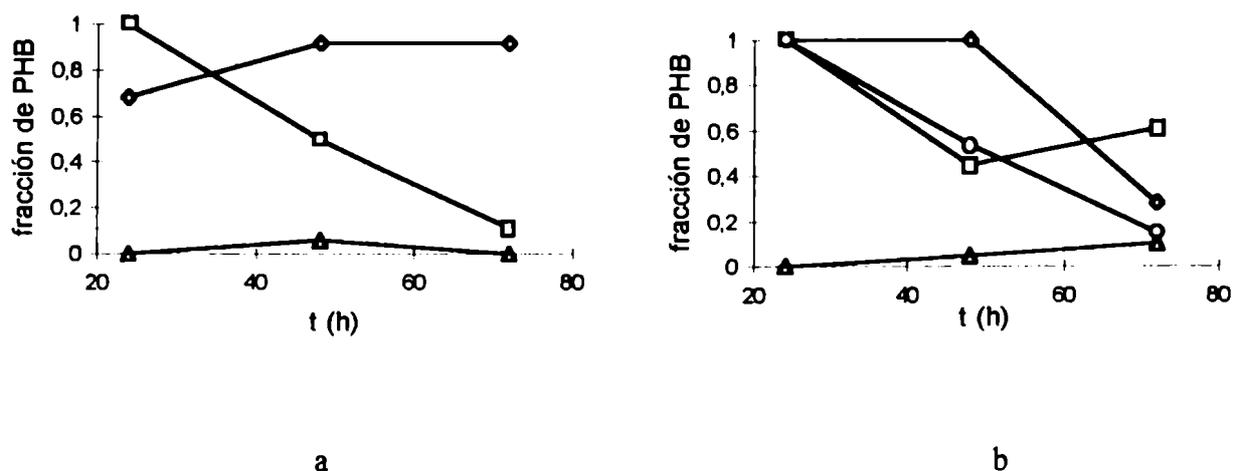
fuentes simples de carbono al 1%. melaza al 5% (p/v)

(a): PHB no detectado

Tabla N° 15: Efecto de la fuente de carbono y del agregado de sulfato de amonio sobre el pH, consumo de carbono y contenido de PHB, con producción simultánea de EPS.

### 3.5.5.3. Fracción de PHB del total de biopolímeros producidos

La fracción de PHB del total de biopolímeros producidos (definida como el cociente entre la concentración de PHB y la de EPS) se calculó de las condiciones experimentadas como función del tiempo de cultivo:



Figuras 27 y 28: Fracción de PHB del total de biopolímeros producidos en medio Bm con diferentes fuentes de carbono a) sin amonio b) con amonio. □ :glucosa 1%, ◇ :sacarosa 1%, Δ :fructosa 1%, ○ :melaza 5% (p/v) (comparada con las fuentes simples con amonio, ver texto)

Las células crecidas en fructosa mostraron el mismo patrón con o sin amonio, asimismo la fracción de PHB fue cercana a cero. Los cultivos con glucosa decrecieron su fracción de PHB en forma continua en el tiempo, pero entre 48 y 72 h, en medio con amonio, la fracción de PHB aumentó significativamente (de 0.45 a 0.61), reflejando la disminución en la producción de EPS, además la concentración misma de PHB disminuyó.

Las mayores fracciones de PHB se obtuvieron con sacarosa. En cultivo con sacarosa suplementada con amonio, la fracción de PHB se redujo significativamente (de 1 a 0.28 entre 48 y 72 h), consistentemente con un aumento de la biosíntesis de EPS (0.33 g/l). Esta tendencia es inversa cuando se la compara con el medio de glucosa con amonio, donde la producción de EPS se redujo entre 24 y 72 h. La melaza tuvo una tendencia similar a la observada con sacarosa más amonio, dado que la principal fuente de carbono en la melaza es la sacarosa.

De los resultados obtenidos (Tabla N° 15), la sacarosa y la melaza fueron los mejores sustratos para producir biomasa, y a pesar que en melaza fue relativamente baja la velocidad específica de crecimiento la biomasa fue mayor que en glucosa y del mismo orden que en fructosa.

La fase lag extendida observada con melaza puede atribuirse al efecto inhibitorio de componentes de la misma, como coloides (que pueden representar el 9-10% de su composición). Sin embargo, este efecto fue superado y las células siguieron creciendo a alta velocidad como en las fuentes simples. Cuando se agregó amonio, el peso seco final fue apenas mayor que en los cultivos en fijación, a excepción de la sacarosa.

Las células crecidas en fructosa produjeron alta concentración de EPS (1.1 g/l, 72 h) probablemente debido a que en el camino biosintético del alginato el intermediario glicolítico fructosa-6-fosfato es el primer metabolito convertido a manosa-6-fosfato por acción de la fosfomanosa isomerasa (PMI) (Pecina y Paneque 1994).

Se observó que los cultivos en fijación favorecieron la producción de EPS antes que la de PHB con nuestra cepa de *Azotobacter chroococcum*, con la excepción de las células crecidas en sacarosa, donde la tendencia fue inversa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos usando *Pseudomonas sp* : alta excreción de EPS se encontró en medio con alta relación C/N con glucosa y fructosa como fuentes de carbono, lo mismo fue observado en cultivos batch bajo exceso de carbono de *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes* (Williams y Wimpenny 1975). También la limitación de nitrógeno favoreció la producción de EPS en cultivos continuos de *A. vinelandii* (Jarman et al. 1978).

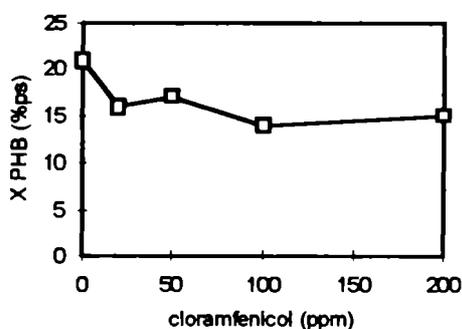
Se verificó la acidificación de los cultivos crecidos bajo condiciones de fijación y con melaza, lo que se correlacionó con la excreción de EPS, excepto para la sacarosa (ver Tabla N° 15 y Figura 26). Estos resultados concuerdan con la observación de que la producción de mucílagos conlleva una disminución del pH en *Azotobacter* (Krieg y Holt 1984).

Conversiones de cerca de 30% del carbono inicial a EPS fueron reportados con dos cepas de *A. vinelandii* a 48 y 110 h de crecimiento (Chen et al. 1985). Estos valores son similares a los obtenidos con *A. chroococcum* 6B.

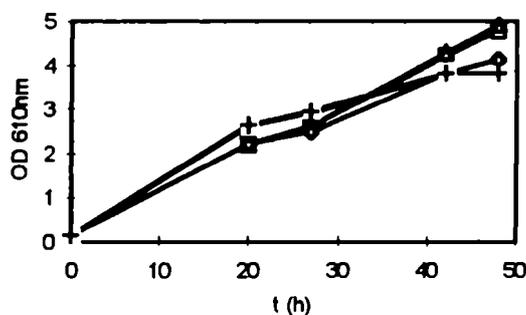
### **3.5.6. Efecto del antibiótico cloramfenicol en erlenmeyers agitados**

Utilizando el antibiótico cloramfenicol, se efectuaron experiencias en una estrategia para determinar si deteniendo la actividad bacteriana en la entrada de la fase estacionaria se impedía la degradación del PHB, una vez que éste ya ha sido acumulado. Para ello, se agregó el cloramfenicol (antibiótico que detiene la síntesis proteica) a final de la fase exponencial de crecimiento (Portoles 1963; Merrick 1965).

Se realizaron cultivos en erlenmeyers (medio Bm con glucosa 1%,  $V_f:V_m$  1:10, 220 rpm, 30°C). A las 42 horas de incubación se efectuó el agregado de cloramfenicol, de tal manera de obtener concentraciones finales de antibiótico de 0 a 200 ppm, con el objeto de determinar la mínima concentración inhibitoria que evite la degradación en fase estacionaria. Las determinaciones del contenido de PHB fueron efectuadas a 48 h. Los resultados se indican en las Figuras 29 y 30.



(a)



(b)

Figuras 29 y 30: Efecto del agregado del antibiótico cloramfenicol en fase estacionaria sobre a) el rendimiento de PHB a 48 h b) sobre la OD 610nm. □ : control, o : 25 ppm, Δ : 50 ppm, ◇ : 100 ppm, + : 200 ppm.

El efecto del cloramfenicol sobre la detención del crecimiento se hizo evidente recién a partir de 100 ppm, en la disminución de la densidad óptica con 100 y 200 ppm entre 42 y 48 h. Concentraciones menores no fueron suficientes para detener el crecimiento. Sin embargo, los

$X_{PHB}$  para 100 y 200 ppm de cloramfenicol a 48 h de cultivo no mostraron diferencias significativas respecto del control (15 y 20%, respectivamente). Estos resultados sugirieron que las enzimas degradativas del PHB son constitutivas, es decir que ya se encontraban biosintetizadas en fase estacionaria, y por lo tanto no puede inhibirse su expresión en fase estacionaria por el agregado de cloramfenicol, ya que el contenido de PHB se mantuvo constante.

### **3.6. Efecto del agregado de compuestos complejos sobre la producción de PHB en el medio Bm con glucosa 1%**

#### **3.6.1. Efecto del agregado de peptona y extracto de levadura**

Se ha sugerido (Page y Cornish, 1993) que la peptona puede actuar como fuente de nitrógeno bajo la forma de aminoácidos en un fijador de nitrógeno como *Azotobacter*, permitiendo así una rápida catabolización de la fuente de carbono y generando un exceso de poder reductor utilizable para la formación de PHB.

En consecuencia, se probó el efecto del agregado al medio Bm de peptona de carne en concentraciones desde 0.05 y 0.2% para dos concentraciones de glucosa ( $V_r:V_m$  1:5, 220 rpm y 30°C) a 48 h de cultivo. Se comprobó que con glucosa al 1% el máximo contenido de PHB se obtuvo con 0.1% de peptona, mientras que con glucosa al 2% fue con 0.05% de peptona. La biomasa final a 48 h fue mayor cuando se suministró más carbono al medio (3.6 y 2.9 g/l, para 1 y 2% de glucosa, respectivamente). El agregado de peptona no afectó los contenidos de biomasa en ambos casos.

Al ensayar otra fuente de aminoácidos como el extracto de levadura al 0.05, 0.1, 0.15 y 0.20% no hubo acumulación de PHB. Al reducir las concentraciones ensayadas (0, 0.01, 0.025 y 0.04%) los  $X_{PHB}$  fueron 45, 32, 35 y 15% a 48 h, respectivamente, indicando que concentraciones mayores a 0.05% interfirieron con la condición de depleción necesaria para la acumulación.

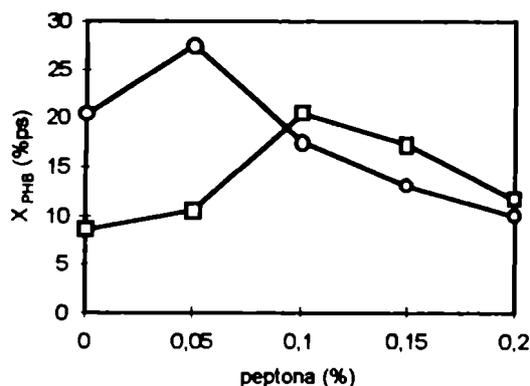


Figura 31: Efecto del agregado de peptona de carne sobre la acumulación de PHB a 48 h de cultivo en medio Bm con dos concentraciones de glucosa. □ : glucosa 1%, o : glucosa 2%.

Estos resultados mostraron que la peptona ejerció un efecto promotor significativo sobre la biosíntesis de PHB en la cepa 6B. La diferente concentración de peptona que produjo el aumento de  $X_{PHB}$  a las dos concentraciones de glucosa experimentadas sugiere la existencia de una relación óptima entre la glucosa y algún componente de la peptona.

El efecto promotor de la peptona sobre el contenido de PHBV ha sido observado también con peptona de pescado en *A. vinelandii* UWD (Page y Cornish 1993) y con peptona de caseína en *Azotobacter beijerinckii* (Bormann et al. 1998). Estos autores observaron que la eficiencia de la producción de PHB dependía de la fuente de nitrógeno y de la concentración de oxígeno en forma simultánea. A pesar de estos resultados, debe tenerse en cuenta que la adición de peptona fragiliza la pared de las células de *Azotobacter*, generando formas pleomórficas osmóticamente débiles (Vela y Rosenthal 1972, Tchan y New 1984). El beneficio de crecer *Azotobacter* en medio con peptona se fundamentaría en la fragilización de la pared celular y consecuentemente la posibilidad de aplicar métodos más sencillos para la extracción del PHB (Page et al. 1995).

### 3.6.2. Efecto del agregado de un extracto de suelo

Dado que existen algunas formulaciones de medios de cultivo para *Azotobacter* sp. que incluyen extractos de suelos (Catalogue of Cultures ATCC 1994) se ensayó el efecto del agregado de un extracto de suelo rizosférico similar al utilizado al comienzo para el

aislamiento de las cepas. Se observó que no existieron diferencias significativas en la biomasa ni en  $X_{PHB}$  obtenidos respecto del control.

Extracto de suelo (% v/v)	X (g/l)	$X_{PHB}$ (% ps)
0	2.5	37
2.5	2.6	35
5	2.45	40

Tabla N° 16: Efecto del agregado de un extracto de suelo al medio Bm con glucosa al 1% a 48 h de cultivo en agitador rotatorio (220 rpm,  $V_r:V_m$  1:10, 30°C).

### **3.7. Cultivos por sistema batch o batch alimentado en fermentadores**

#### **3.7.1. Efecto de la aireación en medio Bm con manitol como fuente de carbono**

##### **3.7.1.1. Cultivo en medio manitol 1% en dos etapas de aireación**

Se cultivó la cepa 6B en fermentador en dos etapas: hasta las 52 horas con un flujo de aire estéril de 2.5 l/min (0.6 vvm) y 100 rpm, y en la segunda etapa se cortó la aireación externa y se redujo la agitación de 200 a 50 rpm. Como resultado se observó que la segunda fase de aireación reducida no aumentó el  $X_{PHB}$ . El máximo contenido de PHB se obtuvo a 48 horas de cultivo, consistente con resultados previos. Cabe señalar que la densidad óptica a 610nm del cultivo con manitol no superó la unidad, siendo la biomasa final baja ( $X=2$  g/l). Los resultados se indican en la Figura 32.

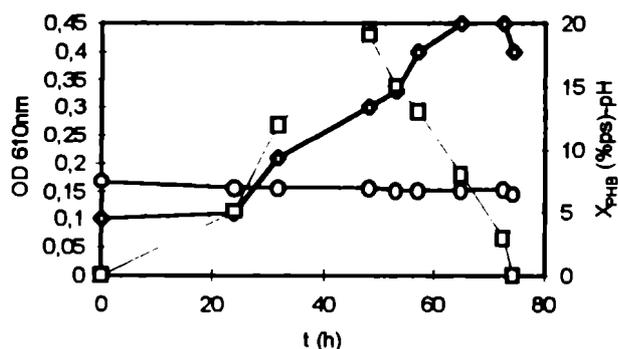


Figura 32: Cultivo en fermentador con manitol como fuente de carbono. ○ pH, □ : X<sub>PHB</sub> (%ps), ◇ : OD 610nm.

### 3.7.1.2. Cultivo en medio manitol 1% con alta aireación y fed-batch de glucosa

Utilizando las mismas condiciones que en sistema anterior se aireó con un flujo de 2.5 l/min (2.5 vvm) y se agitó a 100 rpm. A las 49 horas (entrada en fase estacionaria) se alimentó con glucosa llevando la concentración al 2%. En este experimento se llegó a altas absorbancias (OD<sub>610nm</sub> de 9, 3.5 g/l, a 49 h). Sin embargo la acumulación de PHB fue cercana a cero (máximo 0.5%). Con el fed-batch de glucosa la densidad óptica (biomasa) siguió aumentando y paralelamente la bioacumulación. Se llegó a un máximo de cerca de 8% del peso seco bacteriano a 73 horas (24 horas después del fed-batch). El contenido celular final, X, a 95 horas, fue de 6.5 g/l, siendo el de PHB de 6.3%. El rendimiento final de PHB a partir de la glucosa consumida ( $Y_{PHB/glu}$ ) fue de 0.10 g/g, y un  $Y_{PHB/C_{total}}$  de 0.01 g/g relativo al carbono total, considerando consumo total del manitol (hasta 48 h). Los resultados se indican en la Figura 33.

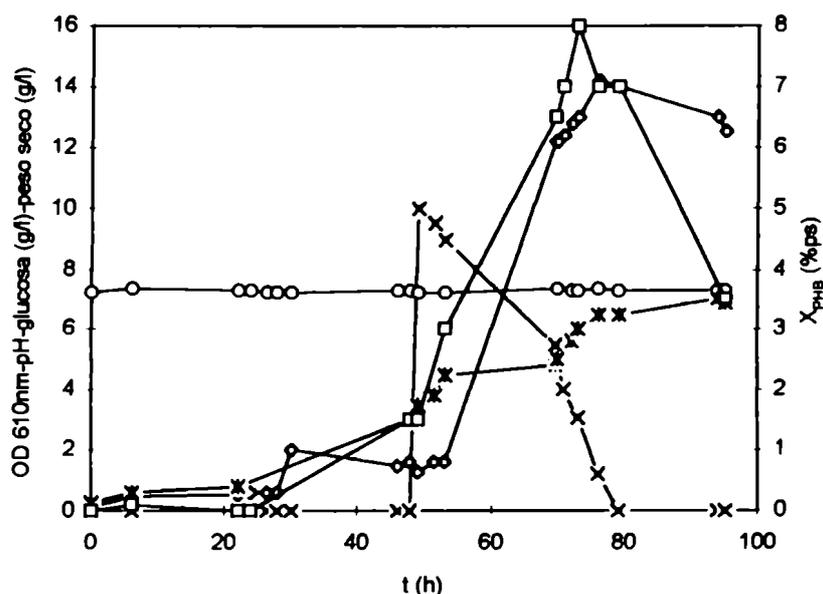


Figura 33: Cultivo en fermentador con manitol bajo alta aireación y fed-batch de glucosa.

□ : X<sub>PHB</sub> (%ps), ◇ : OD<sub>610nm</sub>, ○ : pH, × : glucosa (g/l), \* : peso seco (g/l).

A pesar de la mayor biomasa obtenida por fed-batch, el contenido de PHB alcanzado fue bajo, por lo que se volvió a utilizar la glucosa para estudiar el efecto de la aireación bajo cultivo en fermentador. En primer lugar se estudió el efecto de la agitación de las paletas, luego se muestran los resultados de cuatro fermentaciones a baja (0.25-0.5 vvm) y alta (mayor a 2 vvm) aireación (3.7.2.2. a 3.7.2.4) y el efecto de anaerobiosis en fase estacionaria (3.7.2.5). Excepto en 3.7.2.3, no se agregó nitrógeno combinado al medio de cultivo.

### 3.7.2. Efecto de la aireación en medio Bm con glucosa al 1% como fuente de carbono

#### 3.7.2.1. Agitación óptima (medida en rpm)

Se mencionó anteriormente (ver 2.2.8.2) la influencia de la velocidad de agitación sobre la transferencia de oxígeno en sistemas agitados con utilización de baffles.

Se efectuaron tres fermentaciones con el medio Bm bajo distintas velocidades de agitación: 100, 200 y 400 rpm, sin burbujeo de aire y con una tasa de aireación de 1.5 vvm utilizando un fermentador Bioflo con 1 litro de medio. En la Figura 34 se detallan los perfiles de acumulación de PHB a 48 h y biomasa final en g/l de cultivo:

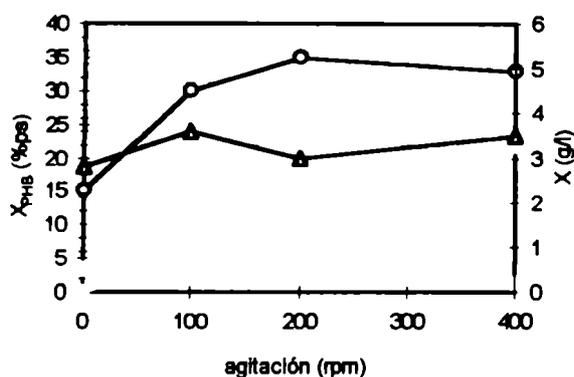


Figura 34: Efecto de la velocidad de agitación de las paletas del fermentador (en rpm) sobre la biomasa y contenido de PHB a 48 h.  $\circ$  :  $X_{PHB}$  (% ps),  $\diamond$   $X$  (g/l).

Se verificó que la biomasa final osciló entre 2 y 3 g/l mientras que el  $X_{PHB}$  medido a 48 h varió entre un 30 y un 35% del peso seco bacteriano.

De los resultados obtenidos se concluye que la agitación de las paletas del fermentador no representó un factor de peso sobre los parámetros de estudio (hasta 1 litro), se prefiere seguir utilizando una agitación baja (100 a 200 rpm). La velocidad de agitación es importante para el cálculo de la potencia necesaria cuando se aumenta la escala, mantener una agitación constante es uno de los criterios cuando se emprende el “scaling-up” (Wang 1979).

### 3.7.2.2. Cultivo en medio Bm con glucosa y baja aireación

Se efectuó una fermentación con medio Bm a 0.25 vvm. En este caso se llegó a un  $X_{PHB}$  máximo de 49% del peso seco a 49 h, con una biomasa final de 2.65 g/l.

La siguiente Tabla muestra la carta de control de la fermentación realizada:

1. Medio de cultivo: Bm
2. Sistema de cultivo: batch

3. Microorganismo: *Azotobacter chroococcum* 6B
4. Inóculo: 25 ml (2.5% v/v) de un cultivo en erlenmeyer en medio Bm de 40 h, OD<sub>610nm</sub> final de 3.5)
5. Volumen de medio (l): 4
6. Agitación (rpm): 100
7. Tasa de aireación (vvm): 0.25
8. Temperatura: 30°C

t (h)	OD <sub>610nm</sub>	pH	X <sub>PHB</sub> (%ps)	Glu (g/l)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (g/l)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g/l)	prot (g/l)	Y <sub>x/c</sub> (g/g)	Y <sub>p/c</sub> (g/g)	PHB/prot (g/g)	peso seco (g/l)
0	0.11	7	0	10	1	0.1	0.2	-	0	0	0.1
6	0.26	6.4	0	9	1	0.08	0.25	0.4	0	0	0.5
23	3.25	6.4	10	8	0.4	0	0.3	0.5	0.05	0.75	1.1
25	3.45	6.4	30	7.5	0.4	0	n	0.48	0.14		1.3
27	3.75	6.4	n	7.1	0.35	0	0.38	0.45			1.4
28	4.5	6.4	28	6.5	0.2	0	n	0.43	0.13	1.7	1.6
29	4.5	6.3	n	n	0.2	0	0.47				n
32	4.6	6.2	41	4.5	0.2	0	0.45	0.41	0.18	2.7	2.4
39	4.6	6.2	41	4	0	0	0.6	0.43	0.18	1.8	2.65
48	4.6	6.2	45	4	0	0	0.6	0.43	0.20	2	2.7
49	4.65	6.2	49	4	0	0	0.6	0.43	0.22	2.2	2.65
50	4.65	6.2	43.5	4	0	0	0.55	0.43	0.19	2.2	2.7

n.: no determinado

Tabla N° 17: Carta de control típica para cultivos realizados en fermentador.

Se observó que la acumulación máxima del biopolímero se produjo a 49 h, este máximo se obtuvo al tiempo en que el cultivo entraba en fase estacionaria, como se observó en los anteriores experimentos.

Los rendimientos de biomasa a partir de la glucosa consumida ( $Y_{x/glu}$ ) variaron entre 0.4 y 0.5, el rendimiento de producto a partir de la glucosa consumida ( $Y_{PHB/glu}$ ) fue máximo a 49 h (0.22 g/g), coincidentemente con la acumulación máxima de PHB (49%).

La proporción de PHB a proteína fue máxima a 32 h (2.7 g/g).

Por último, se observó que el fosfato había sido consumido completamente a 39 h de cultivo, por lo que a partir de este tiempo la condición de deficiencia de nutrientes en el medio puede atribuirse al efecto de limitación de nitrógeno y/o fosfato. Como fue observado que la suplementación de fosfato no tuvo efecto significativo sobre la acumulación de PHB en erlenmeyers agitados (ver 3.3.2, Tabla N°11) se sugiere que la condición de limitación para la acumulación fue impuesta por el nitrógeno.

#### **3.7.2.3. Cultivo en medio Bm con glucosa, baja aireación y fed-batch de glucosa**

El comportamiento de *Azotobacter chroococcum* 6B en estas condiciones fue evaluado previamente (ver 3.3.1.2) en cultivo en fermentador aireado con un flujo de aire estéril de 2 l/min (0.5 vvm), verificándose el aumento significativo del contenido de PHB por el agregado de glucosa a 53 h de cultivo, y también en la biomasa final, respecto del cultivo no alimentado (por ejemplo, 3.7.2.2).

#### **3.7.2.4. Cultivo en medio Bm con glucosa y alta aireación**

Con alta aireación (2.5 vvm) el contenido máximo de biomasa se alcanzó a 15 h de cultivo, la curva de producción de PHB fue paralela al crecimiento (máximo a 17 h de 60% del peso seco). La biomasa final fue de 2.7 g/l ( $Y_{x/\text{glu}}$  0.27). Esta fue similar a la del cultivo con baja aireación (3.7.2.2).

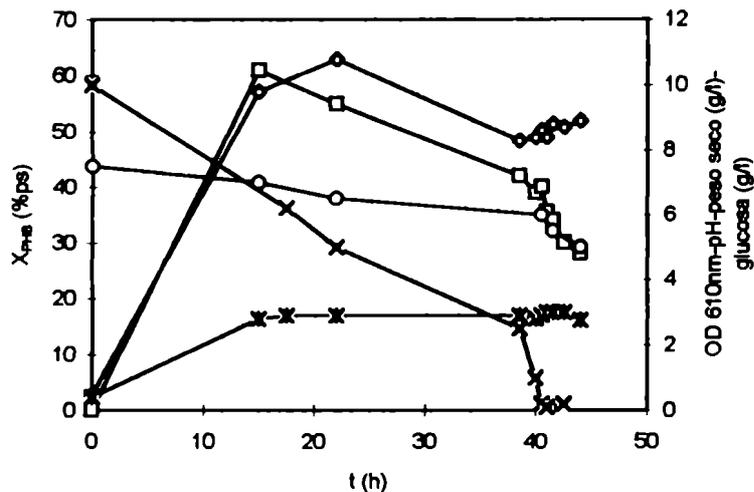


Figura 35: Cultivo en fermentador con alta aireación (2.5 vvm, 200 rpm). : o : pH, ◇ : OD 610nm, □ : X<sub>PHB</sub> (% peso seco), × : glucosa (g/l), \* : peso seco (g/l).

Cuando se cultivó la cepa 6B con baja aireación (3.7.2.2) el X<sub>PHB</sub> máximo se alcanzó 33 h después, siendo la biomasa a ese tiempo similar a la del cultivo a 2.5 vvm a 15 h de cultivo. La alta tasa de aireación permitió llegar antes a altos valores de OD<sub>610nm</sub>, peso seco y contenido de PHB respecto de condiciones de baja aireación (ver Tabla N° 17). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que *Azotobacter* es un microorganismo aerobio de alta tasa metabólica (Aiba et al. 1967). Aunque la productividad de PHB fue alta [(2.7 g/l. 0.60)/ 17 h= 0.11 g/l/h] la concentración máxima alcanzable de PHB en g/l de cultivo fue menor que en otras condiciones experimentadas anteriormente (por ejemplo, ver 3.3.1.2).

### 3.7.2.5. Anaerobiosis creada por burbujeo de nitrógeno en fase estacionaria

Se efectuaron tres cultivos en fermentador en medio Bm a 0.5 vvm y con 0.1 g/l de sulfato de amonio. A dos de ellos se les burbujeó  $N_2$  gaseoso al entrar en fase estacionaria. Al comparar con el batch aeróbico se demostró que la anaerobiosis indujo un aumento significativo en el contenido de PHB. Esto está de acuerdo con el hecho de que la bioacumulación de PHB es inducida por tensiones de oxígeno disuelto (d.o.t.) cercanas a cero (Senior y Dawes 1973). La ventaja de aplicar el  $N_2$  en fase estacionaria radicó en que la biomasa ya ha sido formada en la fase aerobia, de esa forma la glucosa presente fue convertida en PHB intracelular sin ser catabolizada por el ciclo de Krebs. Adicionalmente, la degradación del polímero que se observó en los cultivos aerobios en fase estacionaria (ejemplo 3.2) fue inhibida.

Comparando con el sistema control (batch en fermentador totalmente aerobio) el aumento promedio (valores obtenidos de tres cultivos, uno completamente aerobio y dos con fase final anaerobia) del  $X_{PHB}$  luego de crear la fase anaerobia fue de un 50% (contenidos finales de PHB a 53 h de 21 y 11.5%, respectivamente). En la Figura 36 se indican los perfiles de  $X_{PHB}$  en el tiempo con fase final anaeróbica (promedio) respecto del batch completamente aeróbico.

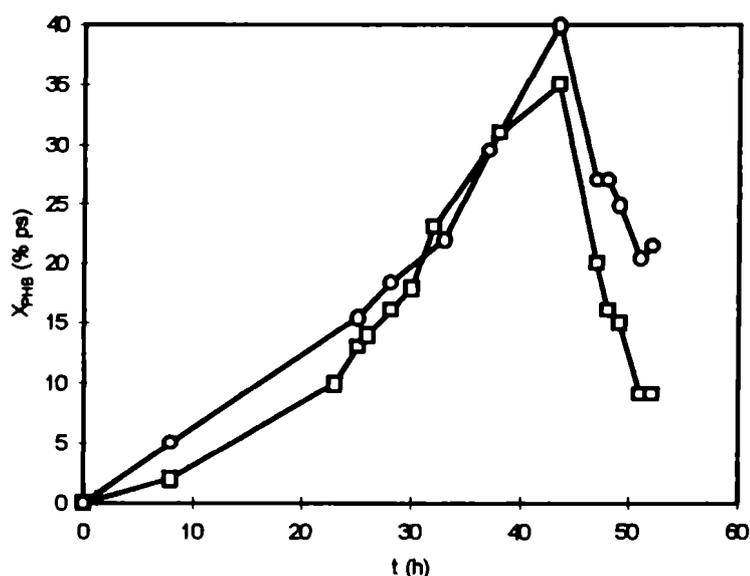


Figura 36: Curvas de acumulación de PHB en fermentador: □ : batch aerobio, ○ : batch fase final anaerobia

Por otro lado, cuando se ensayó el efecto de burbujear oxígeno puro a 0.33 vvm, en lugar de aire, desde tiempo inicial hasta 16 h de cultivo, se obtuvo una reducida biomasa a 24 h (1.1 g/l). Evidentemente el oxígeno puro resultó tóxico para la cepa 6B. En este caso, el sistema de protección respiratoria de *Azotobacter* sp. no alcanzó a compensar la inhibición del crecimiento producida por estrés oxidativo debido al burbujeo de oxígeno puro. El sistema de protección respiratoria actúa aumentando el cociente metabólico o velocidad de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) protegiendo de esta forma a la enzima nitrogenasa, que es inhibida por e oxígeno (Mulder y Botoronegoro 1974).

### **3.7.2.6. Relación entre la tasa de aireación (vvm) la tensión de oxígeno disuelto (% saturación) bajo cultivo en fermentador. Determinación del coeficiente de transferencia de masa ( $K_L a$ ) de oxígeno a distintas tasas de aireación**

El mecanismo de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a los microorganismos está controlado por la resistencia de la fase líquida a permitir el pasaje del gas a la biomasa. La velocidad de transferencia volumétrica de oxígeno  $R_{O_2}$  (en g de  $O_2$ /l.h) puede expresarse matemáticamente como:

$$R_{O_2} = dc/dt = K_L a (C^* - C_L) - q_{O_2} \cdot X \quad (a)$$

donde  $K_L a$  es el coeficiente de transferencia de masa de oxígeno ( $h^{-1}$ ),  $C^*$  es la tensión de oxígeno en el equilibrio en la interfase donde el líquido se encuentra saturado con el gas y  $C_L$  la tensión de oxígeno disuelto en el seno del medio líquido, expresadas ambas como % de saturación o en mg/l.  $q_{O_2}$  es la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, en inglés) y  $X$  la biomasa en gramos/litro.

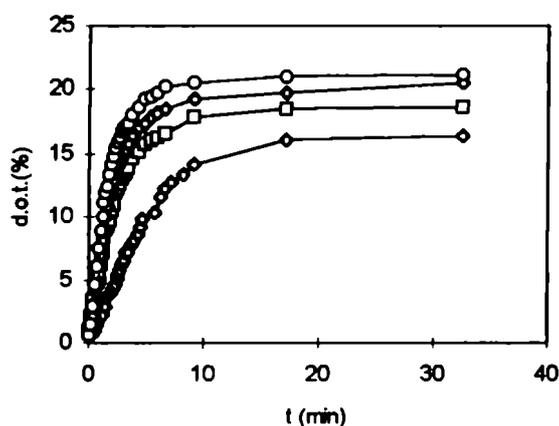
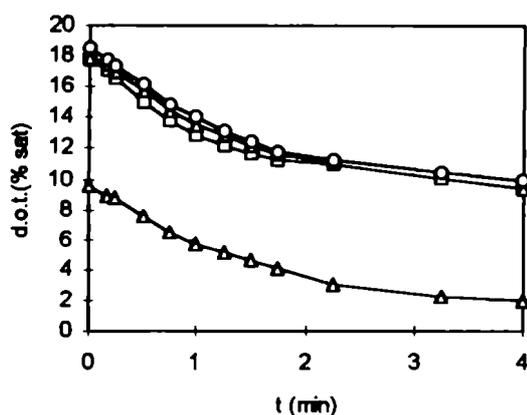
Debido a que el oxígeno es un gas poco soluble en agua, es necesario transferirlo continuamente al medio de cultivo desde la fase gaseosa. Para medir la eficiencia de la transferencia de oxígeno en cada condición de fermentación se recurre al valor de  $K_L a$ . La transferencia del oxígeno del gas a la biomasa depende de varios factores, algunos contribuyen a ella, como la temperatura, la potencia aplicada por unidad de volumen de

cultivo, y la tasa de aireación. Otros reducen la transferencia de oxígeno, como la viscosidad, la formación de espumas y la producción de metabolitos que generen un aumento en la viscosidad del medio de cultivo. Factores como el sistema de agitación influyen sobre  $K_{La}$ : en sistemas con vortex la transferencia es menos eficiente que el sistemas con vortex provistos de baffles en fermentador. Mayores  $K_{La}$  han sido obtenidos cuando un difusor de aire se colocaba cercano a las paletas de agitación en un sistema agitado por vortex (Pirt 1975).

Para la determinación de  $K_{La}$  a distintas tasas de aireación se utilizó la siguiente técnica (de cinética no estacionaria o dinámica): la aireación fue interrumpida, con la subsecuente disminución de la d.o.t. durante un período reducido de tiempo. Aquí la pendiente es  $q_{O_2} \cdot X$ . Luego, la aireación fue reestablecida y el aumento de la d.o.t. registrado en el tiempo será de acuerdo a la ecuación (a) (Figura 42). Para el cálculo de  $K_{La}$ , se prefiere utilizar la forma integrada de la ecuación (a):

$$\ln ( 1 - C/ C_b ) = - K_L a t \quad (b)$$

donde  $t=0$  cuando  $C=0$ , y  $C_b$  es la tensión de  $O_2$  justo antes que la aireación es interrumpida. Entonces, de la pendiente de la anterior ecuación puede obtenerse el valor de  $K_L a$ , para cada tasa de aireación.



Figuras 37 y 38: Descenso de la tensión de oxígeno disuelto (% de saturación) durante un intervalo reducido de tiempo para el cálculo de  $K_{La}$  y aumento del mismo luego del reestablecimiento de la aireación.  $\circ$  : 2.5 vvm,  $\diamond$  : 2 vvm,  $\square$  : 1 vvm,  $\Delta$  : 0.5 vvm. Las medidas se efectuaron en un cultivo en fermentador con  $X$  de 4 g/l a 100 rpm.

Luego de calcular las pendientes de las curvas, de acuerdo a la ecuación b, se graficaron los valores de  $K_{La}$  para cada tasa de aireación (Figura 39):

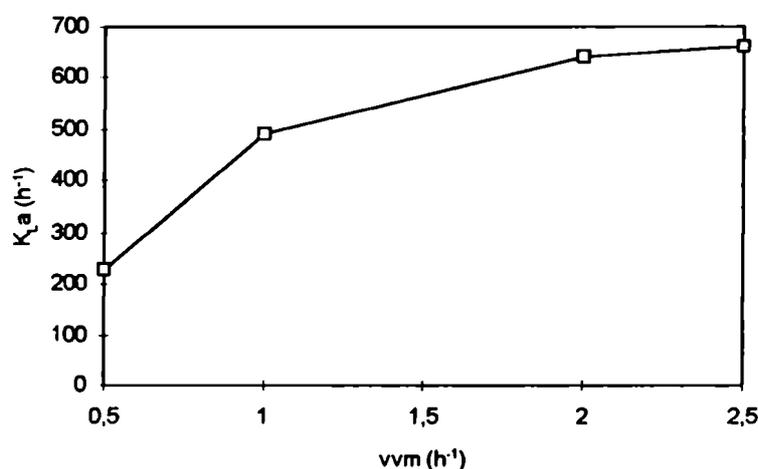


Figura 39:  $K_{La}$  (h<sup>-1</sup>) a diferentes tasas de aireación bajo cultivo en fermentador en medio Bm.

Se observó que  $K_{La}$  aumentó con la tasa de aireación, de la tendencia de la curva se demostró que  $K_{La}$  tiene un valor límite para el sistema de agitación por vortex con baffles utilizado, a la agitación utilizada (ver Materiales y Métodos). Estos resultados confirman la observación de que las velocidades de disolución de oxígeno en sistemas con baffles tienden a un máximo a medida que la tasa de aireación es aumentada, y que no es suficiente aumentar indefinidamente la tasa de aireación para lograr mejores transferencias de oxígeno (Pirt 1975).

### 3.7.2.7. Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) a diferentes tasas de aireación

Una vez conocida la relación entre la tasa de aireación y sus correspondientes coeficientes de transferencia de oxígeno, se investigó el efecto de la tasa de aireación, teniendo como criterio la obtención de alta biomasa y PHB.

Se compararon cultivos en batch realizados en fermentadores, a 100 rpm, con nitrógeno combinado agregado como amonio (0.1 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Se resumen los resultados de experimentar cuatro tasas de aireación: 0.25, 0.5, 1.3 y 2.5 vvm.

Las curvas de crecimiento (medidas por densidad óptica a 610 nm) fueron similares en todos los regímenes de aireación experimentados, pero el rendimiento máximo de biomasa a partir de la glucosa consumida ( $Y_{x/\text{glu}}$ ) fue casi dos veces mayor con 0.5 vvm que con 1.3 vvm. Inversamente, el contenido final de PHB (% peso seco) fue máximo con 0.25 vvm (43.5% del peso seco bacteriano), y cinco veces mayor que en la condición de máxima aireación (2.5 vvm).

A pesar que en este último caso el contenido final de biomasa,  $X$ , fue mayor, el  $Y_{x/\text{glu}}$  fue menor (0.2 g/g) respecto del batch a 0.5 vvm (0.55 g/g). Esto sugiere una mayor catabolización de la glucosa en las condiciones de mayor aireación, reduciendo en consecuencia el  $Y_{x/\text{glu}}$

Los coeficientes calculados de la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  fueron 0.15, 0.24, 0.27 y 0.41  $\text{h}^{-1}$  con 0.25, 0.5, 1.3 y 2.5 vvm respectivamente, todos medidos en fase logarítmica de crecimiento, en relación con  $X_{\text{final}}$ . Los resultados se resumen en la Tabla 18.

Tasa de aireación (vvm)	$Y_{x/glu \text{ max}}$ (g/g)	$Y_{PHB/glu \text{ max}}$ (g/g)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$X_{PHB \text{ max}}$ (a)	$X_f$ (g/l)	$X_{PHB f}$ (b)
0.25	0.4	0.22	0.15	49(49)	3	43.5
0.5	0.55	0.29	0.24	63.5(47)	5 (53h)	26 (c)
1.3	0.32	0.25	0.27	17(48)	4.8	8
2.5	0.38	0.10	0.41	7.6(73)	5	7.6

(a): contenido máximo de PHB, como % del peso seco-(tiempo, h)

(b): PHB final (%ps)

(c): fed-batch de glucosa a 53 h

Tabla N°18: Cultivos en batch a distintas tasas de aireación (relación C/N 69)

### 3.7.2.8. Rendimiento de PHB a partir de la glucosa consumida ( $Y_{P/glu}$ ) durante el cultivo a diferentes tasas de aireación

En la Figura 40 se detalla como varía  $Y_{PHB/glu}$  con el tiempo de cultivo a cada tasa de aireación: pudo observarse que los mayores rendimientos se obtuvieron a bajas tasas de aireación. Sin embargo, en los batchs aireados a 1.3 y 2.5 vvm, el  $Y_{PHB/glu}$  máximo se alcanzó a tiempos menores de cultivo (35-40 h). Durante la fase activa de biosíntesis de PHB (fase de limitación en nitrógeno) los rendimientos se mantuvieron en un rango entre 0.02 y 0.28 g/g.

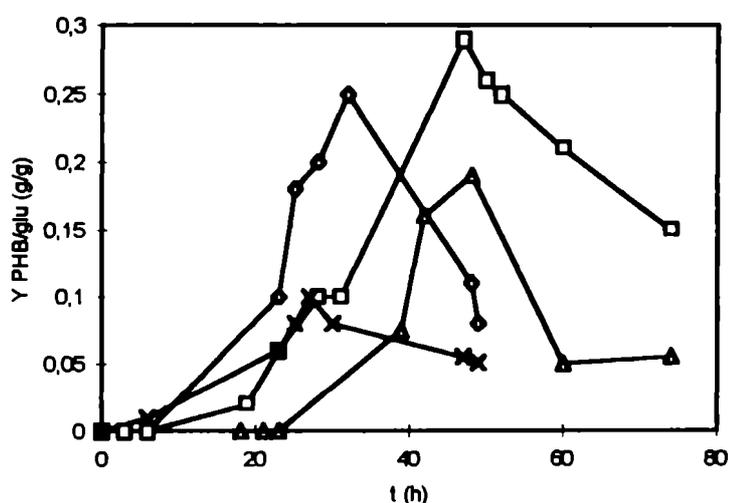


Figura 40:  
Rendimiento de PHB a partir de la glucosa consumida ( $Y_{PHB/glu}$ ) en función del tiempo a distintas tasas de aireación.  $\diamond$  : 0.25 vvm,  $\square$  : 0.5 vvm,  $\Delta$  : 1.3 vvm,  $\times$  : 2.5 vvm.

\* Cultivos a 0.25 y 2.5 vvm terminados a 50 h

### 3.7.2.9. Rendimiento de biomasa a partir de la glucosa consumida ( $Y_{x/glu}$ ) en función del tiempo a diferentes tasas de aireación

La mayor conversión a biomasa se obtuvo con 0.5 vvm (0.55 g/g a 30 h de cultivo). Sin embargo, con una aireación de 2.5 vvm,  $Y_{x/glu}$  fue también elevado (0.4 g/g a 27 h). A partir de la entrada en fase estacionaria en los cultivos a alta aireación (1.3 y 2.5 vvm)

$Y_{x/glu}$ ) se redujo, no observándose este efecto con 0.25 y 0.5 vvm.

Esto puede atribuirse al menor contenido de biomasa (Figura 41):

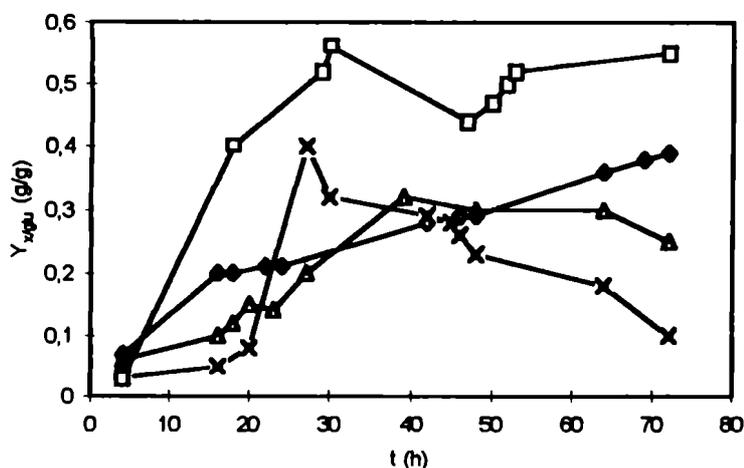


Figura 41: Rendimiento de biomasa a partir de la glucosa consumida ( $Y_{PHB/glu}$ ) en función del tiempo a distintas tasas de aireación.  $\diamond$  : 0.25 vvm,  $\square$  : 0.5 vvm,  $\Delta$  : 1.3 vvm,  $\times$  : 2.5 vvm.

### 3.7.2. 10. Velocidad específica de formación de PHB ( $q_{PHB}$ ) en función del tiempo a distintas tasas de aireación

En cualquier reacción microbiana, la actividad celular para biosintetizar un producto puede medirse por medio de velocidades volumétricas o específicas. Las primeras, medidas en g/l.h, son de mayor practicidad en el caso del manejo de una planta fermentativa, ya que describen la velocidad de síntesis de un producto o de demanda por un sustrato por unidad de volumen del reactor. Por el contrario, las velocidades específicas (g/g biomasa.h) son independientes de la concentración celular y describen con que efectividad las células sintetizan un producto o utilizan un sustrato (Wang 1979).

Cuando un microorganismo produce y acumula PHB en forma intracelular, la biomasa total,  $X_{tot}$ , puede dividirse en la correspondiente a PHB,  $X_{PHB}$ , y a la biomasa residual,

$X_{residual}$ , esta última se obtiene por diferencia de las dos anteriores. Consideraremos que solamente  $X_{residual}$  representa la fracción anabólica (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos). Entonces, las velocidades específicas de formación de PHB,  $q_{PHB}$ , pueden calcularse en base de la biomasa residual, de la siguiente forma:

$$q_{PHB} = \frac{1}{X_{residual} V} \frac{\Delta(X_{PHB} V)}{\Delta t}$$

donde  $V$  es el volumen del medio de cultivo (Pirt 1975).

En la siguiente Figura se detallan los contenidos de PHB en función del tiempo a distintas tasas de aireación:

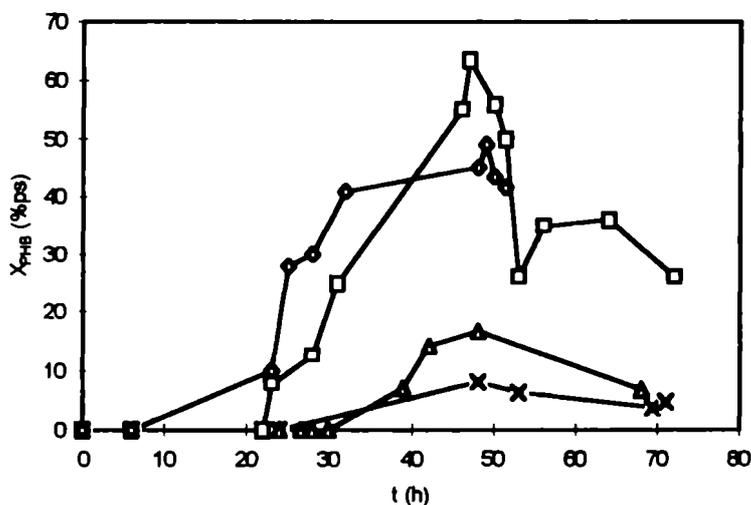


Figura 42: Contenido de PHB en función del tiempo de cultivo a distintas tasas de aireación. ◇ : 0.25 vvm, □ : 0.5 vvm, △ : 1.3 vvm, × : 2.5 vvm.  
Con 0.5 vvm: Fed-batch de glucosa a 53h

A partir de los contenidos de PHB se calcularon las velocidades específicas de formación del polímero. Las  $q_{PHB}$  alcanzaron sus máximos valores con una tasa de aireación de 0.5 vvm entre 31 y 47 h de cultivo ( $0.033-0.037 \text{ h}^{-1}$ ). Además, la  $q_{PHB}$  siguió aumentando hasta las 47 h de cultivo. Con 0.25 vvm los  $q_{PHB}$  disminuyeron respecto de 0.5 vvm:

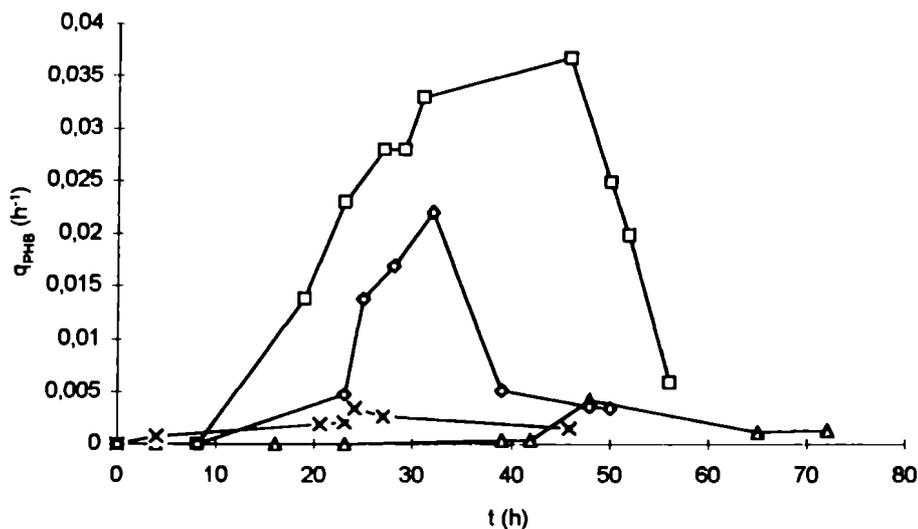


Figura 43: Velocidades específicas de formación de PHB ( $q_{\text{PHB}}$ ) a diferentes tasas de aireación.  $\diamond$  : 0.25 vvm,  $\square$  : 0.5 vvm,  $\Delta$  : 1.3 vvm,  $\times$  : 2.5 vvm. Con 0.5 vvm no se consideró el efecto del fed-batch para los cálculos de  $q_{\text{PHB}}$ .

Estos resultados son consistentes con el hecho bien establecido de que la bioacumulación requiere condiciones de baja aireación y de deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo en *Azotobacter*.

### 3.8. Efecto del nitrógeno combinado (como relación molar carbono/nitrógeno)

Se ha determinado que condiciones estrictas de fijación de nitrógeno no son favorables para la biosíntesis de PHB (Mulder y Brotonegoro, 1974, Page 1992, , Lee et al.1995), también se ha reportado que una concentración residual de amonio en el medio de cultivo mantiene la actividad biosintética de PHB en *Alcaligenes* sp. (Aragao et al. 1994). Por estos motivos, debe determinarse la relación de glucosa a amonio óptima para la acumulación de PHB.

Se observó anteriormente que una concentración inicial de 0.1 g/l de sulfato de amonio en el medio Bm aumentaba el contenido de biomasa y de PHB (ver 2.2.8). Los resultados obtenidos al alterar la relación molar carbono/nitrógeno se indican a continuación en cultivo en fermentador. La relación C/N se varió en el cultivo manteniendo constante la fuente de carbono (glucosa al 1%) e incrementando

sucesivamente la concentración de nitrógeno, como sulfato de amonio. En base a los resultados anteriores, la tasa de aireación se fijó en 0.5 vvm.

### 3.8.1. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) bajo distintas relaciones carbono/nitrógeno (C/N)

Los valores de  $\mu$  bajo diferentes relaciones molares C/N aumentaron con una menor concentración de sulfato de amonio en el medio de cultivo (mayor C/N). El máximo valor de  $\mu$  fue alcanzado con la máxima relación C/N experimentada de 69 ( $0.24 \text{ h}^{-1}$ ) (Tabla N° 19).

### 3.8.2. Velocidad específica de formación de PHB ( $q_{\text{PHB}}$ ) en función del tiempo de cultivo a distintas relaciones C/N

De los resultados experimentales obtenidos de cinco batches realizados en fermentadores a diferentes relaciones C/N, a una aireación de 0.5 vvm, se calcularon las velocidades específicas de formación de PHB relativas a la biomasa residual ( $q_{\text{PHB}}, \text{h}^{-1}$ ), y sus perfiles en el tiempo se muestran en la Figura 44. Con C/N 3.7 y 7.3 se terminaron los batch a 50 h de cultivo. Para el cálculo de  $q_{\text{PHB}}$  a C/N 69 no se consideró el efecto del fed-batch.

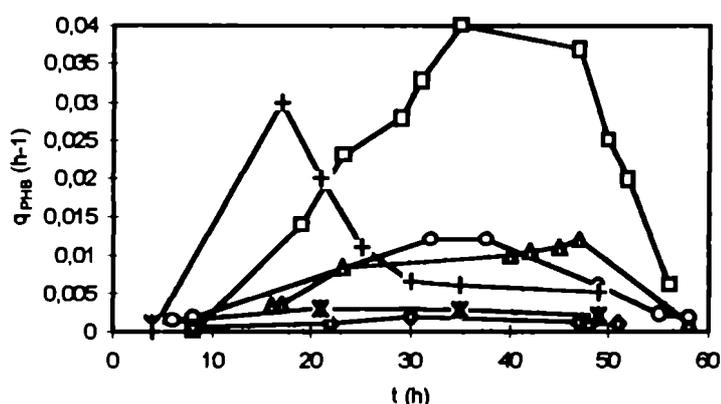


Figura 44:  
Velocidades específicas de formación de PHB ( $q_{\text{PHB}}$ ) a diferentes relaciones molares C/N.  
+ : fijación,  $\Delta$  : 138,  $\square$  : 69,  $o$  : 29,  $\diamond$  : 7.3,  $\times$  : 3.7.

Los máximos valores se obtuvieron con una relación C/N de 69 a 35 h, cuando la tasa de consumo de amonio llegó a su máximo valor. Luego  $q_{\text{PHB}}$  disminuyó a cerca del 10% de su máximo valor ( $0.005 \text{ h}^{-1}$  a 56 h). Cuando en un cultivo por fed-batch realizado en idénticas condiciones se agregó sulfato de amonio a 35 h hasta una concentración final de  $0.1 \text{ g/l}$ , las  $q_{\text{PHB}}$  alcanzaron los altos valores de la fase donde no había limitación de nitrógeno (ver 3.3.2). Los resultados de la Figura 44 sugieren que una concentración mínima de amonio es requerida por la cepa 6B para obtener altas velocidades específicas de formación de PHB. En todas las fermentaciones realizadas, el amonio fue totalmente consumido entre 30 y 40 h, dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada batch.

Las curvas de  $q_{\text{PHB}}$  en función del tiempo aumentaron desde la relación C/N 3.7 hasta 69, luego disminuyeron al aumentar C/N a 138. Con C/N de 7.3 y 3.7 se obtuvieron los mínimos valores, siendo las  $q_{\text{PHB}}$  menores a  $0.005 \text{ h}^{-1}$  (aunque no significa que los contenidos de PHB sean proporcionalmente bajos). En el caso de condiciones de fijación de nitrógeno, la  $q_{\text{PHB}}$  máxima se alcanzó tempranamente a 17 h, luego disminuyó en forma continua hasta fin de la fermentación.

### **3.8.3. Rendimiento para la conversión de glucosa en PHB ( $Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$ ) en función del tiempo de cultivo a diferentes relaciones C/N**

Para los cultivos realizados a distinta relación C/N y aireados a  $0.5 \text{ vvm}$  se calcularon los rendimientos  $Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$  en función del tiempo, verificándose que siguieron una tendencia similar a la de las velocidades específicas de formación de PHB (ver 3.8.2). Esta tendencia se mantuvo debido a que la biomasa no-PHB fue paralela a la curva de peso seco bacteriano total, y además el consumo de glucosa fue paralelo a la curva de peso seco en las cuatro fermentaciones. En la curva correspondiente a C/N 69 el aumento significativo en  $Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$  a 60 h se debió al fed-batch de glucosa efectuado a las 53 h de cultivo :

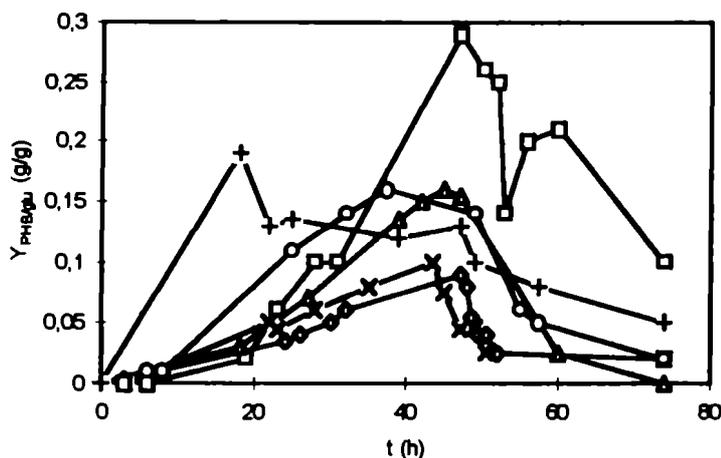


Figura 45: Evolución en el tiempo del rendimiento de PHB a partir de la glucosa consumida ( $Y_{\text{PHB/glu}}$ ) para diferentes relaciones C/N. + fijación,  $\Delta$  138,  $\square$  : 69, o : 29,  $\diamond$  7.3,  $\times$  : 3.7.

A C/N 69: fed-batch de glucosa a 53 h

A 48 h de cultivo se observó que con una relación C/N de 69 se obtuvo  $Y_{\text{PHB/glu}}$  cercanos al máximo (0.29 g/g). Los contenidos máximos ( $X_{\text{PHB}}$ ) se obtuvieron cerca de las 48 h para todas las fermentaciones, excepto para las efectuadas en condiciones de fijación de nitrógeno (donde se encontró a 17-22 h) y fueron en promedio tres veces mayores que a tiempo final de cultivo. En la Tabla N° 20 se indican los resultados obtenidos a tiempo final de cultivo:

C/N (mol/mol)	$Y_{x/\text{glu max}}$ (g/g)	$Y_{\text{PHB/glu max}}$ (g/g)	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$X_{\text{final}}$ (g/l)	$X_{\text{PHB max}}$ (a)	$X_{\text{PHB}}$ (%ps)(b)
fijación	0.5	0.16	0.13	2.8	49 (17)	17
3.7	0.4	0.10	0.11	2.5	17(43.5)	5.1
7.3	0.45	0.09	0.14	4.5	16.5(47)	7
29.1	0.55	0.16	0.12	4.7	36.5(47)	12.8
69	0.55	0.29	0.24	5	63.5(47)	26
138	0.25	0.16	0.17	2.8	24(49)	8

(a) Contenido de PHB máximo (%ps)-(tiempo)

(b) Contenido de PHB final

Tabla N° 20: Rendimientos de biomasa y PHB a partir de la glucosa ( $Y_{x/\text{glu}}$ ,  $Y_{\text{PHB/glu}}$ ), velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y contenido de PHB ( $X_{\text{PHB}}$ ) en cultivos en batch a distintas relaciones molares C/N (tasa de aireación 0.5 vvm) a 72 h de cultivo.

Los  $Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$  aumentaron de manera similar a las  $q_{\text{PHB}}$  en condiciones de fijación, reflejando que el máximo contenido de PHB fue alcanzado antes de las 20 h de cultivo.

#### 3.8.4. Rendimiento de biomasa a partir de la glucosa consumida ( $Y_{x/\text{glu}}$ ) en función del tiempo de cultivo a diferentes relaciones C/N

Cuando se analizó el rendimiento de biomasa ( $Y_{x/\text{glu}}$ ) se encontró que en general se mantuvo entre 0.4 y 0.5 g/g, en el tiempo de cultivo para todas las relaciones C/N ensayadas, excepto en condiciones de fijación, donde se mantuvo entre 0.3 y 0.35 g/g durante toda la fermentación. En condiciones de fijación  $Y_{x/\text{glu}}$  fue menor, indicando que parte de la glucosa fue destinada a producir energía como ATP y NADPH para la fijación, limitando la cantidad de glucosa convertible a biomasa (Lee et al. 1995).

#### 3.8.5. Velocidad de reducción específica de PHB ( $k_d$ ) bajo diferentes relaciones C/N

Como se ha descrito, el PHB es degradado por *Azotobacter chroococcum* 6B una vez que el cultivo aeróbico entra en fase estacionaria. Para evaluar cuantitativamente este efecto se calcularon las velocidades específicas de reducción de PHB, definidas como:

$$k_d = \frac{1}{t_1 - t_2} \ln \frac{q_{\text{PHB}2}}{q_{\text{PHB}1}}$$

El coeficiente  $k_d$  se obtuvo a partir de los valores de  $q_{\text{PHB}}$ , asumiendo que los perfiles de  $q_{\text{PHB}}$  vs. tiempo siguen un modelo de decaimiento mono molecular (Suzuki et al 1986).

$k_d$  aumentó al aumentar la relación C/N, llegando a 0.2 h<sup>-1</sup> con C/N 138. La Figura 47 muestra que existe una relación exponencial, dentro del error experimental, hasta C/N 138.

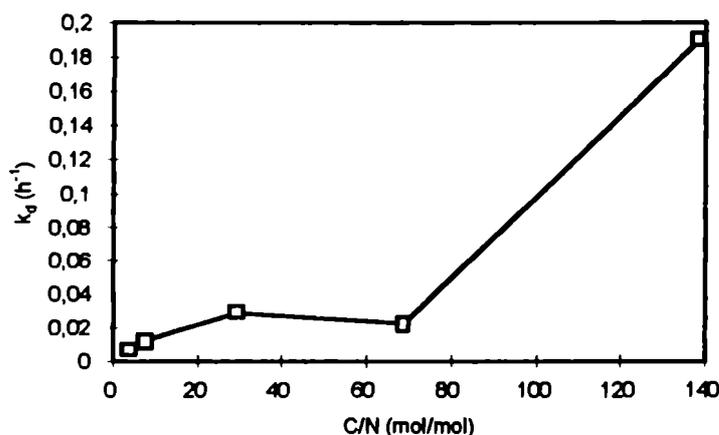


Figura 47: Coeficiente de reducción de PHB ( $k_d$ ) en función de la relación C/N.

En condiciones de fijación de nitrógeno,  $k_d$  fue de  $0.18 h^{-1}$ , similar al obtenido con la mayor relación C/N experimentada ( $0.19 h^{-1}$ ). Esto sugirió que la ausencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo durante la fase estacionaria es el factor que contribuye indirectamente a aumentar el coeficiente  $k_d$ , ya que sin amonio el pH disminuyó a valores de 5-5.5 luego de alcanzado el  $X_{PHBmax}$  en el cultivo bajo fijación de nitrógeno (ver 3.7.2.4). Con C/N 138, el pH en la etapa de degradación fue de 5.8 a 6.2.

### 3.8.6. Productividad volumétrica de PHB a diferentes relaciones C/N

Para obtener PHB en la forma más eficiente, se requiere obtener: 1) la mayor cantidad posible de células, 2) con el mayor contenido de PHB, 3) en el tiempo de operación más corto posible. Estos requisitos están considerados en la productividad, definida como  $P = X_{PHB} (g/l) / t$

A su vez, el tiempo del proceso,  $t$ , es la suma del necesario para limpieza, llenado, esterilización y vaciado del fermentador en el que se cultiven las células. En nuestros cálculos, tomamos  $t$  como el tiempo desde la inoculación de la cepa 6B en el fermentador ya listo para operación. La productividad influye directamente sobre el costo de un proceso fermentativo. La máxima productividad volumétrica de PHB ( $P_{PHB}$ ,

g/l.h) se estimó de la pendiente de la tangente de las curvas que representan  $X_{\text{PHB}}$  (g/l) vs. tiempo (Figura 48)

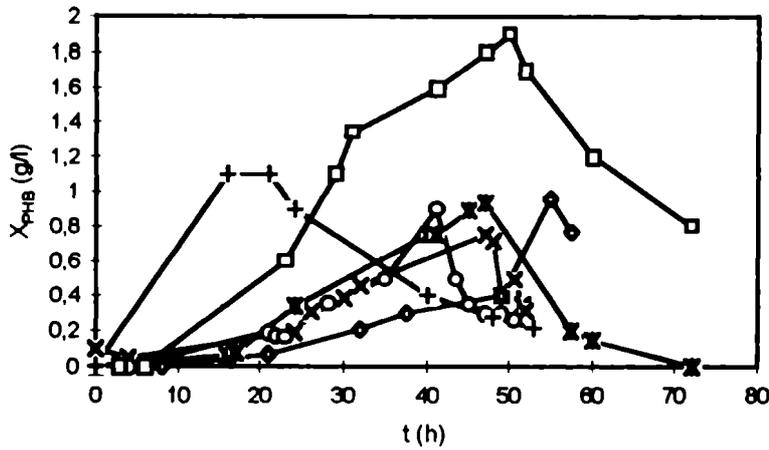


Figura 48: Contenido de PHB (g/l) a diferentes relaciones C/N. + : fijación, \* : 138, □ : 69, o : 29, ◇ : 7.3, x : 3.7.

La productividad máxima bajo cultivo en fermentador se obtuvo a C/N 69. En la Figura 49 se graficaron las productividades obtenidas.

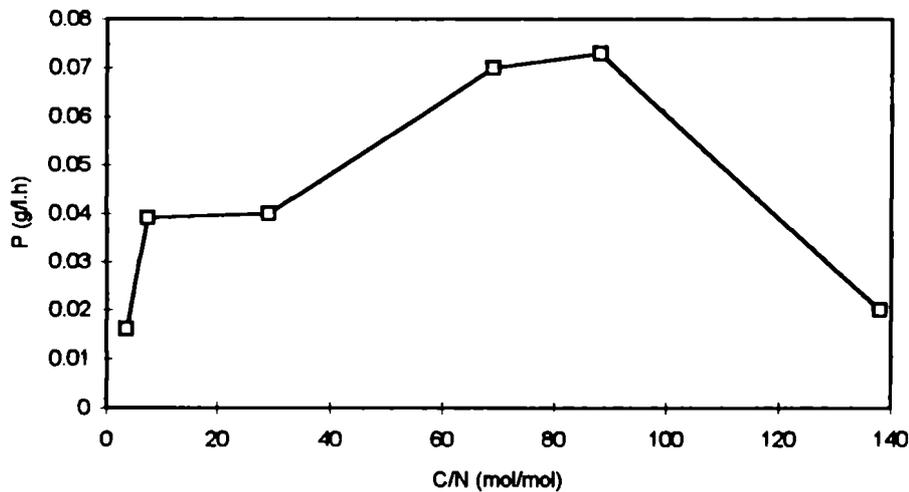


Figura 49: Productividad volumétrica máxima de PHB (g/l.h) a diferentes relaciones C/N (0.5 vvm)

Cuando se calculó la productividad en condiciones de fijación a 0.5 vvm se obtuvo un valor de 0.06 g/l.h [(0.49.2 g/l)/17 h].

### 3.8.7. Cálculo de la energía de mantenimiento (m) en medio Bm con diferentes relaciones C/N

Además de requerir energía para la biosíntesis, las bacterias necesitan de energía para el mantenimiento de la estructura celular, transporte activo de nutrientes del medio hasta el

citoplasma, recambio de componentes celulares (turn-over), movilidad y para establecimiento de gradientes de concentración a través de la membrana plasmática (Wang 1979). Cuando se obtienen los coeficientes de rendimiento de biomasa a partir del consumo del sustrato,  $Y_{x/s}$ , estos dan cuenta del rendimiento total, que considera la utilización del sustrato (generalmente consideramos la fuente de carbono) para la producción de biomasa y mantenimiento. Además, si el microorganismo produce algún metabolito extracelular, parte del sustrato se utilizará para la producción de ese metabolito.

Entonces, el consumo del sustrato en un intervalo de tiempo  $dt$  se puede expresar como:

$$[ds/dt]_{total} = [ds/dt]_{crecim} + [ds/dt]_{mant} + [ds/dt]_p$$

donde  $[ds/dt]_{crecim}$  representa el consumo del sustrato para el crecimiento celular,  $[ds/dt]_{mant}$  el consumo para mantenimiento y  $[ds/dt]_p$  el correspondiente al consumo de sustrato para la formación de un producto extracelular.

Si se considera que el término  $[ds/dt]_p$  es cero porque no hay producción de metabolito extracelular, y se reemplaza cada término en función de los parámetros de crecimiento, se obtiene:

$$\mu X / Y_{x/c total} = \mu X / Y_{x/c crecim} + m X$$

dividiendo por  $\mu X$  se obtiene:

$$1 / Y_{x/c total} = 1 / Y_{x/c crecim} + m / \mu$$

donde  $m$  es el coeficiente de mantenimiento.

Los coeficientes de energía de mantenimiento fueron calculados de las pendientes de las curvas de  $1/Y_{x/c total}$  vs.  $1/\mu$  ( $\mu$ , velocidad específica de crecimiento,  $h^{-1}$ ) para cada cultivo en batch en fermentador a diferente relación C/N desde 3.7 a 69. Los valores fueron

menores que 0.03 g glucosa/ g células. h, decreciendo ligeramente con una menor relación C/N. Cuando se calculó el rendimiento de biomasa a partir de la glucosa utilizada para proveer energía ( $Y_E$ ), a partir de los resultados experimentales), asumiendo 0.58 como la fracción de biomasa que es carbono, se observó ahora que la glucosa derivada o disipada como energía fue mayor con las menores relaciones C/N experimentadas (3.7 y 7.3). La glucosa desasimilada fue menor al 30% de la inicial en todos los casos (Tabla 21). Para obtener estos resultados se utilizó la siguiente relación (Stouthamer and Bettenhausen, 1973):

$$Y_E = \gamma Y_{x/glu} / (\gamma - \beta Y_{x/glu})$$

donde  $Y_E$  representa los gramos de biomasa obtenidos por cada gramo de glucosa utilizada para proveer energía,  $\gamma$  es la fracción del sustrato que es carbono (0.4 para la glucosa) y  $\beta$  es la fracción de carbono en la biomasa.

C/N (molar)	$Y_E$ (g cél/g glucosa)	m (g glucosa/ g cel.h)	glucosa desasimilada (%)
3.7	1.4	0.012	29
7.3	1.3	0.023	26
29.1	2.7	0.025	17
68.9	2.7	0.03	27
fijación	0.95	0.086	30

Tabla N° 21: Rendimiento energético de biomasa a partir de glucosa y glucosa desasimilada a diferentes relaciones C/N.

Los valores obtenidos para el coeficiente de energía de mantenimiento se encontraron dentro del mismo orden que los obtenidos por otros autores (Pirt 1975, Wang 1979).

En condiciones de fijación de nitrógeno, el coeficiente de mantenimiento fue de 0.086 g/g.h. Este resultado fue consistente con el hecho de que se requiere más energía para el proceso de fijación de nitrógeno.

### **3.9. Modelo de productividad y cinética del PHB en cultivos batch y fed-batch en medio Bm**

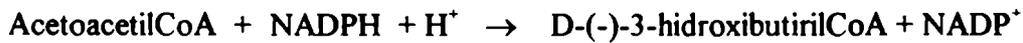
Varios modelos han sido desarrollados para explicar la biosíntesis de PHB en distintos microorganismos (Asenjo y Suk 1985; Sonnleitner 1979; Heinzle y Lafferty 1980). En nuestro caso, se aplicaron los resultados obtenidos a un modelo teórico para la biosíntesis de bioplásticos microbianos (Yamane, 1992). Este modelo tiene en cuenta los caminos metabólicos que llevan a la formación de PHB, con el objetivo de predecir los rendimientos reales de PHB a partir de la fuente de carbono utilizada.

En este modelo, se tiene en cuenta el reciclado o regeneración de  $\text{NADP}^+$ , que es cosustrato para la acetoacetyl-CoA reductasa, una de las tres enzimas de la biosíntesis de PHB. Dos enzimas son consideradas como generadoras de  $\text{NADP}^+$ : glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (GPDH, del camino Enter-Doudoroff) e isocitrato deshidrogenasa (del ciclo de Krebs). En base a esto se derivó una ecuación que predice los rendimientos reales de PHB, con formación paralela de biomasa no-PHB, como función de los rendimientos teóricos y el contenido de PHB en el total de la masa seca celular. Esta ecuación predice que el cociente entre el rendimiento real al teórico de PHB es proporcional al contenido de PHB.

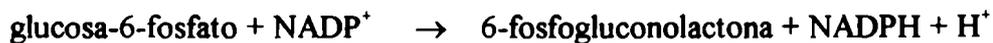
Como de todos los sustratos requeridos la fuente de carbono es la que más incide sobre la producción de PHB (compuesto sólo de C, H y O) solamente esta es considerada. El rendimiento teórico de PHB a partir de la fuente de carbono utilizada ( $Y_{p/c}^{\text{teo}}$ ) es aquel en el que se considera cuando el producto se forma en ausencia de formación de biomasa no-PHB. Como es obvio, este rendimiento es el máximo alcanzable. El rendimiento real ( $Y_{p/c}^{\text{ov}}$ ) considera la previa o simultánea formación de biomasa no-PHB, como es la situación obtenida en nuestros experimentos.

$Y_{p/c}^{\text{teo}}$  se estima considerando los caminos metabólicos involucrados. PHB se sintetiza a partir de acetyl-CoA por medio de tres reacciones secuenciales catalizadas por la 3-

cetotiolasa, la acetoacetylCoA-reductasa y la PHB sintasa. La segunda enzima está acoplada a NADPH, a través de la siguiente reacción:

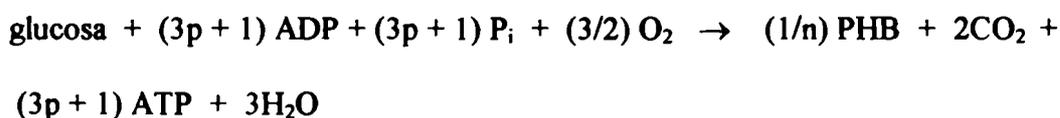


A su vez, para que siga sintetizándose PHB debe regenerarse NADPH a partir del  $\text{NADP}^+$  producido. Esto se realiza, como se indicó, con la GPDH del camino de Enter-Doudoroff, por medio de la siguiente reacción:



La isocitrato deshidrogenasa es preferencialmente utilizada como regeneradora de NADPH cuando se provee a la bacteria de alcoholes, ácidos orgánicos, alcanos u otras fuentes de carbono.

Entonces, en el caso de *Azotobacter* sp., que utiliza el camino de Enter-Doudoroff (Yamane 1992) para catabolizar la glucosa del medio Bm, la ecuación global para la formación de PHB es:



donde  $p$  es el cociente P/O. De esta reacción,  $Y_{p/c}^{\text{teo}} = 86/180 = 0.48$ . Se considera también en esta ecuación la formación de ATP y  $\text{NAD}^+$ , ya que un desbalance de la relación ATP/ADP y/o  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  puede alterar el normal flujo de los metabolitos dentro de la célula. En condiciones aeróbicas, el reciclado de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  se logra principalmente por medio de la cadena respiratoria, y es acompañado por la formación de varios moles de ATP por cada mol de NADH.

Entonces, si consideramos que el total del carbono consumido,  $-\Delta S_{tot}$ , puede ser dividido en dos partes: la convertida a PHB,  $-\Delta S_1$ , y la convertida a biomasa no-PHB,  $-\Delta S_2$ , tenemos

$$-\Delta S_{tot} = (-\Delta S_1) + (-\Delta S_2) \quad (1)$$

como el PHB es un producto intracelular, la biomasa total,  $\Delta x_{tot}$ , consiste en dos partes: el PHB,  $\Delta p$ , y la biomasa residual,  $\Delta x_{residual}$ . Entonces

$$\Delta x_{tot} = \Delta p + \Delta x_{residual} \quad (2)$$

Definiendo matemáticamente los rendimientos teóricos y reales como se mencionó anteriormente:

$$Y_{p/c}^{teo} = (\Delta x_{residual})/(-\Delta S_2) \quad \text{y} \quad Y_{p/c}^{ov} = \Delta p/(-\Delta S_{tot}) \quad (3)$$

y aplicando la expresión del rendimiento de biomasa,  $Y_{x/c}$ , a partir de  $\Delta S_2$ :

$$Y_{x/c} = (\Delta x_{residual})/(-\Delta S_2) = [(1 - C_p)/C_p] \Delta p / (-\Delta S_2) \quad (4)$$

donde  $C_p$  es el contenido de PHB referido a la biomasa total.

Cuando se substituye  $\Delta S_{tot}$ ,  $\Delta S_1$  y  $\Delta S_2$  de (3) y (4) en (1) se obtiene

$$\frac{Y_{p/c}^{ov}}{Y_{p/c}^{teo}} = \frac{C_p}{Y_{p/c}^{teo}/Y_{x/c} + (1 - Y_{p/c}^{teo}/Y_{x/c}/C_p)} \quad (5)$$

A partir de esta ecuación puede obtenerse el rendimiento real de producto, en función del rendimiento teórico y de  $C_p$ . Cuanto mayor es  $C_p$ , tanto mayor es el rendimiento real, pero obviamente siempre menor al rendimiento teórico.

### 3.9.1. Rendimiento real de PHB ( $Y_{p/c}^{ov}$ ) como función del rendimiento teórico ( $Y_{p/c}^{teo}$ ), del rendimiento de biomasa ( $Y_{x/c}$ ) y contenido de PHB a diferentes relaciones C/N

Basándonos en el modelo descrito, los  $Y_{p/c}^{ov}$  para la biosíntesis de PHB a partir de la glucosa consumida fueron calculados como función del rendimiento teórico de PHB,  $Y_{p/c}^{teo}$ , del rendimiento de biomasa y contenido de PHB (% del peso seco). El cociente entre el rendimiento real y el teórico ( $Y_{p/c}^{ov} / Y_{p/c}^{teo}$ ) vs. g PHB/g peso seco ( $C_{PHB}$ )

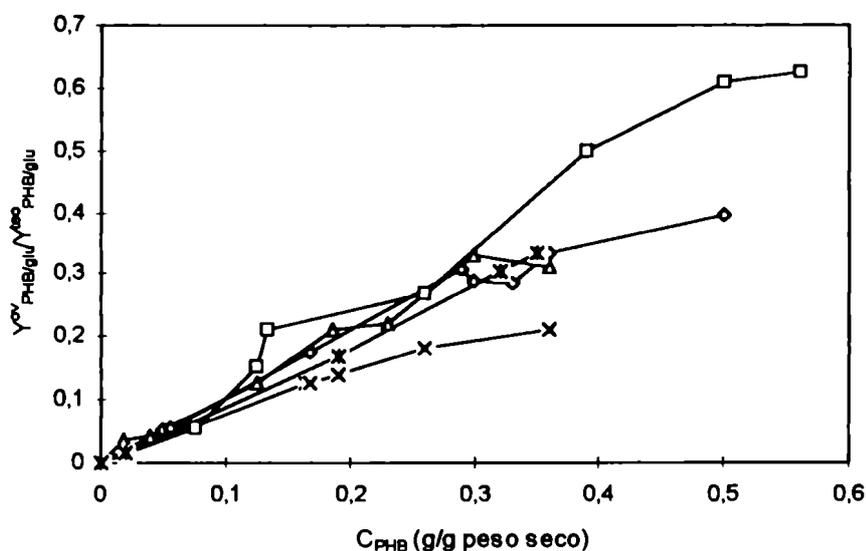


Figura 50: Diagrama para estimar  $Y_{p/c}^{ov}$  como función de  $Y_{p/c}^{teo}$ ,  $Y_{x/c}$  y  $C_{PHB}$  (g PHB/g peso seco) para cuatro cultivos en batch realizados a diferentes relaciones C/N. \* 138,  $\square$  : 68.9,  $\diamond$  : 29.1,  $\Delta$  : 7.3,  $\times$  : 3.7.

aumentó cuando la relación C/N se incrementó de 3.7 a 69 (relación molar) (Figura 50). Los valores del cociente  $Y_{p/c}^{teo}/Y_{x/c}$  en las curvas  $Y_{p/c}^{ov}/Y_{teop/c}$  vs. g PHB/g peso seco para diferentes relaciones C/N oscilaron entre 0.8 y 1.3. De esta manera, y analizando la ecuación,  $Y_{p/c}^{ov}/Y_{p/c}^{teo}$  puede considerarse aproximadamente proporcional al contenido de PHB (g PHB/ g peso seco). La Tabla N° 22 muestra los valores calculados de  $Y_{p/c}^{ov}$  para cada cultivo realizado a cuatro diferentes relaciones iniciales C/N. El máximo  $Y_{p/c}^{ov}$  fue de 0.31 g/g a C/N 69. Esto significa que 3.2 kg de glucosa son necesarios para la producción de 1 kg de PHB en las condiciones de cultivo ensayadas.

C/N (molar)	$Y_{x/c}$ (g/g)	$Y_{p/c}^{ov}$ (g/g)
3.7	0.4	0.09
7.3	0.45	0.15
29.1	0.55	0.17
69	0.55	0.31
138	0.25	0.15

Tabla N° 22: Rendimientos reales de PHB ( $Y_{PHB/glu}^{ov}$ ) y de biomasa ( $Y_{x/glu}$ ) obtenidos de cultivos a diferentes relaciones molares C/N

$C_{PHB}$ :0.6,  $Y_{x/c}$  (g/g) correspondiente a condiciones de cultivo balanceadas.  $Y_{p/c}^{ov}$  (g/g) fueron interpolados de la Figura 46.

La representación gráfica de la Figura 50 es de utilidad dado que permite estimar en forma rápida los  $Y_{PHB/glu}^{ov}$  obtenibles con los datos experimentales de los contenidos de PHB y el valor de  $Y_{x/glu}$  bajo condiciones de cultivo balanceadas.

En la Tabla N° 23 se compara la máxima  $P_{PHB}$  alcanzada con *Azotobacter chroococcum* 6B, calculada de los resultados anteriores, con otras productividades de PHB obtenidas por otros microorganismos, tomadas de la Bibliografía.

Bacteria	fuelle de carbono	X (g/l)	X <sub>PHB</sub> (%ps)	t (h)	P <sub>PHB</sub> (g/l.h)
Alcaligenes eutrophus c	fructosa	3.7	58	47	0.079
Azotobacter chroococcum 6B b	glucosa	5	63	47	0.07
Protomonas extorquens c	metanol	136	64	121	1.12

a. Mulchandini et al. 1989 b. este estudio c. Suzuki et al. 1986: cultivo alimentado controlado por computadora

Tabla N° 23: Comparación de la productividad de PHB (P<sub>PHB</sub>, g/l.h) con diferentes generos bacterianos.

#### 4. Cultivo en medio Bm utilizando fuentes de carbono complejas

Con el fin de reducir el costo de producción de PHB se ensayó la posibilidad de reemplazar la glucosa en el medio Bm por un sustrato carbonado de menor costo. Este sustrato debe cumplir con los siguientes requisitos:

- tener una concentración adecuada de hidratos de carbono o de una fuente de carbono asimilable por la cepa 6B
- no debe incluir inhibidores de la formación de biomasa con alto contenido de PHB
- la composición debe ser constante
- debe ser fácilmente disponible, y a bajo costo.

Los carbohidratos son tradicionalmente las fuentes de energía en la industria de la fermentación. Por razones económicas, la glucosa o sacarosa pura sólo son utilizadas en procesos que requieren un control exacto de la fermentación.

Idealmente, si se tratare de un subproducto agroindustrial, su utilización para la síntesis de bioplásticos sería una alternativa para su aprovechamiento y consecuente reducción en la generación de efluentes en las agroindustrias (Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, Roma, 1978). Entre los sustratos que son fuentes más baratas de carbohidratos encontramos las melazas, extracto de malta, almidón y dextrinas, licores sulfíticos de papeleras y aceites vegetales, estos últimos utilizados principalmente como cosustratos. De todos ellos, las melazas son más apropiadas para el crecimiento de bacterias, mientras que los otros son utilizados para hongos, microorganismos amilolíticos y levaduras (Crueger y Crueger 1989). A continuación se indican los resultados obtenidos con los sustratos ensayados.

#### **4.1. Sacarosa sin refinar (origen Tucumán)**

Se utilizó sacarosa sin refinar, (SSR), (azúcar integral de caña) con un contenido de 97% de sacarosa. Es un polvo amarronado, casi totalmente soluble en agua a 20°C, dejando un residuo seco del 1%.

Con el fin de verificar si la producción aumentada de EPS con la concentración creciente de SSR podía ser reducida, pero manteniendo altos contenidos de PHB, se trataron soluciones de SSR con una resina de intercambio catiónico Amberlite en batch, en tres ciclos de 4 h de duración. Este protocolo se adoptó teniendo en cuenta el hecho conocido (Kamat et al., 1995) de que altas concentraciones de cationes como calcio y magnesio pueden inducir la biosíntesis de EPS. El tratamiento con la resina tuvo por objetivo reducir la concentración de cationes, resinas de intercambio son utilizadas para remover iones, que debido al color, olor, sabor o toxicidad que producen son indeseables en muchos procesos y productos (Dean 1969).

$X_{PHB}$  aumentó paralelamente con el incremento de la concentración de SSR y SSRA (sacarosa sin refinar tratada con resina de intercambio catiónico Amberlite), siendo significativamente mayores con SSR que con SSRA. Se verificó que la concentración de sodio aumentó seis veces, mientras que la de potasio fue significativamente reducida (aproximadamente 30 veces) en los medios tratados con la resina.

En la Figura 51 se indican los perfiles de producción de PHB, EPS y peso seco para cultivos efectuados a distintas concentraciones de SSR y de sacarosa sin refinar tratada con la resina Amberlite (SSRA) a 48 h de cultivo.

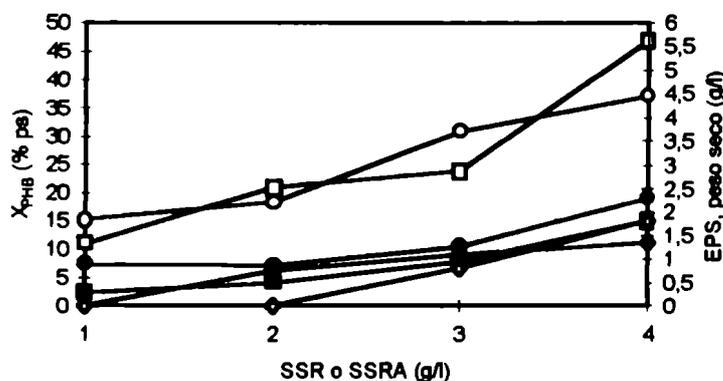


Figura 51: Producción de EPS (g/l), contenido intracelular de PHB ( $X_{PHB}$ , %p.s.) y peso seco (g/l) a distintas concentraciones de sacarosa sin refinar (SSR) y sacarosa sin refinar tratada con resina Amberlite (SSRA) a 48 h de cultivo.  $\square$  :  $X_{PHB}$ ;  $\diamond$  , EPS;  $\circ$  : peso seco. Símbolos llenos corresponden a los cultivos con SSRA, los vacíos a SSR.

La producción de EPS fue significativamente reducida con 1 y 2% de SSRA (donde no fue detectado) respecto de los cultivos con SSR. Esto se atribuye al efecto de una menor concentración de cationes y de fuente de carbono en el medio de cultivo con SSRA, producida por el tratamiento con la resina. Con 3% y 4% de SSRA la biosíntesis de EPS fue de 0.8 y 1.8 g/l, respectivamente. A esta última concentración, la excreción de EPS fue significativamente mayor que con idéntica concentración de SSR, probablemente debido a una saturación de la resina en cuanto a la absorción de fuente de carbono, dejando una mayor proporción relativa de sacarosa para la biosíntesis de EPS respecto de las otras concentraciones utilizadas.

En general, el tratamiento con la resina redujo la biosíntesis de biopolímeros, tanto intracelulares (PHB) o excretados al medio (EPS). A la concentración de 2% de SSRA se indujo la acumulación de PHB sin excreción al medio de cultivo de EPS, por lo que resultó la condición más adecuada para maximizar la relación PHB/EPS, en estas condiciones experimentadas. Sin embargo, si se considera cuál es la condición para

obtener el mayor contenido de PHB, en g/l, ésta fue de 4% de SSR (1 g PHB/l de cultivo), aunque las relaciones de g de PHB/g de EPS fueron de 0.55 y 0.65 para esa concentración de SSR y SSRA, respectivamente. El mayor efecto del tratamiento con la resina se observó sobre la biomasa obtenida, que fue aproximadamente un 50% menor en promedio con SSRA que con SSR.

#### **4.2. Jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF)**

El jarabe de maíz de alta fructosa utilizado (obtenido de Refinerías de Maíz S.A.) tenía la siguiente composición aproximada: fructosa 42%, glucosa 52%, 6% otros. Este sustrato es utilizado para la síntesis por fermentación de antibióticos, y en la industria de la alimentación en la formulación de muchos productos, como bebidas, postres y edulcorantes (Hobbelink 1992).

El contenido de biomasa final (72 h de cultivo en erlenmeyers agitados) fue de 2.5 g/l (control glucosa 1%: 1.7 g/l). El pH final alcanzado fue de 4.3 y 5, para los medios con JMAF y glucosa, respectivamente. El crecimiento fue floculento y con excreción simultánea de EPS (1.7 g/l). Comparado con el medio Bm con fructosa 1%, la biomasa determinada fue idéntica (2.5 g/l). En ambos casos, la acumulación de PHB fue mínima (máximo  $X_{PHB}$  3 y 5% a 48 h, para JMAF y fructosa, respectivamente). La glucosa del medio Bm con JMAF no es consumida. Al analizar estos resultados, se verificó que en medio Bm con JMAF el comportamiento es similar al observado con fructosa respecto de la síntesis de biomasa y PHB. La fructosa ejerció un efecto de represión por catabolito sobre la glucosa en el medio con JMAF. La fructosa presente en el JMAF produjo mayor biomasa que en medio con glucosa, pero con un contenido mínimo de PHB.

#### **4.3. Melaza de caña de azúcar**

La melaza de caña de azúcar utilizada (Planta Piloto de Investigaciones en Microbiología Industrial, PROIMI, Tucumán) es un líquido negro altamente viscoso de aroma vinoso (Materiales y Métodos). La composición de las melazas varía dependiendo de la materia prima utilizada para la producción de azúcar, por ejemplo la de caña de azúcar no

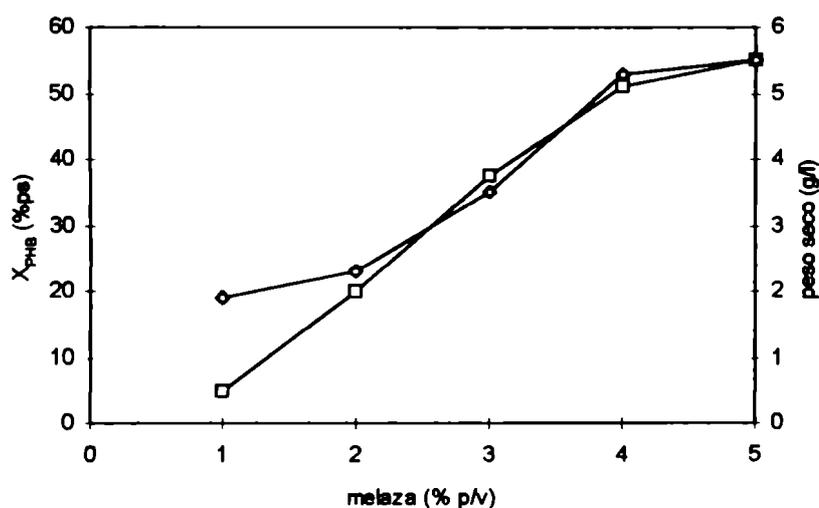
contiene hierro y si la de remolacha; o de la cosecha (Crueger y Crueger 1989). Además existe considerable variación en la calidad dependiendo de la localidad y el proceso de producción de cada factoría individual.

La melaza y subproductos derivados ha sido utilizada para la síntesis por fermentación de muchos productos, como por ejemplo ácido cítrico (Kumar y Ethiraj 1976). Es utilizada ocasionalmente como suplemento para alimentación de ganado y como azúcar fermentescible para la estabilización de los ensilados de pasturas.

Cuando se cultivó la cepa 6B en erlenmeyers agitados (Materiales y Métodos) con el medio Bm con melaza de caña de azúcar al 5% (p/v) (de manera de obtener una concentración final de glucosa de 10 g/l) se obtuvo una acumulación máxima de 57% (p.s.) a 48 h de cultivo. Al ensayar diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar tal cual o cruda (Figura 52) pudo verse que  $X_{\text{PHB}}$  aumentó a medida que la concentración de melaza (como % p/v) aumentó hasta 5%. Esto puede explicarse considerando las concentraciones finales de glucosa y sacarosa en cada medio (Tabla N°

24), pues a medida que aumentó la concentración de melaza hubo mayor disponibilidad de glucosa y sacarosa para su conversión a PHB.

Figura 52: Contenido de PHB a diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar (en erlenmeyers agitados a 220 rpm y 30°C) a 48 h. □



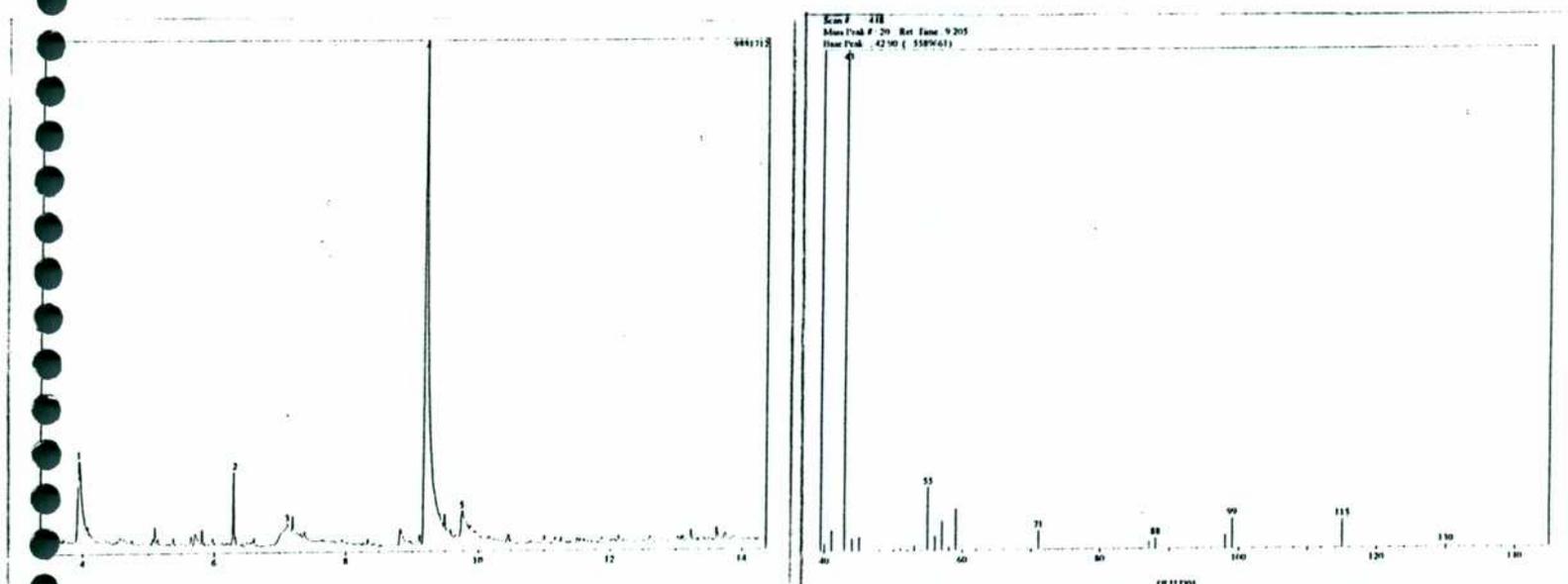
$X_{\text{PHB}}$  (% peso seco), ◇ : peso seco (g/l).

melaza (% p/v)	glucosa (g/l) a/b	sacarosa (g/l) a/b	potasio (ppm) a/b	sodio (ppm) a/b
1	2.5/1	2.5/2	200/21 <sub>c</sub>	210/450 <sub>c</sub>
2	4/1.8	3.3/2.2	240/42 <sub>c</sub>	415/900 <sub>c</sub>
3	4.9/2.7	4.8/2.7	460/65 <sub>c</sub>	620/1380 <sub>c</sub>
4	7.9/3.2	6.5/3.7	770/203	322/2300
5	10/4	8/5.2	960/105	1035/2250

a: melaza cruda b: melaza tratada con la resina. c: calculado a partir de resultados con 5%

Tabla N°24: Contenido de glucosa, sacarosa, calcio, potasio y sodio en distintas concentraciones del medio Bm con melaza de caña de azúcar cruda y tratada por resina de intercambio.

En los cromatogramas obtenidos para los cultivos con melaza como fuente de carbono se obtuvo un pico a un tiempo de corrida mayor que el del PHB (columna con Reoplex 400). Al analizar este pico por cromatografía gaseosa acoplado a un espectrómetro de masa (GC/MS) (ver Materiales y Métodos) se determinó que el pico correspondió a la sacarosa presente en la melaza, al comparar el espectrograma de masas obtenido con el de un patrón de sacarosa:



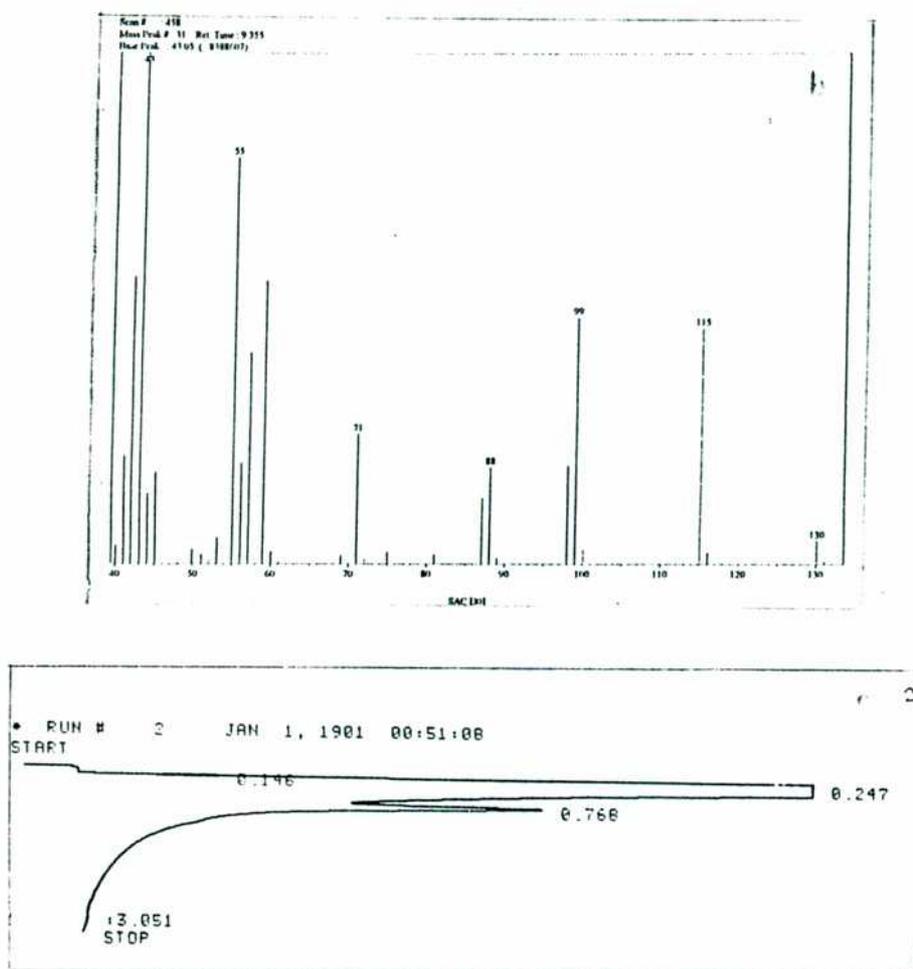


Figura 53: Cromatograma gaseoso y espectrograma de masa (e.m.) para a) el pico a tiempo de retención (tr) de 9.25 minutos. b) e.m. patrón de sacarosa y c) cromatograma gaseoso de una muestra derivatizada con señal a tr de 0.75 minutos correspondiente a 3-hidroxi butirato de metilo.

#### 4.4.1. Melaza de caña de azúcar tratada por precipitación

Se trató la melaza por medio de un método que utiliza superfosfato en caliente para precipitar impurezas (ver Materiales y Métodos). El método se aplicó para una concentración de melaza del 5% (p/v), ya que tuvo un mayor contenido de biomasa (4.3). El  $X_{PHB}$  máximo fue menor que con la melaza cruda sin tratamiento (15%, 48 h).

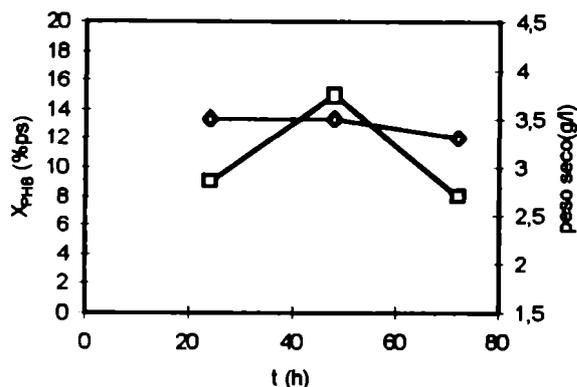


Figura 54: Contenido de PHB ( $X_{PHB}$ ) en función del tiempo de cultivo en medio Bm con melaza al 5% (p/v) tratada por un método de precipitación de impurezas utilizando superfosfato triple.  $\Delta$  : peso seco (g/l),  $\square$  :  $X_{PHB}$  (% peso seco).

#### 4.4.2. Melaza de caña de azúcar tratada con resina de intercambio iónico

Dado que la melaza cruda posee una concentración relativamente elevada de minerales se investigó si el tratamiento por medio de una resina de intercambio iónico influía sobre la biomasa y la acumulación de PHB. Se probaron diferentes concentraciones de melaza en medio Bm (de 1 a 5%(p/v)) y se trataron en batch overnight por medio de una resina de intercambio iónico Amberlite. Los resultados se indican en la Figura 55: el mayor  $X_{PHB}$  se obtuvo con melaza de caña de azúcar al 4%, sin embargo el contenido de biomasa, como peso seco, fue mayor con 5% de melaza. Los  $X_{PHB}$  fueron significativamente menores a los obtenidos con melaza cruda, mientras que el peso seco siguió un patrón similar al de melaza cruda. Este efecto puede deberse a que la resina sustrajo sensiblemente los hidratos de carbono (Tabla N° 24). Este mismo efecto fue observado cuando se trató sacarosa sin refinar con la misma resina. Otra posible explicación es la del aumento excesivo de la presión osmótica del medio, dado el incremento de la concentración de sodio, por lo que la fuente de carbono podría utilizarse para compensar la presión osmótica, y no para la biosíntesis de PHB. Se han reportado problemas debidos al aumento excesivo de la presión osmótica en la producción de etanol a partir de levaduras con melaza como fuente de carbono (Neijssel 1993).

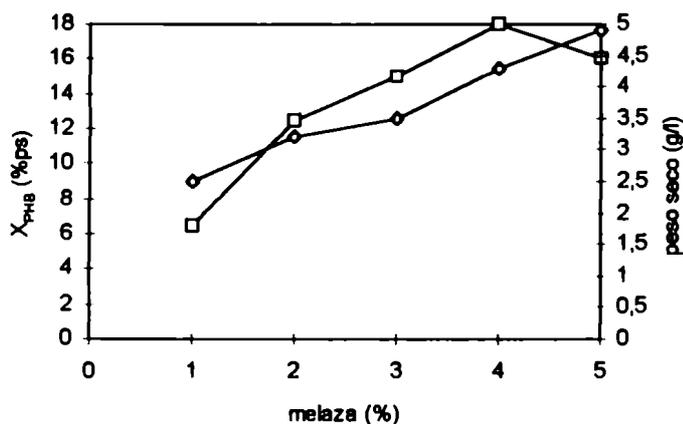


Figura 55: Contenido de PHB ( $X_{PHB}$ ) y peso seco (g/l) a diferentes concentraciones de melaza tratada por decantación.  $\square$  :  $X_{PHB}$  (% peso seco),  $\diamond$  : peso seco (g/l).

En conclusión, con el medio Bm con melaza cruda se obtuvieron altos contenidos de PHB (ver Figura 52), similares a los encontrados en medio Bm con glucosa 1%, al utilizar erlenmeyers agitados. El tratamiento de la melaza por precipitación con superfosfato y con la resina Amberlite, redujo significativamente los contenidos de PHB (cerca de 2.5 veces).

De acuerdo a estos resultados, obtenidos en erlenmeyers agitados, se decidió ensayar el comportamiento de la cepa 6B en medio Bm con melaza cruda, sin tratamiento adicional, al aumentar la escala de cultivo a fermentadores con 4 litros de capacidad utilizada.

#### 4.4.3. Cultivo con distintas concentraciones de melaza de caña de azúcar cruda en fermentador

Se ensayaron en fermentador concentraciones de melaza de 1,3 y 5%, utilizadas previamente en erlenmeyers agitados. La tasa de aireación utilizada fue de 0.5 vvm, y la agitación se fijó en 200 rpm, siendo la temperatura de cultivo de 30°C. Con melaza al 1 y 3%, el máximo de acumulación se alcanzó a 43.5 y 28 h, respectivamente. El contenido final de biomasa,  $X$  (g/l), con 1 y 3 % de melaza fue 60% y 45% menor que al utilizar 5%, respectivamente. Cuando se probó 0.5% de melaza,  $X$  fue muy bajo (0.5 g/l). El consumo de glucosa fue reducido al tiempo de acumulación máxima. Asimismo, la

sacarosa fue utilizada en una proporción muy reducida (a 5% no fue utilizada, mientras que en las otras concentraciones de melaza ensayadas los consumos fueron menores a 0.5 g/l).

A tiempos finales,  $Y_{p/c}$  fueron muy bajos, debido a que los  $X_{PHB}$  finales fueron menores al 5% en todos los casos. En la Tabla N°24 se resumen los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas.

Melaza (%)	$X_{PHB \text{ max}}$ (% ps) (a)	$X_{\text{final}}$ (g/l)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{x/c}$ (g/g) (a)	$Y_{p/c}$ (g/g) (b,c)	$P_{PHB \text{ max}}$ (g/l.h)
5	11(22)	4	0.18	0.28	0.11/0.03	0.015
3	12(28)	2.4	0.13	0.23	0.10/0.02	0.006
1	11(43.5)	1.8	0.16	0.3	0.09/0.03	0.004
0.5	n.p.	0.5	0.04	0.1	n.p.	0

(a): tiempo de máxima acumulación

(b,c): rendimientos a tiempo de acumulación máximo y a tiempo final (72 h)

n.p.: no acumuló PHB

Tabla N° 25: Parámetros de cultivo en fermentaciones con diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar cruda como fuente de carbono.

Las productividades obtenidas de PHB fueron muy bajas, dado que los contenidos máximos de PHB fueron bajos (menores a 12%), y aunque se alcanzaron tempranamente con 3 y 5%, la biomasa producida también fue baja. Los  $X_{PHB}$  fueron significativamente menores que en erlenmeyers agitados.

#### 4.4.4. Fed-batch semi-contínuo de melaza de caña de azúcar cruda sobre medio Bm con glucosa 1%

Dado que las productividades máximas de PHB alcanzadas bajo cultivo en fermentador en medio Bm con melaza como única fuente de carbono eran significativamente menores

que con glucosa, se decidió utilizar la melaza luego de que la biomasa principal fuese formada en el medio Bm con glucosa, a 0.5 vvm y C/N 69. La melaza cruda fue agregada por fed-batch desde comienzo de fase estacionaria a 50.5 h hasta 58 h de cultivo (coeficiente de dilución D de  $0.06 \text{ h}^{-1}$ ).

La Figura 56 resume los resultados descriptos: el máximo  $X_{\text{PHB}}$  durante la etapa no alimentada fue de 30% a 47 h de cultivo. A 3 h del máximo (50 h),  $X_{\text{PHB}}$  se redujo tres veces (9.5%). Cuando comenzó la alimentación con melaza (50.5 h),  $X_{\text{PHB}}$  aumentó a 18% del peso seco bacteriano en tres horas. Una vez terminada la alimentación (58 h),  $X_{\text{PHB}}$  alcanzó un máximo valor de 20% a 73 h. Luego decreció lentamente hasta 15% a tiempo final de cultivo (77 h), probablemente debido a la alta concentración de carbohidratos redujo la constante de desaparición del PHB ( $k_{\text{d PHB}}$ ) (ver 3.8.5).

Durante el período de alimentación, la glucosa en el sobrenadante del medio de cultivo mantuvo valores bajos (menores a  $0.6 \text{ g/l}$ ), indicando que es utilizada a una alta velocidad específica para la biosíntesis de biomasa y PHB. La melaza suministrada contenía  $10 \text{ g/l}$  de glucosa y fue agregada utilizando una bomba peristáltica a un flujo de  $0.3 \text{ l/h}$  a  $5 \text{ l}$  de medio Bm, por lo que la velocidad límite de consumo de glucosa fue de  $0.55 \text{ g/l.h}$  [ $(0.3 \text{ l/h}) \cdot (9.4 \text{ g/l}) / 5 \text{ l}$ ] en esta etapa de alimentación. La biomasa aumentó de  $4$  a  $4.5 \text{ g/l}$  entre  $50.5 \text{ h}$  y  $58 \text{ h}$ , respectivamente (a una velocidad de  $0.07 \text{ g/l.h}$ ). La biosíntesis de EPS fue reducida ( $0.2 \text{ g/l}$  a tiempo final).

Por último, la creación de un ambiente deficiente en oxígeno por burbujeo de  $\text{N}_2$  a  $73 \text{ h}$  de cultivo promovió un aumento significativo de  $X_{\text{PHB}}$  (24% a  $77 \text{ h}$ ).

La sacarosa de la melaza no fue utilizada para la bioconversión, pues habiendo disponibilidad de glucosa ésta ejerció efecto de represión por catabolito sobre la sacarosa. El rendimiento final de biomasa a partir de la glucosa total consumida ( $Y_{x/c}$ ) fue de  $0.15$  [ $(4.5 \text{ g/l}) / (10 + 20.6 \text{ g/l})$ ].

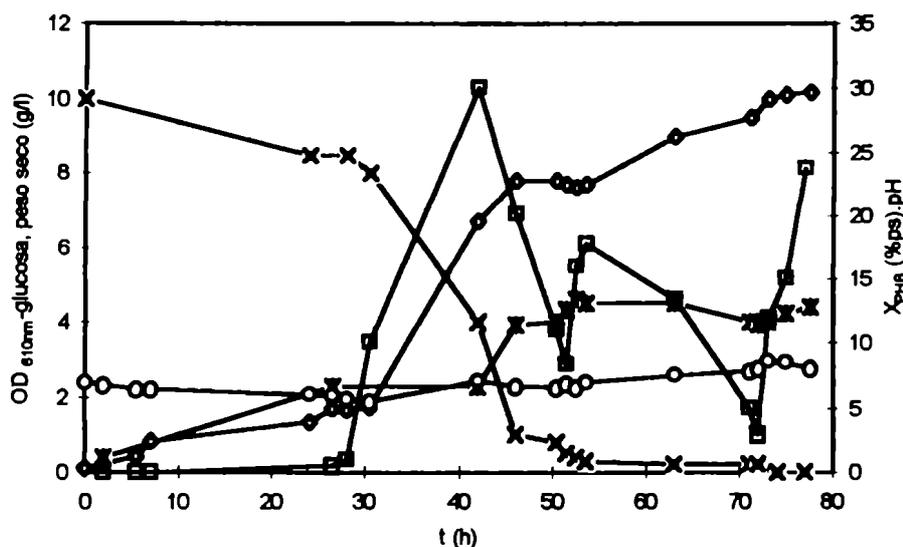


Figura 56: Cultivo en fermentador con agregado por fed-batch de melaza de caña de azúcar desde 50.5 a 58 h de cultivo.  $\square$  :  $X_{PHB}$  (%ps),  $\diamond$  :  $OD_{610nm}$ ,  $\circ$  : pH,  $\times$  : glucosa (g/l), \* : peso seco (g/l).

En conclusión, la alimentación con melaza permitió aumentar el  $X_{PHB}$  en etapas del cultivo donde la biomasa fue mayor, y por ende mantener los niveles máximos de productividad de PHB. Esto pudo verse claramente al calcular las productividades a distinto tiempo de cultivo: en el máximo de acumulación de PHB (30%, 47 h) la productividad  $P$  (g/l.h) fue de 16 mg/l.h (2.3 g/l. 0.30 /47 h). Sin embargo, a mayor tiempo de proceso (por ejemplo, a 77 h) la productividad fue de 15 mg/l.h (4.7 g/l. 0.24 /77 h), debido al fed-batch de melaza y a la creación de un ambiente deficiente de oxígeno en la etapa final. Las productividades aumentarían a 30 y 22 mg/l.h, respectivamente, si se restan las 25 h de duración de la fase lag, debido a la utilización de un inóculo de 72 h. Estas productividades fueron aproximadamente 10 veces mayores que en cultivos batch con melaza como única fuente de carbono (ver Tabla N° 25).

Deben entonces balancearse en un proceso fermentativo los costos relativos de extender la fermentación en el tiempo respecto del aumento relativo de la productividad de PHB.

#### 4.4.5. Velocidad de alimentación de melaza por fed-batch sobre medio Bm con glucosa

Usando las mismas condiciones que en el experimento anterior (excepto la concentración de sulfato de amonio utilizada, 0.025 g/l) se agregó la melaza a comienzo de fase estacionaria durante 30 minutos, de 40 a 40.5 h de cultivo (Figura 57). El contenido de PHB aumentó rápidamente de 30 a 45% en 0.5 hora, y luego comenzó a disminuir. Al volver a alimentar con melaza a 44 h de cultivo, también se observó un rápido aumento en el  $X_{\text{PHB}}$ , de 28 a 41% en 1 hora (a 45 h de cultivo), llegando a un máximo de 49% a 46.5 h. El pH se redujo de un valor inicial de 7 al valor final de 6.3. Cuando se analizó el peso seco, no se observó ningún efecto del agregado de la melaza (como se observara en 4.5.4). Se llegó a una biomasa de 2.9 g/l a 22 h, que se mantuvo aproximadamente constante hasta el final de la fermentación. La  $P_{\text{PHB}}$  fue de 0.07 g/l.h a 22 h  $[(0.55 \cdot 2.9 \text{ g/l})/22 \text{ h}]$ , debido al alto contenido de PHB; mientras que al tiempo de máximo contenido de PHB luego del fed-batch de melaza fue de 0.03 g/l.h (46.5 h)  $[(0.49 \cdot 2.8 \text{ g/l})/46.5 \text{ h}]$ . En este caso se administró la melaza a una velocidad tal que la alimentación de glucosa fue de 0.04 g/l.h. La reducción en la tensión de oxígeno disuelto (d.o.t.) medida indicó que el microorganismo se encontraba metabolizando la fuente de carbono administrada, aunque no para la formación de biomasa. Esto sugiere que bajas tasas de alimentación de carbono no son suficientes para satisfacer los requerimientos para proveer energía de mantenimiento y para la formación de biomasa, en forma simultánea

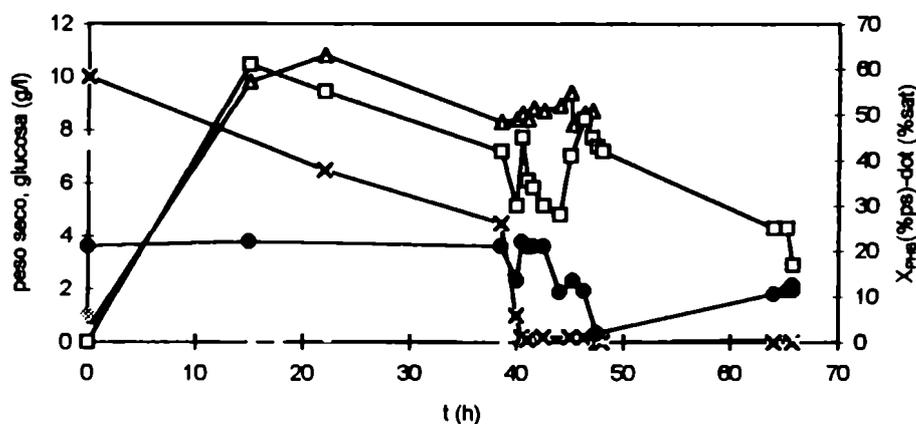


Figura 57: Cultivo en fermentador con agregado por fed-batch de melaza de caña de azúcar desde 40 a 40.5 h y de 44 a 46.5 h de cultivo. □ :  $X_{\text{PHB}}$  (%ps), • : dot (% satur.), × : glucosa (g/l), Δ : OD 610nm (No se indica pH para claridad del gráfico).

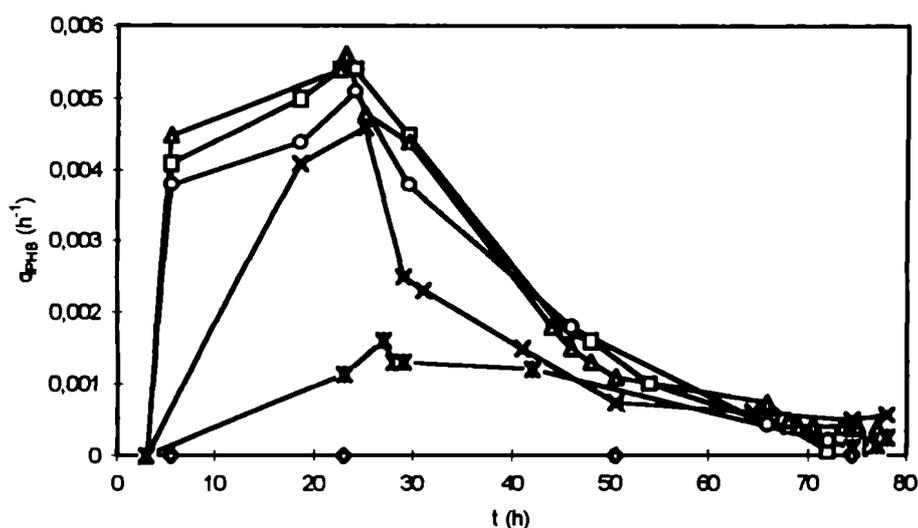
Estos resultados (4.4.4 y 4.4.5) sugirieron que la velocidad de alimentación de melaza no debe ser muy baja, si se quiere lograr alta productividad de PHB. En otro caso,

utilizando una bacteria metilótrofa, se han alcanzado muy altas biomásas con alto contenido de PHB al dosificar automáticamente la fuente de carbono (metanol) a muy baja velocidad durante todo el cultivo (Suzuki et al., 1986).

#### 4.5. Productividad y cinética del PHB en cultivo batch en fermentador con melaza de caña de azúcar.

##### 4.5.1. Velocidades específicas de formación de PHB ( $q_{PHB}$ )

Los máximos valores se obtuvieron con 5% de melaza, decreciendo hasta 0.5%. Sin embargo, las velocidades fueron significativamente diferentes entre los cultivos con 5% de melaza con y sin suplementación de amonio hasta cerca de 25 h, donde los cultivos llegaron a la máxima  $q_{PHB}$ . Luego de agotado el amonio (25 h) las velocidades fueron similares. Al crear un ambiente deficiente en oxígeno por burbujeo de  $N_2$  a 50 h de cultivo no se afectaron las velocidades específicas de formación de PHB respecto del cultivo totalmente aerobio, aunque sí hubo un aumento significativo (10%) en la biomasa final. Este efecto fue similar al observado con medio Bm usando glucosa 1% como fuente de carbono (ver 3.7.2.5), donde la creación de un ambiente anaeróbico en fase estacionaria condujo a un aumento del 50% en promedio de los contenidos de PHB; pero sin alteración en las  $q_{PHB}$  (en la Figura 36 las curvas de contenido de PHB disminuyeron en forma paralela en ambas



condiciones, por lo que la disminución de  $X_{PHB}$  en un dado intervalo de tiempo será equivalente (ver fórmula  $q_{PHB}$ )).

Figura 58: Velocidades específicas de formación de PHB ( $q_{PHB}$ ) con diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono en el medio Bm.

□ : 5%, ○ : 5% 0.1 g/l  $NH_4^+$ , Δ : 5% con fase final anaeróbica., \* : 3%, x: 1%, ◇ : 0.5%

Luego de alcanzar el máximo, las velocidades específicas disminuyeron rápidamente en todos los cultivos.

#### 4.5.2. Velocidad de reducción específica de PHB ( $k_d$ )

$k_d$  se obtuvo a partir de los valores de  $q_{PHB}$  obtenidos anteriormente a diferentes tiempos para los cultivos en batch realizados a distintas concentraciones de melaza. En la Tabla N° 26 puede observarse que el  $k_d$  máximo se obtuvo con 5%, reduciéndose hacia 3 y 1% de melaza.

Melaza (% p/v)	$k_d$ ( $h^{-1}$ )
1	0.022
3	0.061
5	0.08
5 (a)	0.018
5 (b)	0.036

Tabla N° 26: Velocidad específica de reducción de PHB ( $k_d$ ) para cultivos realizados en fermentador en medio Bm con diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar.

(a): con fase final anaerobia

(b): con 0.1 g/l de sulfato de amonio (inicial)

Cuando se burbujeó  $N_2$  en fase estacionaria, los  $k_d$  se redujeron significativamente respecto del medio Bm con melaza 5% tal cual (ver Tabla anterior), siendo comparables a los obtenidos con melaza al 1%. Esto es debido a que la anaerobiosis contribuyó a mantener los contenidos de PHB relativamente constantes, retrasándose entonces la degradación. Este mismo efecto se observó con melaza 5% con 0.1 g/l sulfato de amonio inicial, aún cuando el amonio fue consumido totalmente a 35-40 h de cultivo.

Al comparar estos valores con los obtenidos con glucosa a diferentes relaciones C/N, se observó que con melaza los  $k_d$  son significativamente menores que con la mayor relación C/N experimentada de 138, es decir, con baja concentración inicial de amonio. Este efecto podría deberse a que la alta concentración residual de hidratos de carbono en medio Bm con melaza, que en fase estacionaria inhibió la degradación del PHB (4.4.4). Entonces condiciones de ausencia de fuente de carbono en fase estacionaria aceleraron la degradación del PHB, al ser éste respirado (Senior et al. 1972).

#### **4.5.3. Productividad volumétrica en fermentador**

De las concentraciones de melaza ensayadas, el máximo contenido de PHB (% del peso seco) fue 12% a 22 h con 5% de melaza, con una  $P_{PHB}$  de 15 mg/l.h. Si se los compara con los valores reportados en la Tabla N° 25, se comprueba que se inscriben dentro de las productividades más bajas. Cuando se comparó con la productividad máxima alcanzada en erlenmeyers agitados con melaza (65 mg/l.h, con 5% de melaza a 48 h,  $X_{PHB}$  57%,  $X$  5.5 g/l) se verificó que fue tres veces menor, aproximadamente.

#### **4.6. Actividad enzimática de biosíntesis de PHB**

En la mayoría de los microorganismos hasta ahora estudiados, PHB es biosintetizado a partir de acetil coenzimaA (acetil-CoA) por medio de una secuencia de tres reacciones catalizadas por la 3-cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHB sintasa o sintetasa encargada de la polimerización, y con diferente grado de especificidad de acuerdo con cada tipo de bacteria (ver Introducción). Ya que el camino metabólico del PHB es

cíclico, involucra biosíntesis y degradación. Esta última se lleva a cabo por medio de la enzima PHB depolimerasa, que normalmente se encuentra asociada al gránulo de PHB, y su actividad depende de la presencia de tres componentes: una proteína activadora, una hidrolasa (que convierte el dímero a monómero) y la propia depolimerasa (Lusty y Doudoroff 1966; Griebel et al. 1968). Luego el monómero es oxidado a acetoacetato y este último convertido nuevamente en acetyl-CoA.

Se midió la actividad de dos enzimas, una de la parte biosintética del ciclo (acetoacetyl-CoA reductasa) y la otra de la parte degradativa (3-hidroxi-butirato deshidrogenasa) para relacionar las actividades enzimáticas con los contenidos de PHB.

#### **4.6.1. Medición de la actividad acetoacetyl-CoA reductasa en medio Bm con glucosa al 1% y con diferentes concentraciones de melaza como fuente de carbono**

a) La actividad fue medida en cultivos en erlenmeyers agitados a 220 rpm y 30°C a 48 horas de incubación. La actividad fue similar para concentraciones de melaza de 1, 2, 3 y 4%: 65, 68, 58 y 58 U/mg proteína, respectivamente. Estos valores son consistentes con los  $X_{PHB}$  obtenidos, dentro del error experimental (9, 10.5, 10 y 12%, respectivamente). Se determinó la actividad reductasa en una muestra de cultivo en fermentador con medio Bm con glucosa 1% y 0.1 g/l de sulfato de amonio a 48 horas de incubación. La densidad óptica a 340nm de la mezcla de reacción tuvo una reducción de 0.06 unidades/min (correspondió a una actividad específica de 1710 U.E./mg proteína.min).

b) La actividad fue medida en las mismas condiciones que en a) en medio Bm con glucosa al 1% y con distintas concentraciones de peptona. La mayor actividad enzimática se verificó con 0.15% de peptona suplementada (61 U/mg proteína) siendo de 3, 11, 23 y 20 U/mg proteína para 0.05, 0.10, 0.20% y control sin peptona, respectivamente.

#### **4.6.2. Medición de actividad 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa (3-HBDH) en medio Bm con glucosa al 1%**

En erlenmeyers agitados a 220 rpm y 30°C a 48 horas no hubo actividad 3-HBDH (comienzo de fase estacionaria). Con muestras provenientes de cultivos a 73 h de cultivo se detectó actividad 3-HBDH, reduciéndose el dinucleótido NAD a NADH y oxidándose el monómero 3-hidroxiacetato (3-HA) a acetoacetato. La reducción del NAD produjo un aumento de OD a 340 nm de 0.45 unidades/ min (actividad específica de 12800 U.E./mg proteína.min). En la Figura 57 puede verse una gráfica de OD a 340 nm versus el tiempo de incubación de la mezcla de reacción, observándose el veloz aumento inicial de la densidad óptica.

Esta enzima pertenece al sistema depolimerizante, por lo tanto se detectó mayor actividad de la misma a tiempos mayores de cultivo, donde  $X_{PHB}$  disminuyó en todos los cultivos en batch ensayados previamente.

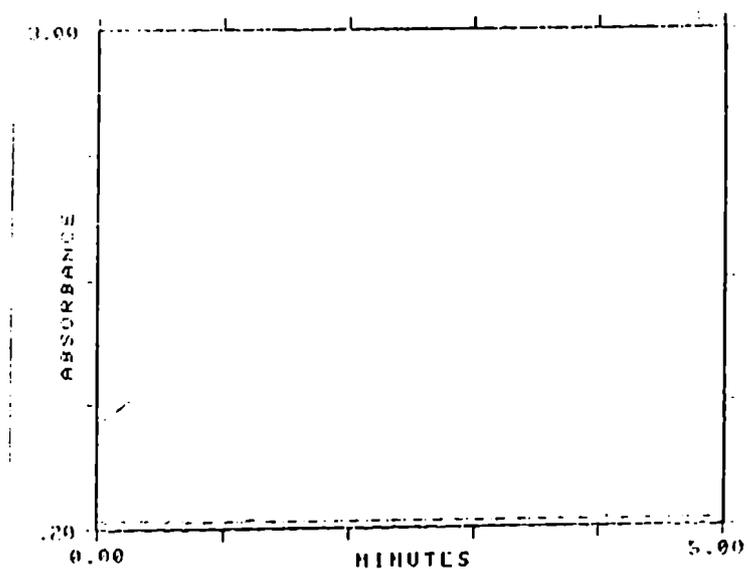


Figura 59: Aumento de OD a 340nm en función del tiempo debida a la formación de NADH por actividad de la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa en extractos crudos de la cepa 6B crecida en medio Bm con glucosa al 1%.

### 5. Caracterización de la estructura del polímero obtenido

Se identificó la estructura del polihidroxiacetato obtenido de la cepa 6B por medio de técnicas espectroscópicas de absorción infrarroja y de resonancia magnética nuclear de

hidrógeno y carbono 13. Luego se caracterizó en cuanto a su grado de cristalinidad por medio del análisis de espectrometría de rayos X.

### 5.1. Grupos funcionales presentes. Espectro de absorción infrarroja

En primer lugar se efectuó un análisis infrarrojo de una película de biopolímero obtenida de la cepa 6B cultivada en erlenmeyers agitados con medio Bm y glucosa como fuente de carbono. Este análisis tiene por objeto el de la identificación de los grupos funcionales presentes.

La película montó en un armazón y se registró su espectro de absorción infrarrojo. La presencia de un intenso pico de absorción a  $1725\text{ cm}^{-1}$  del grupo carbonilo fue indicativa de la presencia del grupo éster, y dada la ausencia de absorción aromática se pudo deducir que se obtuvo un poliéster alifático. La proporción de -OH libre en la muestra, obtenida por la relación entre los picos C-H y C-OH a  $3000$  y  $3420\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, fue baja (menor a 3%), sugiriendo una distribución aguda de pesos moleculares para esta muestra (pocos extremos de cadena presentes) (ver luego punto 7.1.10). En la Figura 60 se muestra el espectro obtenido.

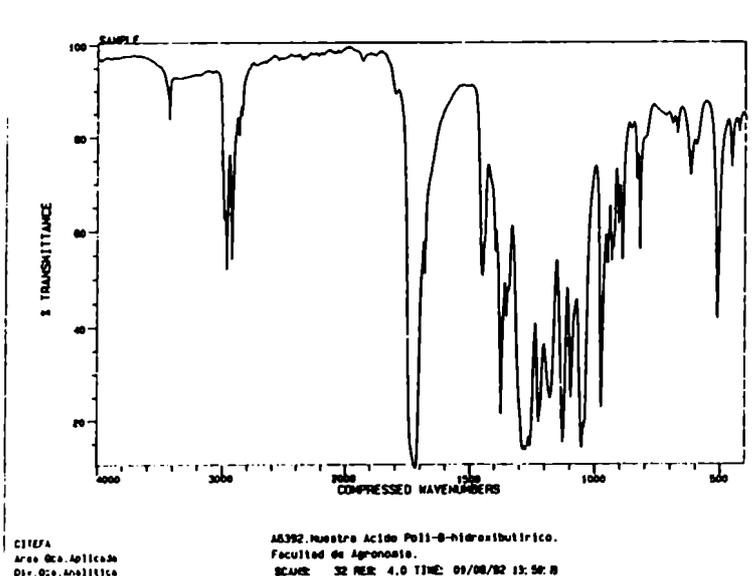


Figura 60: Absorción en el infrarrojo de una película de PHB obtenida a partir de la cepa 6B.

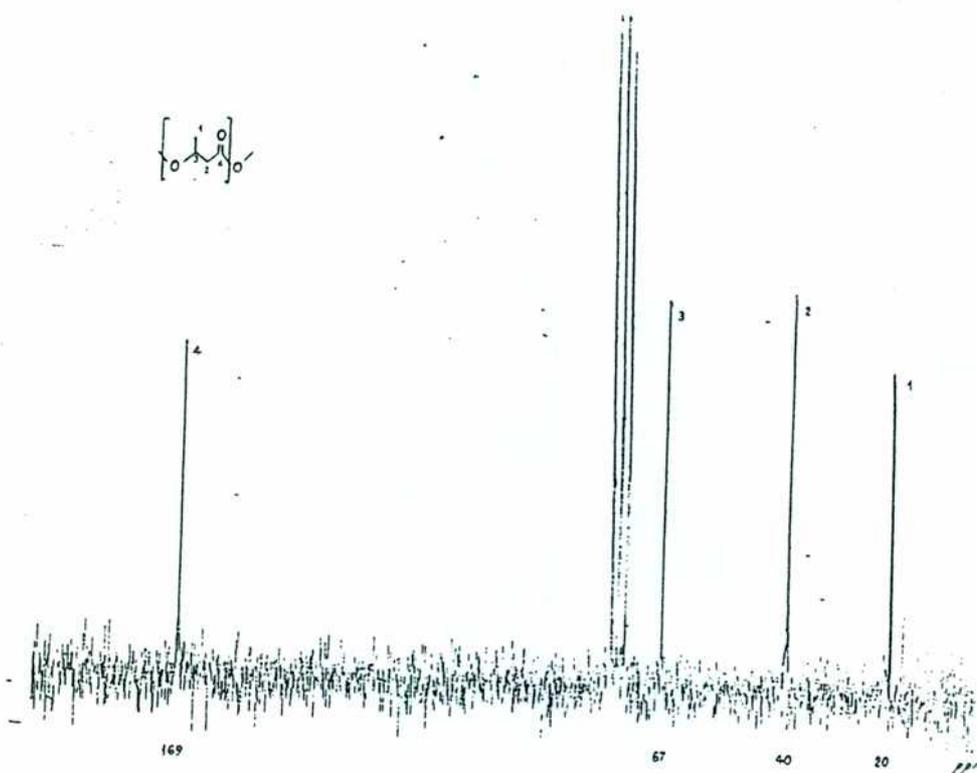
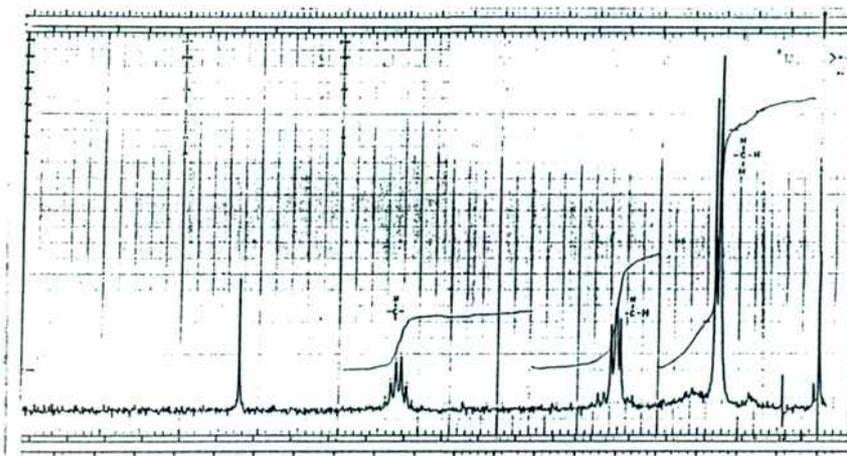
## 5.2. Espectros de resonancia magnética protónica ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN)

Mientras que la espectroscopía de IR es de gran utilidad en la identificación de los polímeros, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es más útil para determinar la estructura de los polímeros. Los protones de los núcleos de los átomos de hidrógeno de un polímero tienen una orientación arbitraria, pero en presencia de un campo magnético externo aplicado se alinean en su dirección o contra ella. La absorción de energía por esos protones en condiciones apropiadas de fuerza y frecuencia de campo, llamada resonancia, ocasiona un cambio de spin, que queda registrado respecto de un patrón interno (tetrametilsilano). La técnica ha sido aplicada también para la determinación in vivo de PHB (Jacob et al. 1986) y del PHB semicristalino por  $^{13}\text{C}$ -RMN de estado sólido (Morin y Marchessault 1992).

Entonces para determinar la estructura exacta se efectuaron los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN. De las señales obtenidas en el espectro protónico se dedujo que los tipos de hidrógeno presentes correspondieron a una estructura 3-hidroxibutirato (3-HB), sin la presencia adicional de otro tipo de monómeros. Los desplazamientos químicos  $\delta$ , en ppm, fueron: 1.25 (d), 2.52 (t), 5.25 (cuarteto) y 7.22 (s) (deuterio del solvente). La primera señal fue de los hidrógenos del grupo metilo, la segunda los hidrógenos metilénicos y la tercera correspondió al hidrógeno metínico.

Cuando se realizó el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se confirmó que el tipo de carbonos distintos confirmó la estructura 3-HB. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) e intensidades de cada tipo de carbono fueron (ppm): a. 168.99 (69.89), b. 78.48 (140.75), c. 76.89 (141.98), d. 75.29 (133.77), e. 67.54 (81.91), f. 40.76 (84.26), g. 19.64 (68.01) y h. 15.80 (17.92). Las señales b, c y d correspondieron al carbono del solvente, que fue cloroformo deuterado. La señal a), de mayor  $\delta$  fue la del carbono más desprotegido, y más cercano a un grupo atractor de electrones, es decir el carbono carbonílico. La e) se debió al carbono unido al grupo metilo, este último a su vez generó la señal g). La f)

correspondió al carbono metilénico. Por último, la señal h), poco intensa, se atribuyó a trazas de metanol remanentes de la purificación.



Figuras 61 y 62: Espectros de resonancia magnética protónica y de carbono 13 de una muestra de polímero aislada y purificada de un cultivo en medio Bm con glucosa con la cepa 6B.

### **5.3. Cristalinidad. Espectrograma de difracción de rayos X**

La cristalinidad es una propiedad muy importante en el estudio de los polímeros, pues influye directamente sobre sus propiedades. Los polímeros en general poseen dominios cristalinos y amorfos, la prevalencia de alguno de estos dominios depende del grado de ordenamiento del polímero. Los polímeros altamente ordenados pueden formar cristales laminares que se pliegan para formar cadenas perpendiculares a las caras del cristal (por ejemplo, el polietileno). En cambio, los polímeros amorfos con grupos voluminosos irregulares son raramente cristalizables (Seymour 1971). Los polímeros cristalizan formando estructuras pequeñas llamadas cristalitas, que normalmente se agrupan en estructuras piramidales mayores conocidas como esferulitas.

Una muestra de PHB purificada de una de las fermentaciones realizadas con la cepa 6B fue analizada por difracción de rayos X con el objetivo de conocer su grado de cristalinidad. Del análisis del espectro de rayos X (Figura 63) se dedujo que la muestra posee una regular cristalinidad. Este parámetro es proporcional a la cantidad de picos definidos y a la intensidad de los mismos, los picos reflejan que fracción de cristales en la muestra pueden difractar el haz de rayos X emitido por el aparato de difracción.

La ley de Bragg (Materiales y Métodos) permitió calcular, a partir de la intensidad y posición de los picos, distancias intramoleculares de la muestra de PHB: 5.26 Å correspondió a uno de los picos. De acuerdo a datos bibliográficos esta se menciona como una posible distancia intracadena, dentro de la estructura helicoidal del ácido poli-3-hidroxibutírico.

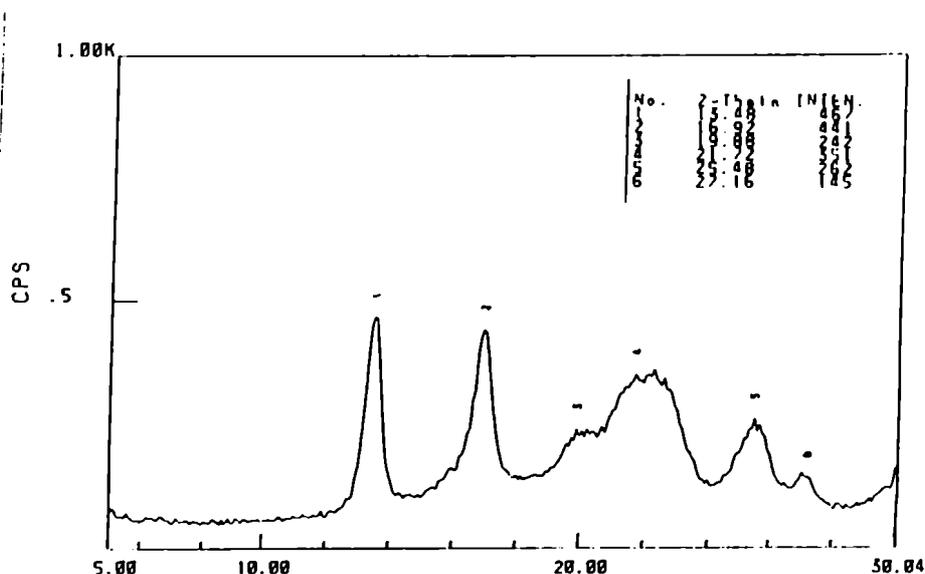


Figura 63: Espectrograma de difracción de rayos X de una muestra de PHB pulverizada obtenida de la cepa 6B.

El espectro de rayos X obtenible de un polímero semicristalino es una superposición de los patrones amorfo y cristalino. Cuanto más anchos sean los picos, tanto más amorfo será el polímero (Kroschwitz, J. 1990). En 7.4 y Tabla N°36 se calcularon los porcentajes de cristalinidad a partir de datos calorimétricos.

### 6. Propiedades físico- químicas del PHB obtenido

Una vez que la estructura química del biopolímero obtenido de la cepa 6B fue unívocamente determinada, se ensayaron las propiedades de solubilidad, biodegradabilidad, transparencia de las películas y resistencia mecánica.

Estas propiedades tienen importancia cuando se consideran las posibles aplicaciones prácticas del PHB: la solubilidad, por ejemplo, es una importante propiedad cuando el polímero es destinado a la fabricación de **envases**, de manera que pueda conocerse su grado de resistencia y compatibilidad con los solventes. Adicionalmente, la

biodegradabilidad de envases contruídos con PHB es la característica principal que justifica su utilización para tales fines (Luzier et al., 1992, Pierce 1990).

Cuando se considera su utilización como **película**, la solubilidad, biodegradabilidad y resistencia mecánica son los ítems a evaluar; si en particular las películas se destinan a la protección temprana de cultivos agrícolas en invernadero, la transparencia de las películas juega un rol fundamental en lo referente a la radiación solar que reciban los cultivos (Miyazaki, 1997).

### **6.1. Solubilidad en diferentes solventes**

Al ensayar la solubilidad de películas de PHB obtenidas de la cepa 6B se encontró que la resistencia a la disolución es alta, siendo el polímero solamente soluble en solventes halogenados como cloroformo y diclorometano, pero no en tetracloruro de carbono. Al tratarse de un poliéster, con bases o ácidos a mayor temperatura hay una hidrólisis y consecuente desintegración de la película de polímero. Es insoluble además en alcoholes y acetona.

En la siguiente Tabla se resumen las solubilidades obtenidas.

Solubilidad de PHB en distintos solventes			
solvente	temperatura (°C)		
	20	40	60
acetona	-	-	-
formaldehído 40%			
etanol			
1-butanol			
alcohol isoamílico			
metanol			
1-propanol			
hexano			
benceno			
xileno			
tetracloruro de carbono			
cloroformo	+	+	+
diclorometano	+	+	+
ácido clorhídrico 1N			+
hidróxido de potasio 1N	-	+/-	+

Tabla N° 27: Solubilidad del PHB en diferentes solventes (determinada por exposición durante 48 h)

## 6.2. Biodegradabilidad

Se ensayó la biodegradabilidad de películas de PHB de aproximadamente 25  $\mu$  de espesor (estimado por observación microscópica (1500X) de cortes de la película en una cámara de Petroff-Hauser) en cajas de Petri con muestras de suelo rizosférico molidas y tamizadas por un cedazo de 1 mm de tamaño de poro. Las cajas (5 en total) fueron incubadas con la película en estufa de cultivo a 30°C y se monitoreó el peso de las películas luego de ser lavadas con solución fisiológica y secadas. Se determinó que en 4 semanas el PHB había sido completamente biodegradado por la microflora presente en el

suelo. En la siguiente Tabla se indica el porcentaje de pérdida de masa en función del tiempo de exposición de la película:

t incubación (d)	peso PHB (mg)	% pérdida de peso
0	24	0
7	20	17
15	15	37.5
21	5.5	77
29	n.p.	100

n.p.: no pesable

Tabla N° 28: Biodegradación de películas de PHB en fase sólida expuestas a muestras de suelo.

Con películas de PHB (de 50  $\mu$ ) se ensayó la biodegradabilidad en medio líquido con solución fisiológica (utilizada como control), licor de tanque de aireación de una planta depuradora de efluentes, cultivo puro del hongo *Aspergillus niger* y residuo de prensado para la extracción de aceite de oliva (alpechín) en frascos estáticos a 30°C. En este caso se observó visualmente desaparición total de la película. En la Tabla N° 29 se señalan los tiempos de biodegradación completa del PHB: estos tiempos se correlacionaron con el número total de microorganismos presentes (hongos y bacterias contados en agar nutritivo) en cada caso, siendo el licor de cámara de aireación de planta depuradora de efluentes el sistema de mayor tasa de biodegradación. En solución fisiológica la degradación fue muy lenta (más de 8 meses en las condiciones ensayadas). En este último caso pudieron apreciarse cómo influyeron otros factores de degradación físico-químicos, además de los biológicos, ya que los recuentos fueron negativos en este caso.

Ambiente (fase líquida)	t degradación total (d)	recuento total (UFC/ml)
solución fisiológica	250	0
licor planta depuradora	15	10 <sup>9</sup>
alpechín	65	10 <sup>4</sup>
cultivo A. niger	45	10 <sup>7</sup>

Tabla N° 29: Biodegradación de películas de PHB en fase líquida.

Estos resultados confirmaron la biodegradabilidad del PHB obtenido tanto en fase líquida como en fase sólida.

### 6.3. Transparencia (T) y radiación dispersada (Haze) de películas de PHB

La transparencia y la luz dispersada en todas direcciones por los plásticos (Haze) favorece la uniformidad del flujo luminoso, por lo que es un factor importante para su aplicación, por ejemplo, en invernaderos.

Se determinó la transparencia y haze de películas de PHB de 20-30  $\mu$  de espesor (estimado como se indicó anteriormente). Se midió la radiación global,  $I$ , medida en  $\mu\text{mol/s.m}^2$ , recogiendo la luz en una esfera integradora cuyo interior es una superficie difusora perfecta. El porcentaje de luz transmitida por el plástico se determinó excluyendo del haz transmitido la que pasa en dirección normal a la muestra, mediante una trampa de luz (norma ASTM D1003 77). Se definió la transmitancia como el cociente entre la radiación en la esfera integradora con la muestra ( $I_2$ ) y sin la muestra ( $I_1$ ). Si  $I_4$  es la radiación difundida con la trampa de luz e  $I_3$  la radiación con trampa y sin muestra, el haze es  $I_4/I_2 - I_3/I_1$ . El dispositivo experimental se indica en la Figura 64:

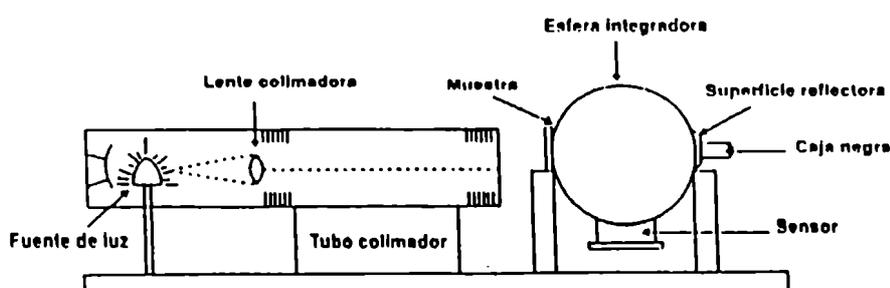


Figura 64: Dispositivo experimental para la medición de la luz dispersada (Haze) y posterior determinación de % de transparencia (T) de una película de PHB obtenida a partir de la cepa 6B.

fFuente de luz: blanca halógena de tungsteno, radiómetro LI-COR 190.

fuente de luz: blanca halógena de tungsteno, radiómetro LI-COR 190.

En la siguiente Tabla (N° 30) se muestran los promedios para las radiaciones globales que atravesaron la película de bioplástico (30 observaciones con el fin de trabajar con un error menor al 10% de la media, de acuerdo al test t) con y sin obturador, con el fin de determinar el % de luz transmitida. Al utilizar una fuente de luz en la zona del espectro denominada PAR (de 400 a 700λ), que es la absorbible por las plantas, el % de transparencia fue igualmente alto (99%). Como comparación, el polietileno tienen transmitancias de 90% y haze de 6 a 12%.

Radiación global (I) (( $\mu\text{mol/s.m}^2$ ))	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>
<b>luz blanca</b>				
Promedio	6.90	6.86	5.43	5.41
desv. Standar ( $\sigma$ )	15.78	7.30	7.15	12.97
promedio				
T (%)	99+-1			
Haze (%)	12+-2			
<b>zona PAR</b>				
Promedio	0.24	0.23	0.19	0.19
desv. Standar ( $\sigma$ )	5.52	1.47	3.06	4.07
promedio				
T (%)	98+-1			
Haze (%)	16+-2			

Tabla N° 30: Porcentaje de transparencia (%T) y radiación dispersada (Haze, %) de una película de PHB.

#### **6.4.1. Resistencia mecánica del PHB: Tensión de ruptura (módulo de Young)**

Cuando se somete un polímero a un ensayo de tensión el objetivo es el de estudiar sus componentes de elasticidad y de ductilidad. Si para obtener una determinada deformación se requiere una mayor fuerza, medida por medio de la tensión, para un polímero A respecto de otro B, esto significa que el primero es más elástico que el segundo. Si la tensión necesaria para alcanzar ese determinado estiramiento fuera menor en A que B, el polímero A tendría una mayor componente de ductilidad (o de flexibilidad).

Con una muestra de PHB obtenida a partir de la cepa 6B se construyó una probeta utilizando un molde longitudinal de medidas especificadas (norma ASTM D 1707 - 84) y se determinó la resistencia a la tracción mecánica utilizando un aparato Instron (ver **Materiales y Métodos**).

En la siguiente Figura 65 se graficó el stress aplicado (MPa) vs. el estiramiento producido (mm). De la pendiente de la parte recta de esta curva se obtuvo la tensión de ruptura (módulo de Young), que fue de 76 MPa. Este valor es intermedio si se lo compara con el de una goma látex (4 MPa) o el de un material biológico como por ejemplo un tendón (1 a 6 MPa) y un acrílico (cerca de 1000 MPa).

El porcentaje de elongación al momento de ruptura (5%) se obtuvo como el cociente entre la elongación al momento de la ruptura y la longitud original del molde de bioplástico y multiplicando por cien.

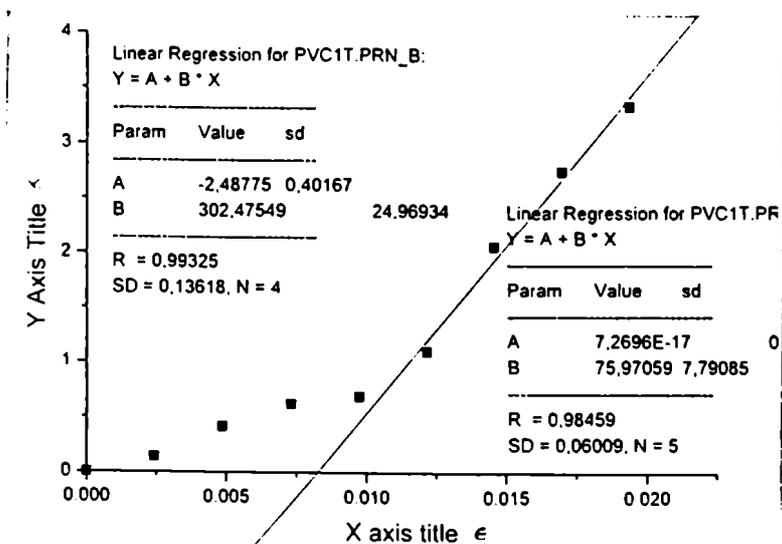


Figura 65: Curva de stress aplicado (MPa) vs. el estiramiento producido (mm) sobre un molde de PHB de dimensiones especificadas.

La extensión de ruptura obtenida es baja, si se le compara con otros plásticos como polipropileno o polietilentereftalato (PET) de 400 y 100%, respectivamente. Este comportamiento ha sido asociado al hecho que el PHB tiene una temperatura de transición vítrea cercana a la temperatura de testeo (20°C). Como consecuencia, la fase amorfa que conecta las regiones cristalinas y las esferulitas está impedida de fluir y entonces la fractura se produce a un estiramiento bajo (Abbate et al., 1991).

#### 6.4.2. Modificación de la resistencia mecánica: plastificación con polioxietilensorbitanos (Tween 80)

Para mejorar la flexibilidad de los polímeros es usual plastificarlos, utilizando sustancias como ftalatos. Se probó plastificar PHB con polioxietilensorbitan monoleato (Tween 80) al 1.5%. Este producto es totalmente atóxico y biodegradable, y es utilizado además como emulsionante en la industria alimentaria. Cuando se ensayó la tensión de ruptura sobre el PHB plastificado externamente el módulo de Young aumentó significativamente (194 MPa) respecto del PHB sin plastificar (76 MPa). En la Figura se detallan las curvas de stress para el polímero plastificado.

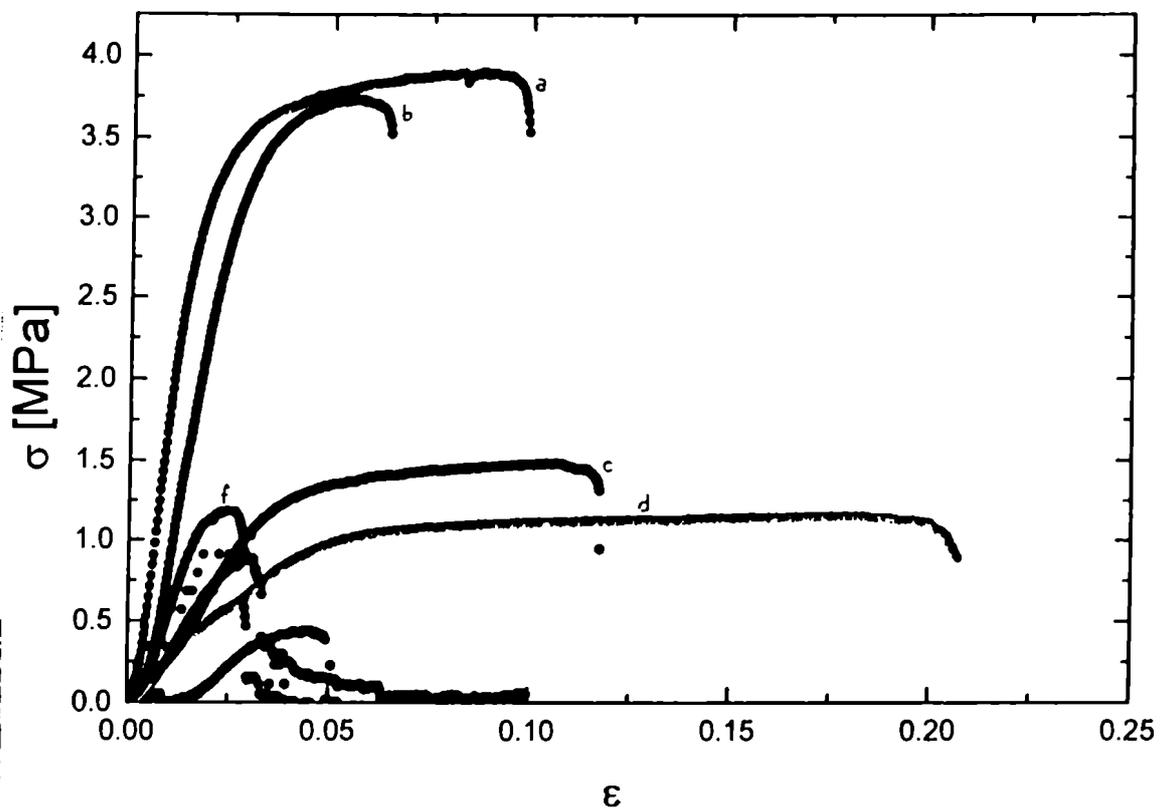


Figura 66: Curva de stress aplicado (MPa) vs. el estiramiento producido (mm) sobre una probeta de dimensiones especificadas de PHB obtenida a partir de la cepa 6B y plastificada con Tween 80.

El primer par de curvas (a,b) para el PHB plastificado, mostró que es necesario aplicar una tensión significativamente mayor para lograr igual estiramiento que para PHB solamente (curvas f). Al realizar las curvas sobre otras muestras plastificadas se obtuvieron perfiles diferentes (c,d) donde se obtuvieron estiramientos significativamente mayores con menor tensión aplicada. Esto sugiere la existencia de direcciones privilegiadas dentro de la estructura del PHB plastificado.

Estos resultados indicaron que la plastificación aumentó la componente de elasticidad del polímero, de manera que es necesario aplicar una tensión casi tres veces mayor para

producir el mismo estiramiento que con el PHB tal cual es obtenido de la cepa 6B. Esta plastificación acerca el módulo de Young a los valores reportados para tejidos biológicos como el colágeno (344 MPa), lo que abre la posibilidad de su utilización conjunta en reemplazos e implantes en el área médica.

En otro ensayo, se agregó hidroxapatita (utilizada en recomposición ósea, Lauzier et al. 1991) a un extracto clorofórmico de PHB, de manera de obtener un polímero con una relación PHB:hidroxapatita de 2:8. Este material se estiró en forma comparable a las muestras plastificadas con Tween 80, con un módulo de Young menor, similar al de un látex (12.5 MPa). Estos resultados indicaron que las propiedades mecánicas del PHB pueden ser reguladas dentro de un rango amplio.

### **6.5. Propiedades viscoelásticas del PHB**

Con el fin de caracterizar el material obtenido en cuanto a sus propiedades reológicas, se analizó el comportamiento viscoelástico del PHB obtenido. Estas tienen en cuenta la deformación y el flujo de los materiales bajo la influencia de fuerzas externas (Scandola et al. 1988). Por este motivo, se justifica su estudio ya que tienen importancia para adecuar la procesabilidad del PHB obtenido.

En el caso de un sólido como el PHB, si se le aplica una fuerza tangencial por unidad de área (esfuerzo  $\tau$ ), la deformación ( $\gamma$ ) que el polímero sufrirá dependerá de la elasticidad del mismo. La relación matemática la expresa la ecuación de Hooke:

$$\tau = G \gamma \quad a$$

donde el factor de proporcionalidad es la elasticidad o módulo de corte G. Esta ecuación rige el comportamiento elástico de un material.

Si se considera ahora un líquido, y se le aplica un esfuerzo  $\tau$ , el material en lugar de deformarse, como en el caso de un sólido, tenderá a fluir. Esta fluidez ( $\gamma^\circ$ ) (definida como la velocidad que toma un elemento de volumen del material dividido por la distancia que se desplazó) dependerá de la viscosidad ( $\eta$ ) del líquido. Entonces,

$$\tau = \eta \gamma^\circ \quad b$$

Esta ecuación (de Newton) rige el comportamiento viscoso de un material. Cuanto mayor sea la viscosidad, mayor será el esfuerzo necesario para generar un determinado flujo.

Entonces, teniendo en cuenta estas ecuaciones, se construyó la curva de flujo para el PHB, en las que se graficó para cada flujo (shear rate) generado en la muestra de PHB el esfuerzo  $\tau$  que fue necesario aplicar (en inglés shear stress). Se utilizó un reómetro (Paar Physica, USA) con un sistema cono-plato (ver Materiales y Métodos). En la Figura 67 se muestra la curva de flujo obtenida.

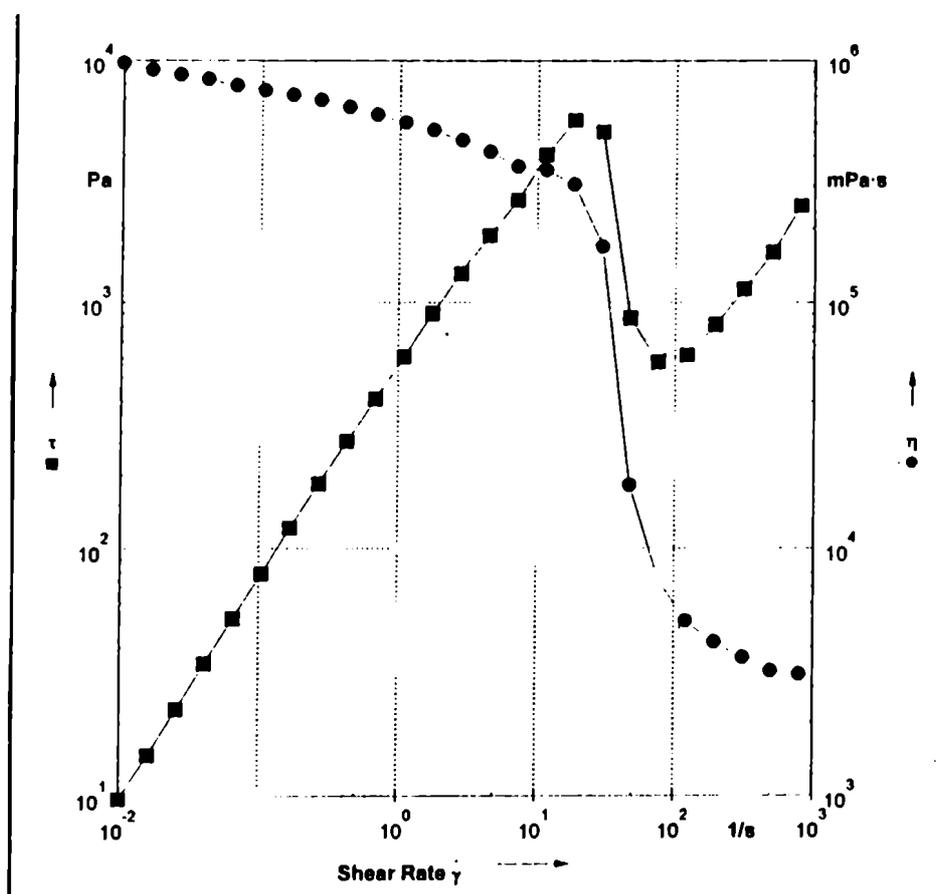


Figura 67: Curva de flujo (esfuerzo  $\tau$  vs. flujo  $\gamma^\circ$ ) para una muestra de PHB obtenida de la cepa 6B.

A medida que aumentó el flujo que el esfuerzo necesario aumentaba en forma lineal. Entre flujos de 10 y 100  $\text{seg}^{-1}$  se produjo una disminución atribuible a una parcial descomposición del material, puesto que la curva se efectuó a una alta temperatura (190°C) (ver Materiales y Métodos). En la anterior figura se detalló además el cambio en la viscosidad con el flujo creciente. De la ecuación b surge que la viscosidad es el cociente entre  $\tau$  y  $\gamma^\circ$ . La viscosidad disminuyó cuando se aumentó el flujo, disminuyendo significativamente en el intervalo de flujos en el que material habría sufrido una descomposición parcial.

Si ahora el esfuerzo aplicado al PHB es oscilatorio, es decir, ejercido en dos direcciones con una frecuencia  $\omega$  determinada, la distancia  $x$  en que un elemento de volumen se desplaza, el esfuerzo  $\tau$  y la deformación  $\gamma$  se expresan como:

$$x = x_0 \text{ sen } \omega t \quad , \quad \tau = \tau_0 \text{ sen } (\omega t + \delta) \quad , \quad \gamma = \gamma_0 \text{ sen } (\omega t + \delta)$$

donde  $\delta$  es el defasaje entre las curvas senoidales de esfuerzo y deformación.

Aplicando la ecuación a se obtiene:

$$G' = (\tau_0 / \gamma_0) \cos \delta \qquad G'' = (\tau_0 / \gamma_0) \text{ sen } \delta$$

donde  $G'$  es el módulo de almacenamiento, que representa la cantidad de energía de deformación almacenada en el material y recuperable. Este valor caracteriza el comportamiento elástico de la muestra.

$G''$  es el módulo de pérdida y representa la energía disipada irreversiblemente como consecuencia de la deformación. Este valor caracteriza el comportamiento viscoso de la muestra.

Se define el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) como  $G''/G'$ , y representa la relación entre la porción viscosa y la elástica de la muestra.

Entonces, se efectuó un barrido de amplitud de la oscilación (es decir, valores crecientes de la distancia  $x$ , que corresponde a la deformación  $\gamma$  ("strain")) y se obtuvo el factor de pérdida  $\tan \delta$  (de mediciones de  $\tau$  y  $\gamma^\circ$  realizadas por el reómetro) para cada valor de deformación, a una frecuencia  $\omega$  constante:

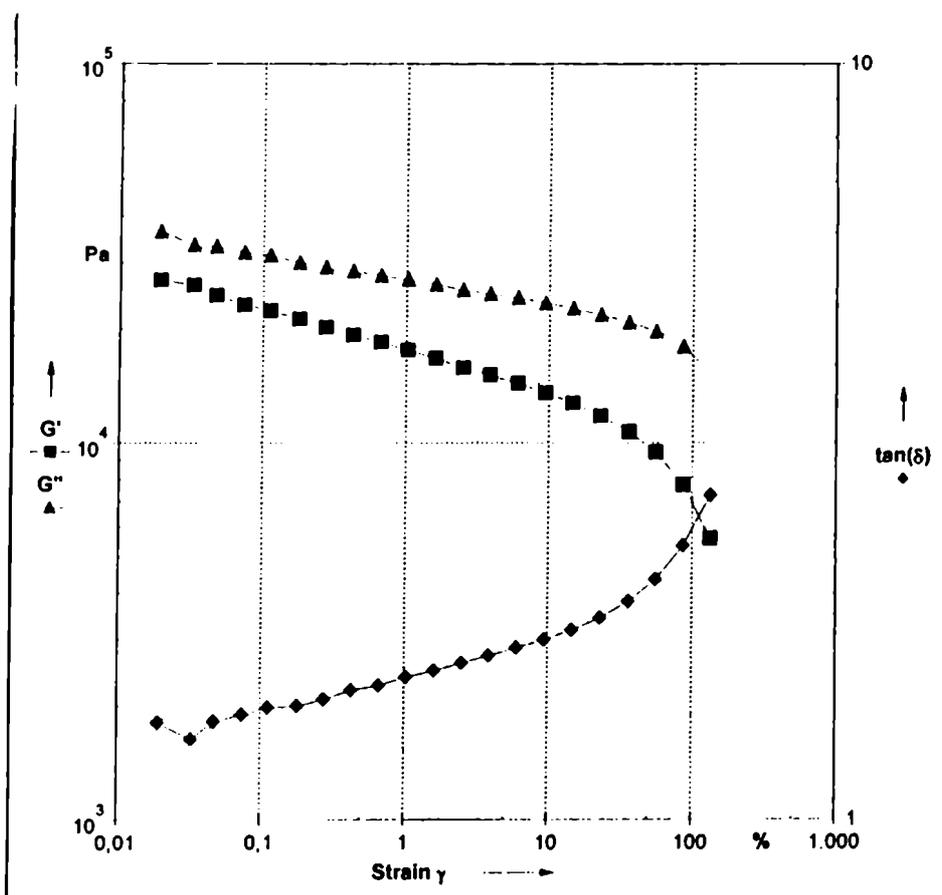


Figura 68: Factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) de una muestra de PHB obtenida de la cepa 6B para cada deformación  $\gamma$  ("strain") aplicada a una frecuencia de  $10 \text{ s}^{-1}$ .

De la Figura se dedujo que como  $G''$  es siempre mayor que  $G'$ , la componente viscosa dominó sobre la componente elástica. En la práctica esto significa que el PHB fundido tendrá tendencia a chorrear, ya que fluirá, debido a que no poseería la elasticidad suficiente. Debe tenerse en cuenta este comportamiento para adecuar el proceso de extrusión o de inyección para aplicaciones como por ejemplo la fabricación de envases.

Por último, si se mantiene una deformación  $\gamma$  constante y se varía la frecuencia  $\omega$  con que oscila el PHB en el dispositivo de cono-plato del reómetro, se obtienen las siguientes curvas (Figura 69):

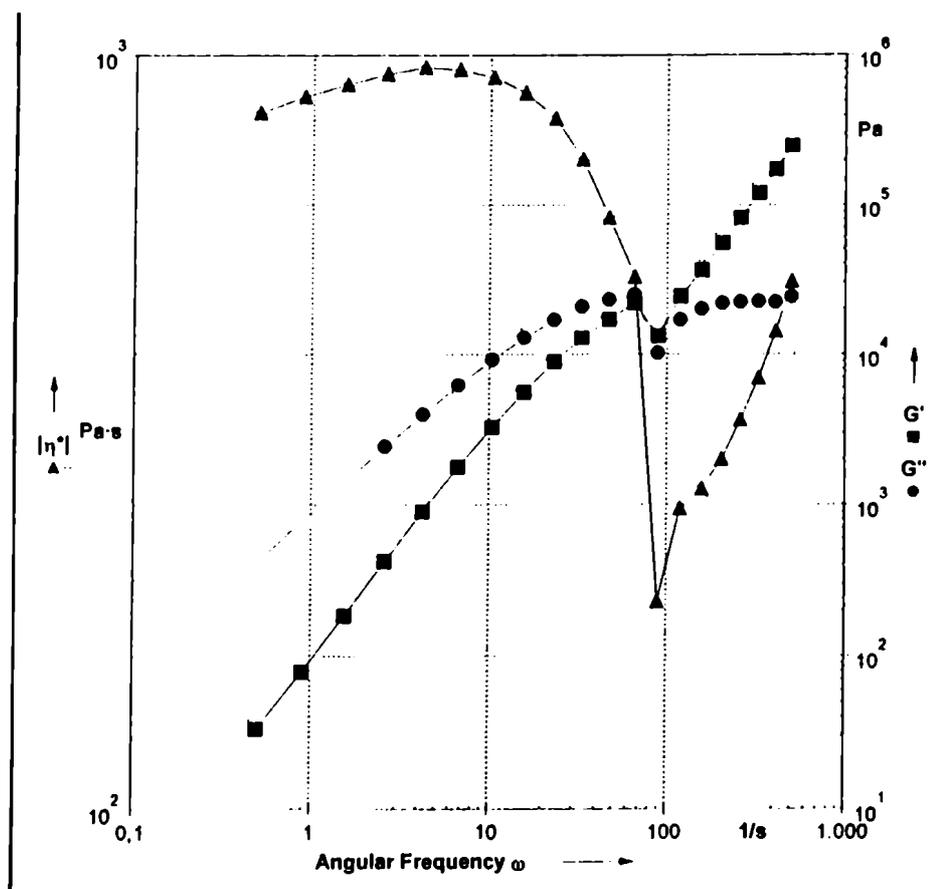


Figura 69: Módulo de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ) y viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) para una muestra de PHB obtenida de la cepa 6B en función de la frecuencia de oscilación  $\omega$  a una deformación constante de 0.15%.

El módulo de pérdida  $G''$  fue mayor al de almacenamiento  $G'$  hasta alrededor de  $100 \text{ s}^{-1}$ , luego de este valor la relación se invirtió. Este comportamiento es típico de polímeros no entrecruzados con una distribución amplia de pesos moleculares. En la región de frecuencias donde  $G'$  y  $G''$  tendieron a un plató (a partir de  $70 \text{ s}^{-1}$ ) las cadenas de PHB no pueden separarse unas de otras. De esta manera forman una red temporaria, que resultó en un flujo cuasi-estático. Al aumentar la frecuencia las cadenas de menor peso molecular pudieron alcanzar cierta movilidad, observada en el aumento de  $G'$  y  $G''$  a partir de  $100 \text{ s}^{-1}$  (Gaspar- Rosas A., 1998).

Se observó que la viscosidad compleja a menores frecuencias fue alta (cerca de  $10^3 \text{ Pa.s}$ ) y por lo tanto difícil de procesar en este rango. Luego la viscosidad disminuyó con la frecuencia hasta  $100 \text{ s}^{-1}$ , a partir de aquí comenzó a aumentar significativamente. En esta región no es aconsejable procesar el PHB obtenido, pues el material adquiere mucha rigidez.

## **7. Efecto de diferentes condiciones fermentativas sobre las propiedades físicas del PHB obtenido**

### **7.1. Peso molecular**

Como se indicó en la Introducción, el peso molecular y la distribución de pesos moleculares afectan fuertemente las propiedades mecánicas y de procesabilidad de los polímeros (Bradel y Reichert, 1993; Dennis et al., 1994). Parámetros como la resistencia al esfuerzo y al impacto, viscosidad del polímero fundido, dureza, resistencia al calor dependen del peso molecular y de su distribución. Mientras que es fundamental que para la mayoría de las aplicaciones que el peso molecular se encuentre sobre un valor mínimo, el costo energético adicional para procesar polímeros de pesos moleculares extremadamente altos es raramente justificable, excepto en la fabricación de artículos que requieran muy alta dureza (Seymour 1971). Por otro lado, oligómeros y polímeros de bajo peso molecular no son utilizados en aplicaciones en las que se busque gran resistencia.

La regulación del peso molecular, en función de las condiciones de fermentación, permite adecuar cada PHA a aplicaciones específicas, por ejemplo, como fue previamente indicado, pesos moleculares mayores que  $10^5$  no son convenientes como soportes de biodegradación en la administración prolongada de medicamentos (Korsatko et al., 1983).

A continuación se detalla el efecto de los principales parámetros de fermentación sobre el peso molecular del PHB obtenido a partir de la cepa 6B.

### 7.1.1. Efecto de la concentración de glucosa

La Figura 70 describe el efecto de la concentración de glucosa sobre  $X_{\text{PHB}}$  y  $M_r$  a 48 h de cultivo para células crecidas en erlenmeyers agitados (ver Materiales y Métodos): se observó que cuando se aumentó la concentración de glucosa  $X_{\text{PHB}}$  aumentó moderadamente al comienzo (en el rango de 10 a 30 g/l) y luego en forma aguda (a 40 y 50 g/l, donde los valores más altos fueron obtenidos). Por otro lado,  $M_r$  aumentó ligeramente cuando la concentración de glucosa varió entre 10 y 40 g/l, con un valor máximo a 40 g/l. Luego,  $M_r$  disminuyó cerca de un 20% con 50 g/l de glucosa.

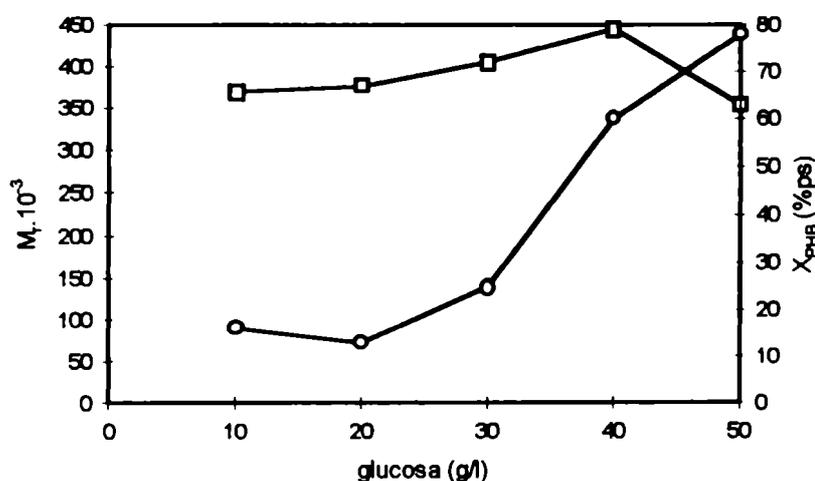


Figura 70: Efecto de la concentración de glucosa sobre el peso molecular relativo ( $M_r$ ) y contenido de PHB ( $X_{\text{PHB}}$ , %ps) a 48 h de cultivo.  $\square$  :  $M_r$ ,  $\circ$  :  $X_{\text{PHB}}$  (% peso seco).

El peso molecular del PHB fue relativamente constante y no disminuyó significativamente al aumentar la concentración de glucosa, a pesar de que un aumento en la concentración de la fuente de carbono ha sido reportado como un factor que conlleva a una reducción del  $M_r$  del PHB producido por *Methylobacterium extorquens* (Suzuki et al., 1988; Bourque et al., 1995, Taidi et al., 1994) *Alcaligenes eutrophus* (Taidi et al., 1994) y *Alcaligenes latus* (Chen et al., 1992). Sin embargo, un  $M_r$  relativamente constante ( $1.1-1.2 \cdot 10^6$  Da) fue observado también con *Alcaligenes eutrophus* usando concentraciones de glucosa de 10 a 40 g/l (Taidi et al., 1994).

Se sugiere entonces la existencia de un límite superior para el tamaño de los gránulos intracelulares de PHB a medida que  $X_{PHB}$  aumentó. De esta forma, nuevos gránulos serían formados a medida que aumentaba el contenido de PHB, debido a que los anteriores no podrían crecer más. Entonces las cadenas de PHB crecerían hasta un cierto tamaño, llegando a un cierto peso molecular. Además la distribución de pesos moleculares no sería afectada mayormente, ya que los gránulos nuevos formados probablemente serán similares a los ya formados. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el índice de polidispersión se mantuvo casi constante (entre 1.4 y 1.6) a medida que aumentó la concentración de glucosa y paralelamente la de PHB (ver 7.1.9). Otro hecho que apoya esta posibilidad es que el número de inclusiones aumentó con el tiempo de cultivo (18-24 y 48 h) en *Azotobacter vinelandii* UWD (Page et al. 1995). También se observó un acotamiento del peso molecular a concentraciones crecientes de glucosa a 24 y 72 h de cultivo (ver 7.1.3).

### **7.1.2. Efecto de la concentración de melaza**

En la Figura 71 se indican los  $M_r$  del PHB obtenido a 48 h en medio Bm con diferentes concentraciones de melaza entre 1 y 5% (p/v) como fuente de carbono en erlenmeyers agitados.  $M_r$  se mantuvo casi constante dentro del rango de 3 a  $4 \cdot 10^5$  Da al variarse la concentración de melaza entre 1 y 4%, mientras que aumentó significativamente a  $6.4 \cdot 10^5$  Da con una concentración de 5%.

No hubo acumulación de PHB con 1-2% de melaza, debido a la baja concentraciones de hidratos de carbono (ver Tabla N°24). Luego,  $X_{PHB}$  aumentó en forma continua (de 3 a 5%), llegando a un máximo de 40% con 5% de melaza.

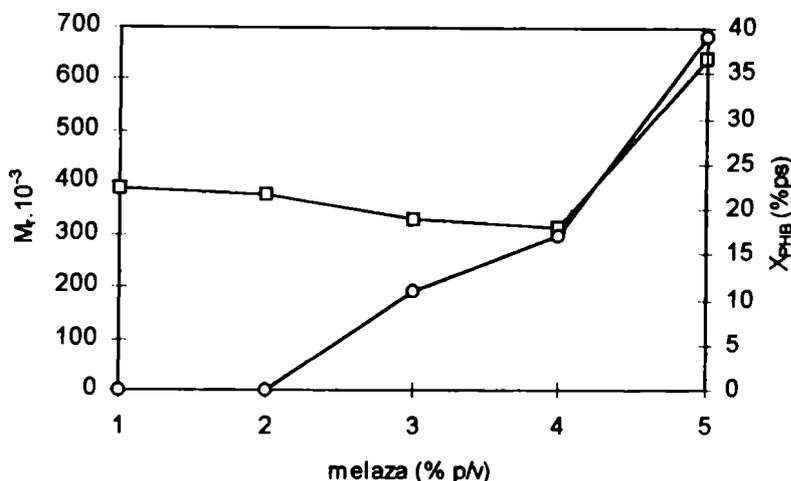


Figura 71: Peso molecular relativo ( $M_r$ ) y contenido de PHB ( $X_{PHB}$ , %ps) a distintas concentraciones de melaza de caña de azúcar en erlenmeyers agitados a 48 h de cultivo.

□ :  $M_r$ , ○ :  $X_{PHB}$  (% peso seco).

Chen y Page (1994) confirmaron una disminución del  $M_r$  del PHB obtenido de *Azotobacter vinelandii* UWD cuando la concentración de melaza aumentó de 5 a 10% a 24 h de cultivo. El aumento del  $M_r$  a 5% de melaza puede relacionarse con el aumento del contenido intracelular de PHB, aunque en otras condiciones no hubo una correlación directa definida.

### 7.1.3. $M_r$ a distintos tiempos de cultivo y concentraciones de glucosa

$M_r$  fue determinado sobre el PHB biosintetizado por la cepa 6B en medio Bm a diferentes concentraciones de glucosa en erlenmeyers agitados. Valores muy bajos (del orden de 50 kDa) fueron obtenidos para todas las concentraciones de glucosa experimentadas a 24 h, mientras que los máximos  $M_r$  se obtuvieron a 48 h. Luego  $M_r$  disminuyó un promedio de 17% desde 48 a 72 h (Tabla N° 31). La mayor reducción (de un 28%) en  $M_r$  se observó con 40 g/l de glucosa.

	Glucosa (g/l)				
	10	20	30	40	50
tiempo (h)	$M_r \cdot 10^{-3}$				
24	55	75	70	68	80
48	370	375	406	445	354
72	307	310	390	320	294

Tabla N° 31: Peso molecular relativo ( $M_r$ ) en función del tiempo a diferentes a concentraciones de glucosa.

La disminución del  $M_r$  del PHB durante el transcurso del cultivo fue observada también con *Alcaligenes eutrophus* utilizando fructosa,  $M_r$  se redujo de  $1.7 \cdot 10^6$  hasta  $1.3 \cdot 10^6$  a 17 y 27 h de cultivo, respectivamente (Bradel y Reichter, 1993). También en cultivos limitados en fosfato y magnesio se verificó una disminución del peso molecular y un ensanchamiento de su distribución en cultivos en fase estacionaria *A. eutrophus* (Andersen P., 1989).

Como en fase estacionaria se ha observado que el PHB comienza a degradarse, esta degradación puede llevar a una disminución del peso molecular, dado que las cadenas son recortadas a medida que la degradación intracelular procede. Una posible explicación para esta observación es la de la existencia de turn-over del PHB, en condiciones donde algunos de los nutrientes han sido agotados (fase estacionaria) y donde el control del metabolismo de la fuente de carbono es menos eficiente (Tempest 1984). Así en el balance del turn-over existe una degradación neta y disminución en el peso molecular. Debe señalarse que esta explicación no puede generalizarse a la relación de contenido y peso molecular de PHB en otras fases del cultivo o cuando existe otro factor variable en el medio (ver, por ejemplo, efecto del pH más adelante).

#### 7.1.4. $M_r$ a distintos tiempo de cultivo con melaza de caña de azúcar al 5%

Se determinó el  $M_r$  a diferentes tiempos de cultivo en batch en medio Bm con melaza al 5% (p/v) en erlenmeyers agitados.  $M_r$  se mantuvo en un rango de entre  $5 \cdot 10^5$  y  $7 \cdot 10^5$  Da. En la Tabla N° 32 se puede ver un ligero aumento en  $M_r$  durante el transcurso del cultivo entre 24 y 72 h.  $X_{PHB}$  fue muy reducido a 24 horas de cultivo. Paralelamente, altos contenidos de PHB fueron detectados a 48 y 72 h (56 y 39%, respectivamente). No se halló correlación entre  $X_{PHB}$  y  $M_r$ , ya que el contenido de PHB fue muy bajo mientras que  $M_r$  fue considerablemente alto ( $5.3 \cdot 10^5$ ) a 24 h.

tiempo (h)	$X_{PHBmax}$ (%cdw)	$M_r \cdot 10^{-3}$
24	5	530
48	57	640
72	39	705

Tabla N° 32: Peso molecular relativo ( $M_r$ ) y contenidos máximos de PHB ( $X_{PHB}$ , %ps) en función del tiempo con 5% (p/v) de melaza de caña de azúcar.

$M_r$  aumentó aproximadamente un 30% hacia tiempo final de cultivo (72 h). Aumentos de hasta un 100% en el  $M_r$  del PHB obtenido de *Azotobacter vinelandii* UWD fueron reportados en un período de 24 h, desde  $2 \cdot 10^6$  a  $4 \cdot 10^6$  Da., utilizando melaza de remolacha como fuente de carbono, cuando el cultivo dejaba de crecer (Chen y Page, 1994). Estos resultados indicaron un comportamiento diferencial de los cultivos con melaza respecto de los cultivos con glucosa. Dado que la melaza aportó algunos microelementos al agregarse al medio Bm, es aceptable que ésta provisión adicional contribuyera a que el agotamiento de los mismos se produzca más tardíamente respecto del medio Bm con glucosa, evitando la condición que se sugiere como desencadenante de la degradación y consecuente disminución en el peso molecular (ver punto anterior).

### 7.1.5. Efecto de la temperatura de cultivo

Cuando se redujo la temperatura de cultivo de 30 a 20°C utilizando células crecidas en medio Bm en fermentador (0.5 vvm, C/N 69),  $X_{\text{PHB}}$  y  $M_r$  final (72 h) fueron significativamente afectados. Los  $M_r$  finales del PHB fueron 445 y 1350 kDa a 20 y 30°C, respectivamente. La curva de acumulación de PHB en el tiempo a 30°C fue cerca

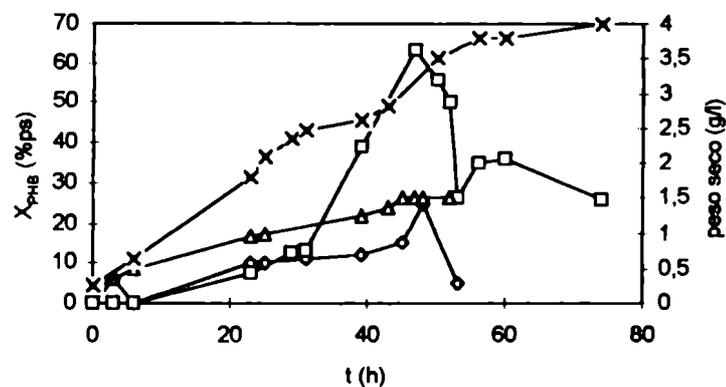


Figura 73: Contenidos de PHB ( $X_{\text{PHB}}$ , % peso seco) y biomasa ( $X$ , g/l) para dos cultivos en batch realizados a 20 y 30°C.  $\square$ ,  $\diamond$ :  $X_{\text{PHB}}$  a 20 y 30°C;  $\Delta$ ,  $\times$ : peso seco a 20 y 30°C, respectivamente. Cultivo a 30°C: fed-batch de glucosa a 53 h

de un 50% mayor que a 20°C (Figura 73).

Esta significativa reducción del peso molecular al disminuir la temperatura de cultivo no fue observada sin embargo con *Methylobacterium extorquens* (Suzuki et al., 1988).

El contenido celular se vió significativamente reducido a 20°C respecto de 30°C. Esto es consistente con la disminución de la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  en cultivos en erlenmeyer a 20 y 35°C respecto de 30°C (ver 2.2.10).

### 5.1.6. Efecto del pH

En cultivos batch en fermentador efectuados a 0.5 vvm y una relación C/N de 69 (condiciones de limitación de amonio y exceso de glucosa) se fijó el pH inicial en 7.5, 7.0 y 6.5, y el  $M_r$  final (a 72 h de cultivo) del PHB obtenido fue determinado. El máximo  $M_r$  final fue de 2.250 kDa a un pH inicial de 7.0.  $M_r$  se redujo al experimentar pH iniciales de 6.5 y 7.5, a pesar de ello los valores fueron igualmente altos. Los  $X_{PHB \max}$  fueron obtenidos cerca de 48 h en los tres cultivos. Los mayores contenidos máximos y finales de PHB se obtuvieron con un pH inicial de 7.5. En la Tabla N° 33 se muestran los  $X_{PHB}$  finales,  $X_{PHB}$  máximos, pH final promedio de las últimas cinco horas de cultivo y  $M_r$  final para cada uno de los cultivos en batch. No hubo relación definida entre el  $X_{PHB}$  y  $M_r$ . El efecto del pH pudo observarse sobre la biomasa final, que fue máximo a pH 7.0 (ver 2.2.12 sobre el efecto de regulación del pH).

pH inicial	pH final promedio (a)	$X_{PHB \max}$ (% ps)	$X_{PHB}$ final (%ps) (b)	$Y_{PHB/glu}$ (g/g) (c)	Xfinal (g/l)	$M_r \cdot 10^{-3}$
6.5	7.0	63.5 (47 h)	26	0.29	5.4	1100
7.0	6.5	49 (49 h)	41.5	0.33	3.25	2250
7.5	6.1	73 (48 h)	50	0.32	3	1150

Tabla N° 33: Efecto del pH inicial de cultivo sobre el peso molecular final (72 h) del PHB obtenido bajo cultivo batch en fermentador con medio Bm.

- (a) pH final promedio de las últimas cinco horas de cultivo  
 (b) tiempo de cultivo de máximo contenido de PHB  
 (c) al tiempo de máximo contenido de PHB

Con un pH final de 6.5 se alcanzaron los mayores  $M_r$  obtenidos. El mayor crecimiento celular se encontró a un pH final promedio de 7.0. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con *Protomonas extorquens*, donde el pH al cual se obtenía el mayor crecimiento celular no correspondía con el pH de máximo  $M_r$  (Suzuki et al., 1988). Estos autores reportaron que pH neutrales producían una disminución en el  $M_r$ , respecto a pH ácidos o básicos. Valores de pH promedio diferentes a 6.5 al final de las fermentaciones resultaron en disminuciones significativas de  $M_r$  (con pesos moleculares dos veces

menores). Bradel y Reichert (1993) también encontraron un pronunciado efecto del pH sobre el peso molecular del PHB obtenido de cultivos de *Alcaligenes eutrophus* crecidos en fermentador:  $M_r$  disminuyó de  $3.4 \cdot 10^6$  a  $0.1 \cdot 10^6$  cuando el pH se cambió de 6.5-7.0 a 5.5-6.0. El pH es un factor influyente sobre el poder reductor de la célula, si se considera su influencia sobre la relación  $[NADH] \leftrightarrow [NAD^+] + H^+$ , afectando entonces la actividad de todas las oxidoreductasas (Neijssel 1993).

#### **7.1.7. Peso molecular de muestras de PHB obtenidas de cultivos en erlenmeyers agitados y en fermentador**

El peso molecular del PHB obtenido de cultivos con glucosa se encontró dentro del mismo orden que el del PHB proveniente de células crecidas con melaza cuando en ambos casos se utilizaban erlenmeyers agitados (a 220 rpm y 30°C). Cuando las células fueron crecidas con glucosa en fermentador, con idéntico medio de cultivo, éstas biosintetizaron PHB de peso molecular significativamente mayor: el valor de  $2.93 \cdot 10^6$  obtenido de cultivos en fermentador en medio Bm con glucosa 1% a un pH inicial de 7.0 está en el rango de los pesos moleculares más elevados reportados para el PHB obtenido dentro de la familia *Azotobacteriaceae*, y cercano al valor máximo de  $4 \cdot 10^6$  reportado para cultivos de 24 h de *Azotobacter vinelandii* UWD crecido en melaza de remolacha (Page y Chen, 1994).

El peso molecular del PHB obtenido de cultivos en fermentador con melaza de caña de azúcar fue también significativamente mayor que el del PHB proveniente de erlenmeyers agitados. Esto sugiere que, en frascos agitados, la biosíntesis de PHB encuentra un límite superior para el grado de polimerización, ya que la velocidad de transferencia de oxígeno es mayor que en cultivos realizados en fermentador (Wang 1979). Esto lleva a una reducción del  $M_r$  del PHB, ya que, como hemos señalado, un mayor suministro de oxígeno (como vvm) redujo el  $M_r$  del PHB obtenido a partir de la cepa 6B crecida en fermentadores con glucosa (Quagliano y Miyazaki, 1997, ver 7.1.8). Por otra parte, otros autores también han señalado que mantener concentraciones limitantes de oxígeno

era un factor crítico para alcanzar altas productividades de PHB con una cepa de *Azotobacter chroococcum* (Lee et al., 1995).

#### 7.1.8. Efecto de la tasa de aireación

En la Figura 74 se graficó el peso molecular relativo ( $M_r$ ) del PHB obtenido a tiempo final (72 h) para cultivos en fermentador en el medio Bm, a una relación C/N de 69, en función de la tasa de aireación, medida como volumen de aire por volumen de cultivo por minuto ( $vvm, h^{-1}$ ). Este parámetro permite unificar en una sola variable el volumen del medio de cultivo y la aireación suministrada. Un aumento de 4 veces en  $X_{PHB}$  fue determinado al reducir la aireación desde 2.5 a 0.5  $vvm$ . Esto es consistente con el hecho reportado en *Azotobacter beijerinckii* de que la biosíntesis de PHB comienza cuando la d.o.t. disminuye a valores bajos (Senior y Dawes, 1971; Carter y Dawes, 1973). Sin embargo, al reducir la tasa de 0.5 hasta 0.25  $vvm$ , hubo una disminución en el contenido intracelular de PHB. El  $M_r$  aumentó significativamente en forma continua al disminuir la tasa de aireación desde 2.5 a 0.25  $vvm$ .

El  $M_r$  final se correlacionó con los contenidos finales de PHB entre 0.5 y 2.5  $vvm$ , ya que al aumentar  $X_{PHB}$  (debido a la activación del camino biosintético de formación de PHB) aumentó también en las cadenas iniciadoras del polímero el número de monómeros incorporados y por lo tanto el peso molecular. Sin embargo, el proceso de elongación de las cadenas poliméricas no se debe solamente a un mero aumento de la actividad biosintética, como lo demostró la reducción de  $X_{PHB}$  a 0.25  $vvm$ , aireación a la que se obtuvo el mayor  $M_r$ . (2930 kDa).

Con una aireación de 2.5  $vvm$  el  $M_r$  obtenido fue bajo (cerca de 110000 Da). Bajos pesos moleculares no son deseables desde el punto de vista de las aplicaciones de un plástico, ya que, por ejemplo, la estabilidad térmica es mucho menor en muestras de menor peso molecular, siendo un producto de baja masa molecular susceptible a una apreciable pérdida de productos de degradación volátiles a medida que aumenta la temperatura (Scandola et al., 1988).

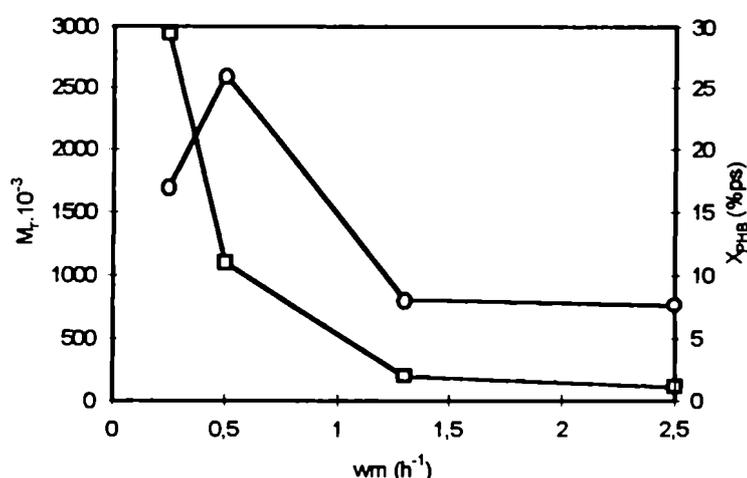


Figura 74: Peso molecular relativo ( $M_r$ ) y contenido de PHB ( $X_{PHB}$ ) bajo diferentes tasas de aireación sobre medio Bm (C/N 69) a 72 h de cultivo.

□ :  $M_r$ , ○ :  $X_{PHB}$  (% peso seco).

De los resultados obtenidos se comprobó que la tasa de aireación en los cultivos ejerce un efecto muy pronunciado sobre el sistema de polimerización de la cepa 6B. Esto sugiere que la concentración de oxígeno regula el contenido y peso molecular del PHB obtenido de la cepa 6B, dado que en última instancia la acumulación intracelular de PHB depende de que el microorganismo necesite o no de mayor poder reductor (Senior y Dawes 1971, Carter y Dawes 1979).

Este efecto también ha sido descrito por otros autores, quienes encontraron que la concentración de oxígeno, antes que la fuente carbonada, era el factor regulador del peso molecular del PHB obtenido de una bacteria metilótrofa, obteniendo pesos moleculares entre 900 y 1800 kDa cuando la concentración de oxígeno no era limitante (Bourque et al., 1995).

### 7.1.8.1. Efecto de la anaerobiosis sobre $M_r$ del PHB obtenido con melaza

Cuando se burbujeó  $N_2$  desde 63.5 a 70.5 h de cultivo batch en fermentador con medio Bm con 5% de melaza como fuente de carbono (Materiales y Métodos),  $M_r$  final (a 72 h) cayó a 65.000 Da, respecto del cultivo efectuado completamente bajo condiciones aeróbicas ( $M_r$  final 1.420.000 Da). Esto representó una reducción de más de veinte veces en el peso molecular relativo.  $X_{PHB}$  fue del 12% en ambos cultivos a 70.5 h. La densidad óptica a 610nm bajo condiciones anóxicas se incrementó de 5.5 a 7.5 entre 63.5 y 70.5 h, respectivamente.

Esta significativa reducción en  $M_r$  observada cuando se creó la condición anaerobia confirmó las anteriores observaciones de que el oxígeno juega un rol principal en la regulación de la masa molecular del PHB obtenido de *Azotobacter*. Más aún, como la cepa 6B es un fijador de nitrógeno atmosférico, se sugiere otra posible explicación para la reducción de peso molecular observada: el PHB de elevado  $M_r$  obtenido bajo condiciones aeróbicas fue depolimerizado en condiciones anóxicas a consecuencia de la inducción del sistema de fijación de nitrógeno, en el medio Bm deficiente en amonio. La activación del sistema de fijación exige de la utilización y consecuente depolimerización del PHB para proveer de la energía necesaria para la reducción del nitrógeno a amonio asimilable (Mulder y Botoronegoro, 1974). También se han reportado disminuciones en el  $M_r$  cuando el PHB fue degradado bajo condiciones de limitación de amonio, utilizando la bacteria *A. eutrophus* (Taidi et al., 1994).

### 7.1.9. Efecto de la relación C/N

Se midió el peso molecular relativo a tiempo final (72 h) del PHB extraído y purificado de los cultivos en fermentador efectuados en medio Bm con glucosa 1% a diferentes relaciones C/N (ver 3.8). El peso molecular relativo alcanzó un alto valor (1.330 kDa) con la menor relación C/N experimentada, mientras que al aumentar la relación C/N a 137.7 el  $M_r$  disminuyó un 17%. Por otra parte,  $X_{PHB}$  aumentó cinco veces al incrementar la relación C/N de 7.3 a 137.7. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 62.

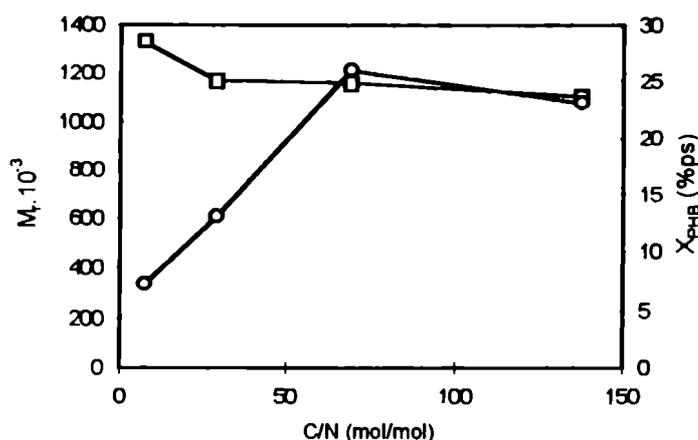


Figura 75: Peso molecular relativo ( $M_r$ ) y contenido de PHB ( $X_{PHB}$ ) bajo diferentes relaciones C/N en medio Bm con glucosa al 1% a 72 h de cultivo. (□) :  $M_r$ , (○) :  $X_{PHB}$  (% peso seco).

Se verificó que la relación C/N tuvo menor incidencia sobre el  $M_r$  que la tasa de aireación. Esta observación refuerza la observación de que la tensión de oxígeno disuelto (d.o.t.) es el factor principal que controla el  $M_r$  en *Azotobacter chroococcum* cepa 6B, como fue observado con *Methylobacterium extorquens* (Bourque et al., 1995).

Se ha sugerido que la PHB sintasa adiciona los monómeros por un mecanismo de elongación por transferencia de cadena, y que este mecanismo controla de algún modo el peso molecular del polímero producido, que es característico para un dado microorganismo. La enzima está fijada al extremo carboxílico de la cadena creciente de PHB, e inserta los monómeros entre ella y la cadena de polímero (Anderson y Dawes 1990, Doi 1990, Bradel y Recihert 1993).

#### 7.1.10. Índice de polidispersión (D) de las muestras de PHB obtenidas. Distribución de pesos moleculares

La curva de distribución de pesos moleculares puede describirse en función del peso molecular medio en número ( $M_n$ ), que se obtiene dividiendo la suma de los pesos moleculares individuales por el número de moléculas ( $(\sum N_i M_i / \sum N_i)$ ), y el peso molecular

promedio en peso,  $M_w$ , que es el momento de segundo orden o media cuadrática ( $\sum N_i M_i^2 / \sum N_i M_i$ ), (donde  $N_i$  es el número de cadenas con peso molecular  $M_i$ ). Así cada molécula contribuye a la medida final de acuerdo a su tamaño. Esta media es más sensible al número de moléculas pesadas que  $M_n$ , el cual sólo depende del número total de partículas.

Se define el índice de polidispersión ( $D$ ) como el cociente entre el peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) y el peso molecular promedio numérico ( $M_n$ ). Puesto que  $M_w$  es siempre mayor que  $M_n$ , a excepción de los sistemas monodispersos, donde son coincidentes (por ejemplo, las proteínas),  $D$  será mayor o igual a 1. A mayor  $D$ , la curva de distribución de pesos moleculares será más extendida o chata, indicando una mayor dispersión de pesos moleculares en la muestra.

Cuando se cultivó la cepa 6B en erlenmeyers agitados a concentraciones crecientes de glucosa o melaza se obtuvieron índices  $D$  entre 1.4 y 1.9 para el PHB obtenido a 48 h de cultivo (ver 7.1.1., 7.1.2). Con melaza,  $D$  fue significativamente mayor que con glucosa solamente a concentraciones de 3 y 4%. En el caso de los cultivos con distintas concentraciones de glucosa (punto 7.1.3), al reducirse el  $M_w$  de 48 a 72 h, la dispersión se mantuvo aproximadamente constante (1.45-1.55, 1.4-1.3, 1.45-1.4 para 3, 4 y 5% de glucosa a 48 y 72 h, respectivamente). Estos resultados pueden explicarse considerando un sistema de depolimerización que elimine los monómeros secuencialmente desde el final de las cadenas de PHB (Bradel y Reichert 1993).

El índice  $D$  disminuyó (indicando una distribución de pesos moleculares más aguda) a medida que se redujo la relación C/N desde 69 y 29 a 7.3 bajo cultivo batch en fermentador. Con melaza (al 5%) en fermentador se obtuvo una polidispersión

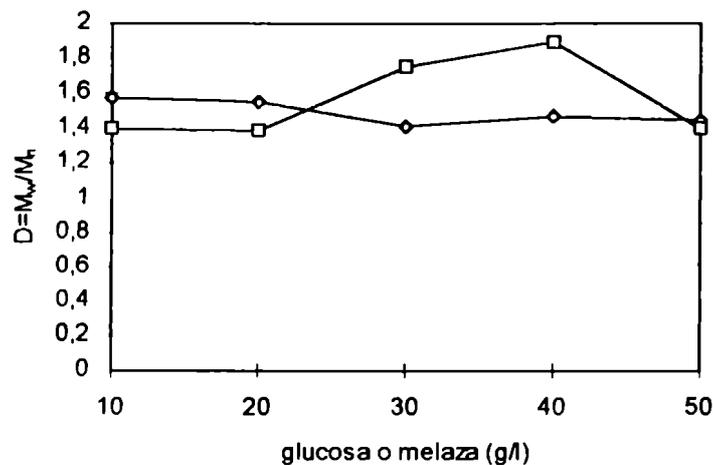


Figura 76: Índices de polidispersión (D) de muestras de PHB obtenidas en medio Bm con diferentes concentraciones de glucosa y melaza como fuentes de carbono.  $\diamond$  glucosa,  $\square$  : melaza.

considerable ( $D=4.15$ ) para el PHB obtenido a tiempo final (72 h de cultivo). En la Figura 76 se indican los índices D para cultivos con glucosa y melaza en erlenmeyers agitados y en la Tabla N° 34 los índices D para cultivos en fermentador con distintas relaciones C/N.

C/N (mol/mol)	D
69	2.3
29	2.37
7.3	1.8

Tabla N° 34: Índice de polidispersión (D) de muestras de PHB obtenidas bajo cultivo en batch en fermentador a diferentes relaciones C/N en medio Bm con glucosa a 72 h de cultivo.

Los valores de D fueron significativamente mayores en fermentador que en erlenmeyers agitados. Cuanto más polidispersa es la muestra de PHB (mayor D), puede considerarse

al polímero plastificado por cadenas del mismo PHB, pero de menor longitud. De esa forma el PHB tendría un mayor carácter termoplástico.

De igual forma, los resultados obtenidos bajo ambos sistemas de cultivo sugieren que la cepa 6B biosintetiza un PHB nativo de una considerable homogeneidad, indicando la existencia de un mecanismo que sintetiza polímeros de tamaño de cadena muy uniforme (De Mola et al., 1975). Este no es el caso de los polímeros obtenidos por síntesis orgánica, donde la distribución de pesos moleculares es menos homogénea y más dispersa (Seymour 1971). En la Figura 77 se muestra una de las curvas para la distribución de pesos moleculares de una muestra de PHB, obtenida a 53 h de una fermentación realizada a 0.5 vvm y C/N 69, donde pudo comprobarse que la distribución fue aguda:

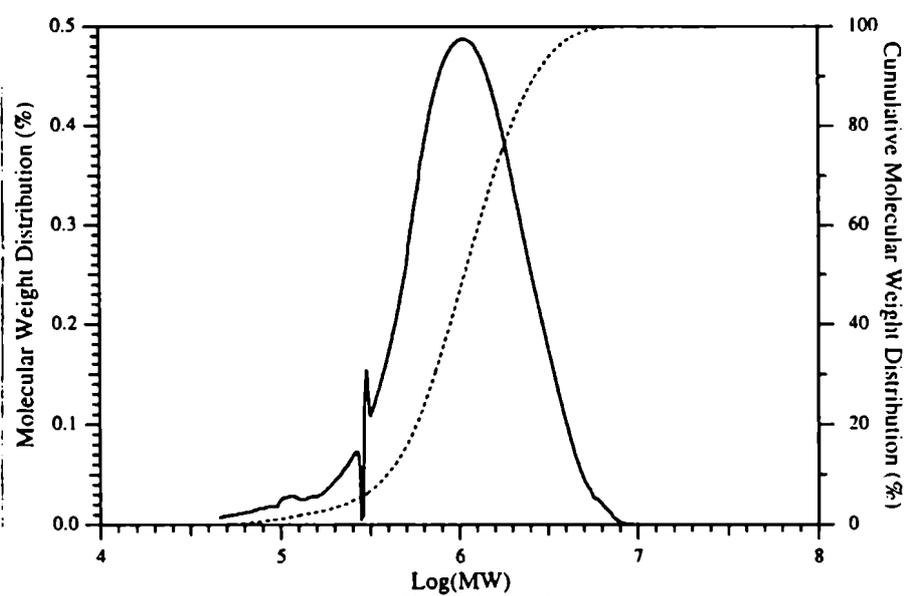


Figura 77: Curva de distribución de pesos moleculares para una de las muestras de PHB obtenida bajo cultivo de la cepa 6B en fermentador a 53 h (0.5 vvm, C/N 69).

#### 7.1.11. Efecto de las técnicas de extracción sobre el $M_r$ del PHB: Extracción completa, con tensioactivo y directa en continuo

Se compararon los  $M_r$  de tres muestras de PHB obtenidas por tres métodos diferentes de extracción a partir de un stock común de células liofilizadas provenientes de un cultivo en batch, dividido en tres submuestras de la misma masa.

El método de extracción de PHB más común es el de Williamson y Wilkinson (extracción completa), que involucra el uso secuencial de hipoclorito de sodio, acetona, etanol para eliminar otros componentes (polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y extracción final en batch con cloroformo (ver Materiales y Métodos).

Para facilitar la extracción se ensayó un método alternativo, introducido por Ramsay y colaboradores (1990) que utiliza hipoclorito de sodio con el agregado de un tensioactivo (Triton X-100). En nuestra experiencia utilizamos Triton X-114 (ver Materiales y Métodos). La desventaja principal del método estriba en que el hipoclorito disminuye el peso molecular del PHB obtenido. Al analizar la pureza del PHB (por medio de un barrido espectral UV-VIS de una solución clorofórmica, comparada con un patrón de PHB (Sigma Chemical Co.)) se verificó que no existieron impurezas. Cuando se midió el  $M_r$ , se observó que fue cerca de tres veces menor que utilizando el método de extracción completo de Williamson y Wilkinson ( 420.000 y 1.290.000 Da, respectivamente).

Por último se comparó con el método de extracción directa en continuo en un aparato de Soxhlet de la biomasa liofilizada. Se hizo recircular el solvente durante 16 horas y se reprecipitó tres veces en etanol. El polímero reprecipitado se liofilizó con un volumen de benceno. Se verificó la ausencia de impurezas en el PHB obtenido por medio de un barrido espectral UV-VIS, contrastando con patrón de PHB. El peso molecular relativo (1.500.000 Da) fue 16% y 3.5 veces mayor que con los métodos descritos de extracción completa y con hipoclorito más tensioactivo, respectivamente. Se siguió utilizando este método por su ventaja de ser el que menos altera el peso molecular del PHB nativo presente en el gránulo intracitoplasmático (Ramsay et al., 1990).

método de extracción	$M_r \cdot 10^{-3}$
completo	1290
con hipoclorito y tensioactivos	420
directa del liofilizado	1500

Tabla N°35: Comparación de los pesos moleculares relativos ( $M_r$ ) de muestras de PHB obtenidas con tres métodos de extracción.

Scandola y colaboradores (1988) también obtuvieron también reducciones en el peso molecular (de  $10^6$  a  $6 \cdot 10^4$  Da) al efectuar extracciones de PHB utilizando HCl 1M respecto de extracciones suaves con solventes, respectivamente. Una considerable reducción del peso molecular (de  $2.8$  a  $1.8 \cdot 10^6$  Da) se obtuvo al aumentar la relación de masa celular a hipoclorito de  $0.15$  a  $0.65$  g/g (Page y Cornish 1993).

### 7.2. Temperatura de fusión ( $T_m$ )

La temperatura de fusión del PHB aislado y purificado de cultivos efectuados en distintas condiciones de fermentación se encontró en todos los casos ensayados dentro de un rango de  $3$  a  $5^\circ\text{C}$  de diferencia (ver Tabla N° 36, más adelante), con un valor promedio de  $177^\circ\text{C}$  (obtenidas por calorimetrías diferenciales de barrido (DSC), ver Materiales y Métodos). Este corresponde al punto de fusión reportado en la Bibliografía para el ácido poli-3-hidroxi-butírico (Doi 1990). La cepa 6B es entonces capaz de biosintetizar únicamente el homopolímero PHB, como se observara anteriormente en los resultados de cromatografía gaseosa (ver 4.4).

Cuando se analizó una muestra de PHA extraída y purificada de un cultivo en medio Waksman 79 de *Rhizobium meliloti*, la  $T_m$  se registró a  $167.7^\circ\text{C}$ . Esto indicó que la bacteria sintetizó un PHB con una fracción de monómero 3-hidroxivalerato (3-HV), dado que la copolimerización disminuye la  $T_m$  (Doi 1990; Orts et al. 1991). Esta fracción fue de  $0.15$ , de acuerdo a la relación de áreas obtenida de los cromatogramas. En la siguiente Figura se muestran algunos de las calorimetrías realizadas.

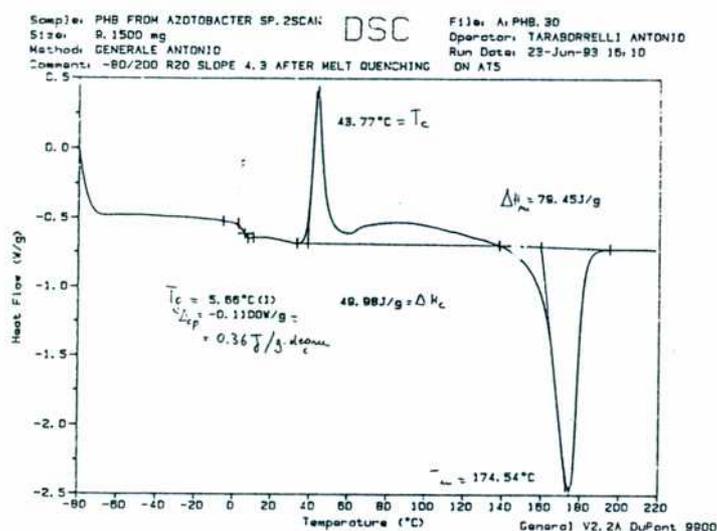
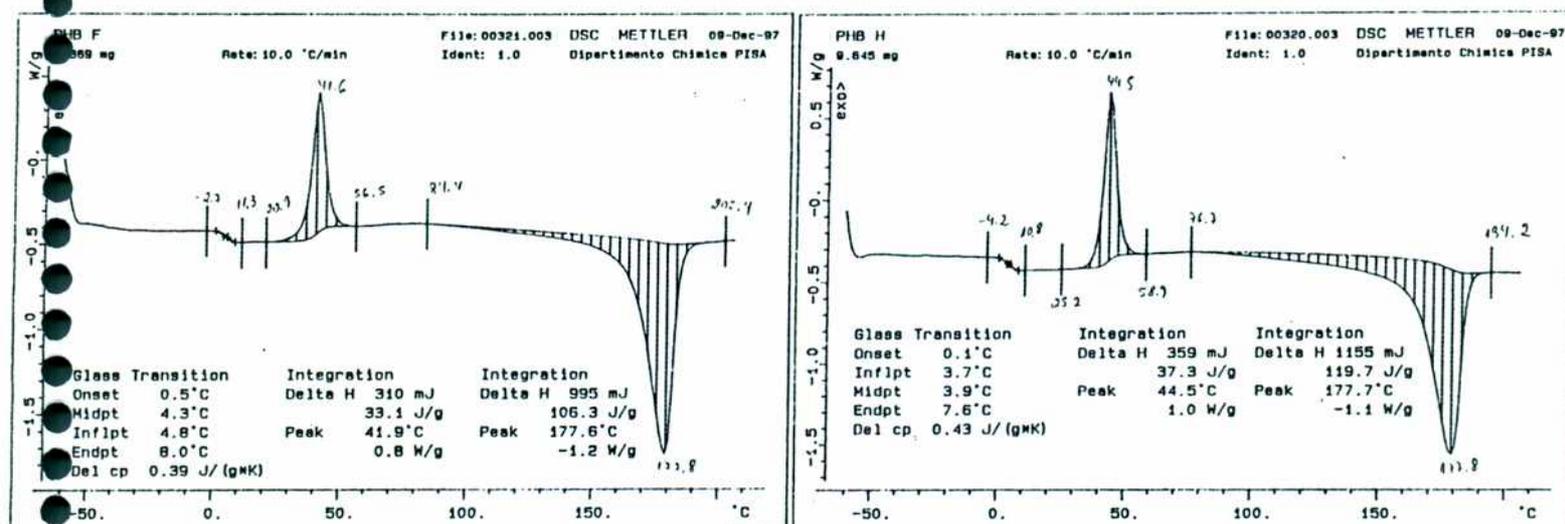


Figura 78: Calorimetrías diferenciales de barrido (DSC) efectuadas sobre muestras de PHB obtenidas bajo diferentes condiciones fermentativas. a. 0.5 vvm, C/N 29; b. 0.5 vvm, C/N 7.3; c. 2.5 vvm, C/N 69.

La copolimerización realizada por la enzima PHAsintasa de *R. meliloti* produjo un copolímero de 3-HB y 3-HV con una  $T_m$  casi  $10^\circ\text{C}$  menor que la del homopolímero PHB. El grado de copolimerización depende del microorganismo y del medio de cultivo (Anderson y Dawes, 1990). Esto permite la obtención de PHAs con una gama de propiedades ajustables al uso al cual desee aplicarse.

### **7.3. Grado de termoplasticidad: Temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ )**

Los materiales generalmente se ablandan a temperaturas bastante menores a su punto de fusión, esta temperatura de fluidez es conocida como temperatura de transición vítrea. A esta temperatura, el polímero comienza a tener un movimiento molecular de las cadenas laterales, por lo que algunas propiedades físicas como ser la densidad o el calor y volumen específico cambian. La  $T_g$  es una propiedad característica de a región amorfa del polímero, por lo general no es afectada por cambios en el grado de cristalinidad (Brandrup 1989).

El carácter termoplástico no se vió modificado en las diferentes condiciones fermentativas ensayadas, ya que la  $T_g$  varió en un rango limitado a menos de 2°C (Tabla N° 36). Se ha reportado que la  $T_g$  de un homopolímero regular aumenta hasta un valor limite, a medida que se alcanza un determinado peso molecular umbral (Brandrup 1989). De acuerdo con los resultados obtenidos, este peso molecular es menor a 110.000 Da para el PHB, dado que los pesos moleculares de las muestras de PHB analizadas se hallaban por encima de ese valor, y todas tuvieron una  $T_g$  de entre 4-6°C.

El cambio entálpico para la transición vítrea fue de 0.41 J/g°C en promedio, que es pequeño frente al calor necesario para la fusión (promedio 117 J/g°C). De acuerdo a las  $T_g$  obtenidas, el PHB obtenido fue termoplástico en todas las condiciones fermentativas experimentadas. Un hecho resaltable es que la  $T_g$  del poliéster biológico PHB es intermedia entre la de un poliésteres alifático obtenidos por síntesis química, como el poliadipato de etilenglicol ( $T_g$  alrededor de -50°C) y la de un poliéster aromático como el polietilentereftalato (PET) ( $T_g$  70°C). Por lo tanto, a temperatura ambiente, el PHB tendrá mayor tendencia a fluir (menor rigidez) que el PET, pero una mayor rigidez que la del poliadipato de etilenglicol.

Microorganismo	Condiciones de fermentación	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>d</sub> (°C) (d)	ΔH <sub>m</sub> (J/g°C)	%crista -linidad	M <sub>r</sub> · 10 <sup>-3</sup> (Da)
<i>A. chroococcum</i> 6B	Y (fijación, 0.5 vvm, 100 rpm)	180.9	n.d.	291	86	59	1420
	F (C/N 29, 0.5 vvm, 100 rpm)	178.8	4.3	261.7	106.2	73	1170
	B (C/N 69, 2.5 vvm, 100 rpm)	178.2	5.7	n.d.	90.5	62	110
	H (C/N 7.3, 0.5 vvm, 100 rpm)	177.8	3.9	268	120	82	1330
	P (melaza 5%, 0.5 vvm, 100 rpm)	173.9	n.d.	286	78.5	54	1420
	A (C/N 138, 2 vvm, 400 rpm)	173.0	n.d.	250 <sub>(b,c)</sub>	80	55	150
<i>Alcaligenes latus</i>	medio mineral glucosa aerobio	178.1	3.3	n.d.	124.9	86	525 <sub>(a)</sub>
<i>Rhizobium meliloti</i>	medio W79, erlenmeyers agitados a 220 rpm	167.7	n.d.	240 <sub>(b)</sub>	52.8	36	n.d.

n.d.: no determinado. a: obtenido por el proveedor por GPC b: obtenidas por DSC c: de inicio de descomposición d: temperatura a la cual se registró el mayor % de pérdida de masa

Tabla N° 36: Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), de transición vítrea (T<sub>g</sub>), de descomposición (T<sub>d</sub>) y peso molecular relativo (M<sub>r</sub>) de muestras de polihidroxialcanoato obtenido de tres microorganismos en las condiciones indicadas.

#### **7.4. Efecto sobre la estabilidad térmica: Temperatura de descomposición. Relación con el peso molecular**

La medición de la estabilidad térmica en una atmósfera inerte (temperatura de descomposición) es importante pues es conocido que tratamientos a altas temperaturas, como en el procesamiento por fundido o tratamientos térmicos tendientes a mejorar las propiedades cristalinas (“annealing”) pueden influenciar las propiedades físicas del PHB debido a la degradación térmica.

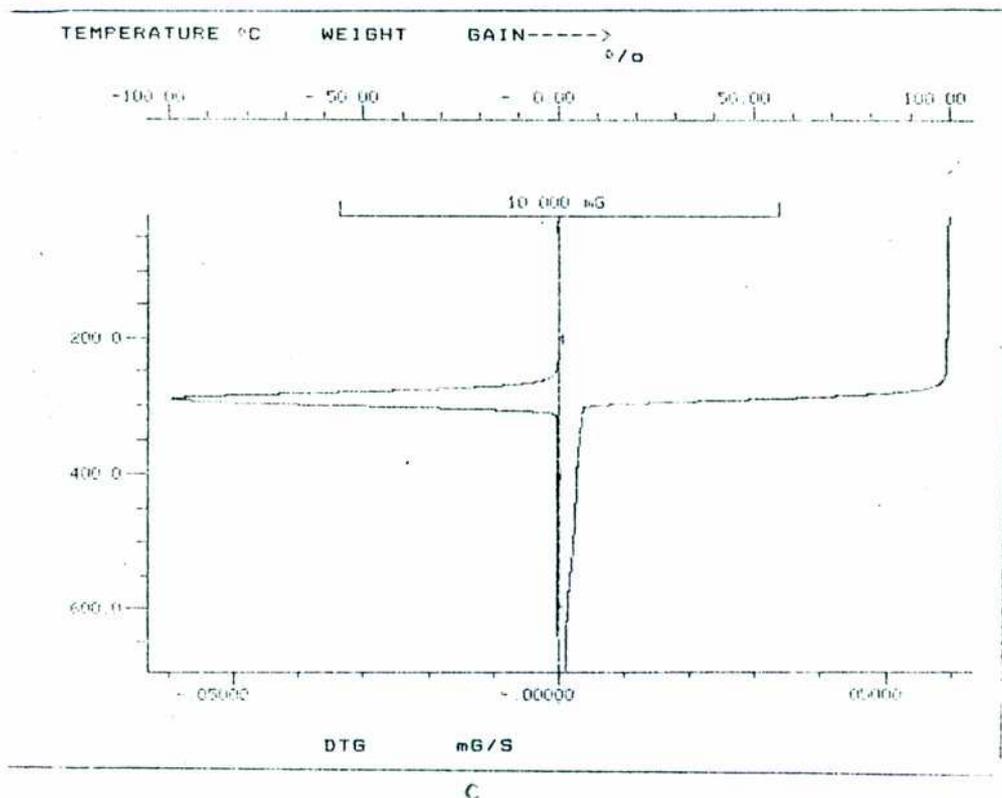
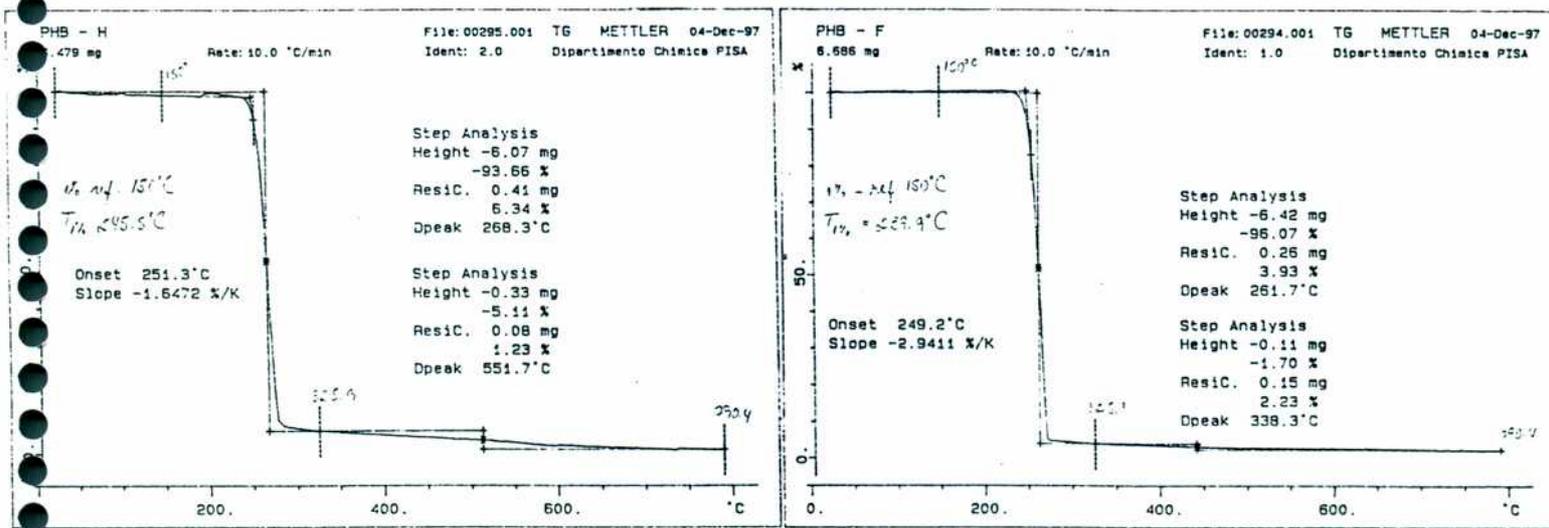
En los análisis por termogravimetría (TGA) se registró la pérdida porcentual de masa de dos muestras de PHB en función de la temperatura creciente aplicada, con el fin de evaluar la estabilidad térmica del bioplástico. Se utiliza una balanza muy sensible para seguir la variación de peso de un polímero en función del tiempo y de la temperatura (Materiales y Métodos). Como se efectuaron bajo atmósfera de nitrógeno, el análisis equivalió a una pirólisis (Morikawa y Marchessault 1981).

Se determinó la temperatura de descomposición,  $T_d$  (como aquella en la cual se registra el mayor porcentaje de pérdida de masa) de muestras de PHB obtenidas de células crecidas en medio Bm con glucosa 1% a diferentes relaciones C/N, en condiciones de fijación de nitrógeno y con melaza como fuente de carbono, a 0.5 vvm; de una muestra de PHB obtenida a una alta tasa de aireación y de una muestra de PHBV obtenida de *Rhizobium meliloti*.

La  $T_d$  disminuyó cuando la relación C/N fue reducida. Con C/N 7.3 hasta 245°C solamente se había perdido el 1% de la masa inicial y a 268°C el 94% de la misma. Cuando se aumentó la relación C/N a 29 el 1% de la masa inicial se perdió a 240°C y el 96% a 261.7°C, es decir 5 y 6.3°C antes que con C/N 7.3. Este efecto se debe a que el  $M_r$  fue menor con C/N 29 que con C/N 7.3 (1.170 y 1.330 kDa, respectivamente) (ver 7.1.9). En condiciones de fijación de nitrógeno (muestra Y) la  $T_d$  fue de 290°C, mientras que el  $M_r$  fue de 1420 kDa. De las dos muestras de PHB obtenidas a alta tasa de aireación sólo se analizó una de ellas (muestra A): se observó que bajos  $M_r$  afectaron la estabilidad térmica (temperatura de inicio de descomposición 250°C,  $M_r$  110 kDa). La muestra P (obtenida a partir de melaza) dió una  $T_d$  de 286°C con igual  $M_r$  que la obtenida de condiciones de fijación ( $T_d$  291°C), lo que indica que la temperatura de descomposición no puede ser aumentada indefinidamente por incremento del peso molecular.

De los resultados obtenidos se dedujo que a medida que el peso molecular aumentó (hasta 1400 kDa) el PHB obtenido tenía una mayor  $T_d$ . Esto se debe a que la presencia de mayor cantidad de interacciones entre cadenas de mayor peso molecular requiere de mayor cantidad de energía para su ruptura, por lo que entonces la temperatura de descomposición será mayor (Scandola et al., 1988). Estos autores, al igual que en el presente trabajo, encontraron que la pérdida de masa en el PHB comienza a ser significativa a partir de 230°C. Se ha sugerido que el mecanismo principal de degradación térmica del PHB es el de ruptura de cadena al azar, resultando en una disminución en el peso molecular (Grassie et al. 1984).

El copolímero PHBV de *R. meliloti* mostró una  $T_d$  (obtenida de un estudio de DSC) de 240°C, sensiblemente menor que las  $T_d$  máximas del PHB producido por la cepa 6B. Esto sugiere que la mayor flexibilidad del copolímero PHBV respecto del homopolímero PHB (Anderson y Dawes 1990, Tombolini y Nuti 1989) se consigue a expensas de una menor estabilidad térmica. En la Figura 79 se muestran los termogramas realizados.



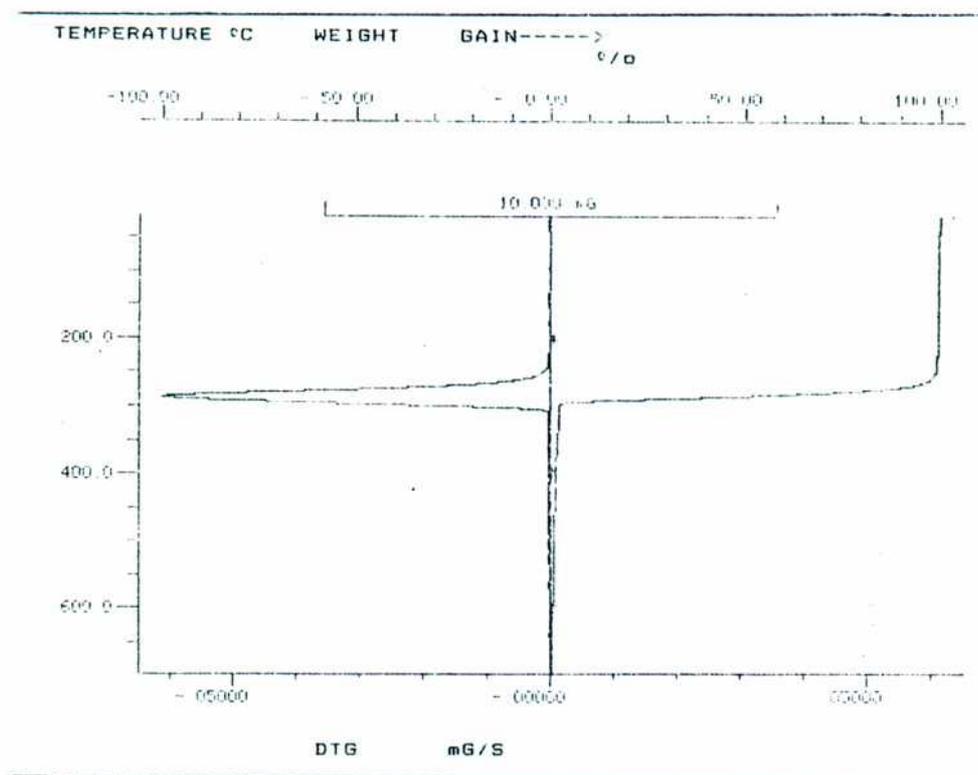


Figura 79: Termogravimetrías de muestras de PHB obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo a una tasa de aireación de 0.5 vvm. a: C/N 7.3. b: C/N 29. c: condiciones de fijación de nitrógeno. d: melaza 5% como fuente de carbono.

Los porcentajes de cristalinidad fueron obtenidos comparando el calor de fusión de las muestras con el del PHB 100% cristalino. Este fue estimado en 146 J/g en base a resultados calorimétricos, de densidad y rayos X (Barham et al. 1984).

Entonces, es posible obtener una estimación numérica para el grado de cristalinidad del PHB, a través del cociente entre el calor de fusión de las muestras de PHB y el de una muestra de PHB 100% cristalina (Scandola et al., 1988):

$$\text{grado de cristalinidad} = (\Delta H_{\text{fus PHB}} / \Delta H_{\text{fus PHB 100\% cristalino}})100$$

A título comparativo, el polietileno de baja densidad (LDPE) tiene una cristalinidad de cerca del 50% (es una estructura lineal con ramificaciones) mientras que el de alta densidad (HDPE) tiene un 90% de cristalinidad (estructura lineal con poca ramificación, más ordenada).

Los porcentajes de cristalinidad estuvieron entre 55 y 70% aproximadamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con muestras de PHB obtenidas de *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum*, con valores de entre 55 y 60% para muestras almacenadas a temperatura ambiente (Scandola et al. 1988). No hubo relación evidente entre el porcentaje de cristalinidad y el peso molecular, las muestras de bajo peso molecular obtenidas tuvieron porcentajes de cristalinidad del mismo orden que aquellas de mayor  $M_r$ .

El PHB tiene un grado de cristalinidad que depende también del grado de copolimerización, cuanto mayor es el porcentaje de hidroxivalerato en el copolímero PHBV menor es la cristalinidad, debido al desorden que involucra la presencia de un monómero de distinto grupo lateral y estructura de cristalización (Barham et al., 1984, Doi 1990).

#### **7.5. Estudio de las propiedades de ablandamiento del PHB: análisis termomecánico (TMA)**

El análisis termomecánico mide la respuesta mecánica de un polímero en función de la temperatura. Consiste en someter la muestra a la percusión de una pequeña barra o punzón a medida que se aumenta la temperatura. Se registra entonces la profundidad a la que penetra la barra, siendo ésta una función de las propiedades de ablandamiento del material (Kroshchwitz 1990).

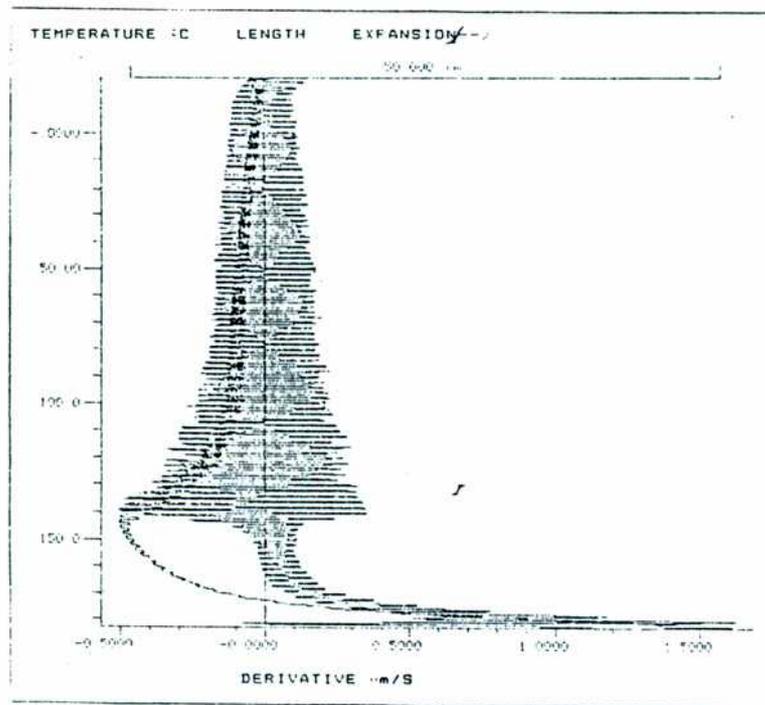


Figura 80: Análisis termomecánico de una muestra de PHB.

Se observó que el PHB se ablandó en forma continua a medida que aumentó la temperatura. Cuando se llegó a 140°C, el PHB no ofreció resistencia al punzón, por lo que la señal se pierde. Esto significó que a esta temperatura el PHB se comporta como un material completamente blando.

## 8. Estudios sobre aplicaciones

### 8.1. Aplicación en salud humana

#### 8.1. PHB como soporte para el crecimiento de células humanas

Se estudió la posibilidad de utilizar láminas de PHB como soporte para el crecimiento de células epiteliales humanas utilizadas como piel artificial para pacientes con quemaduras graves. La regeneración de la piel luego de quemaduras es un problema clínico grave, sobre todo cuando áreas grandes del cuerpo están involucradas, especialmente porque para lograrlo es necesario regenerar también el tejido dermal subyacente. Hasta ahora se ha usado para ello materiales que son constituyentes estructurales de la piel, como por ejemplo el colágeno (Boyce y Hansbrough 1988). Sin

embargo, enzimas como la colagenasa remodelan estos reemplazos, debilitándolo estructuralmente. Polímeros sintéticos biodegradables como copolímeros de óxido de polietileno y polibutilentereftalato (PEO:PBT) han sido utilizados como matrices o sustratos para la regeneración de las células epidérmicas, obteniendo neovascularización y crecimiento epidérmico aceptable luego de 2-4 semanas de implantación (Beumer et al. 1994).

El procedimiento standard consiste en sembrar keratinocitos provenientes del mismo paciente en cajas de Petri o botellas planas con un medio de cultivo apropiado. Las células comienzan a crecer hasta que están tan próximas que su crecimiento se ve inhibido (inhibición por contacto). De esta manera forman una monocapa de células sobre la superficie de la caja de Petri o botella de cultivo. El paso siguiente es el de despegar cuidadosamente estas láminas de células del vidrio para poder ser trasladadas al quirófano, sobre un soporte parafinado que la protege.

El problema que se presenta es el que las monocapas de piel son muy frágiles y tienden a rasgarse al ser despegadas del fondo de los recipientes de cultivo. Es allí donde se consideró probar si un material de origen biológico como el PHB pudiera aplicarse sobre las cajas de Petri para luego sembrar directamente las células sobre la película de PHB y no directamente sobre vidrio. Así al despegar la monocapa de piel se aumentaría su resistencia mecánica y se reduciría el riesgo de rasgaduras de la piel artificial.

Como resultado, se observó que las células crecieron con éxito y se adhirieron al PHB, creciendo hasta formar una monocapa.

Dado que el PHB es biocompatible y resorbible (Anderson y Dawes 1990, Hangii 1995) se abre la posibilidad de aplicar el conjunto de soporte de PHB y células epiteliales en forma directa sobre la quemadura. Este trabajo fue realizado en la Fundación Benaim, que actualmente se encuentra en el Hospital Alemán de Buenos Aires.

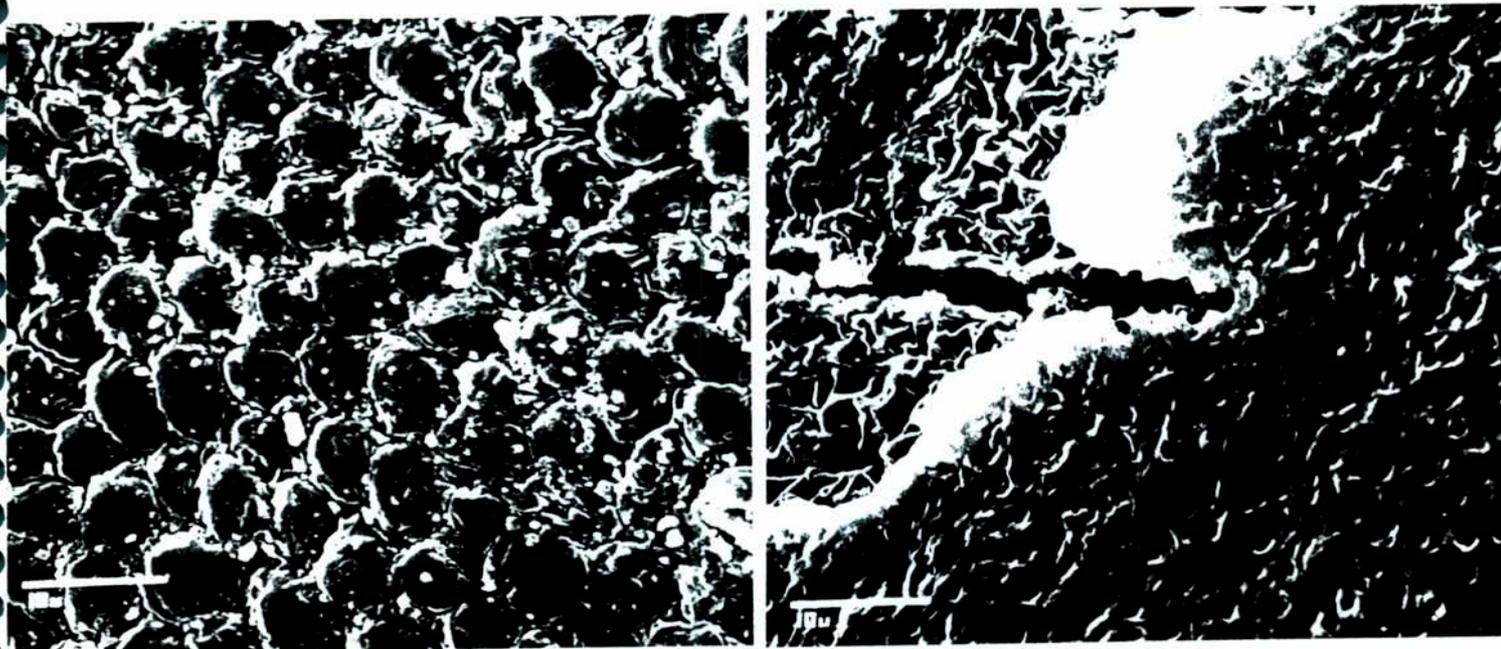
## **8.2. Aplicaciones agrícolas**

### 8.2.1. PHB como película para el peleteado de semillas y bacterias

La práctica del peleteado de semillas ocluyendo bacterias es común en el área agrícola, ya que protege a las semillas de condiciones adversas y aumenta su germinabilidad (Jansen et al. 1994). Semillas de alfalfa son comercializadas (Pioneer USA) con un peleteado que ocluye bacterias (*R. meliloti*) más una fuente de carbono metabolizable en la germinación y carbonato de calcio regulador del pH, para evitar falsos arranques o germinaciones defasadas de las semillas. La semilla debe ser cubierta uniformemente, y resistir moderadas presiones y roturas. El peleteado es usado como medio apto para asegurar una mejor y más temprana nodulación bajo condiciones que pueden ser desfavorables a la germinación de la semilla y multiplicación y sobrevivencia de los rizobios (Vincent 1975).

Se estudió si era posible aumentar el rendimiento en la siembra de plantas de alfalfa, utilizada ampliamente como pastura para el ganado, cuyas semillas habían sido peleteadas con PHB en un caso y también inoculadas con el simbionte *Rhizobium meliloti* y luego peleteadas con PHB en segundo lugar.

Luego de aplicar la técnica de peleteado a las semillas, se verificó que el PHB forma una película protectora alrededor de la semilla (ver Figura 81). Como el PHB es metabolizable por bacterias del género *Rhizobium* como fuente de carbono y energía (Wong y Evans 1970) para el momento de la germinación, cuando la bacteria debe infectar las raíces de la planta, es esperable encontrar un efecto positivo sobre el proceso de implantación y rendimiento de la pastura. Para ello se efectuaron ensayos de laboratorio en tubos de ensayo y luego en pequeñas macetas en invernadero.



A

B

Figura 81: Microfotografía electrónica (1900X) de A) semilla de alfalfa control, B) semilla de alfalfa peleteada con un extracto de PHB (concentración 6 g/l).

#### 8.2.1.1. Siembra de semillas de alfalfa en tubos con medio mineral de Crone

En primer lugar, se sembraron semillas de alfalfa en tubos de ensayo de 19 mm de ancho y 20 cm de largo, con medio mineral de Crone agarizado. Luego se incubaron los tubos durante 15 días a 30°C.

De la observación de la altura de las plantas en cada tratamiento pudo verse que habría un efecto positivo del peleteado con PHB, por lo que se continuaron los ensayos.

#### 8.2.1.2. Siembras de semillas de alfalfa sin tratar y peleteadas con PHB

Luego de peletear las semillas con una película de PHB (ver Materiales y Métodos) se sembraron las mismas en cajas plásticas transparentes con una base de algodón humedecido en agua destilada para crear una condición de cámara húmeda. Las primeras 12 h se incubó a una temperatura de 20°C en oscuridad, luego se incubó con luz diurna en iguales condiciones.

Se obtuvieron los siguientes resultados respecto de la germinación de las semillas peleteadas y sin peletear cuando se determinó en el tiempo el porcentaje de germinación:

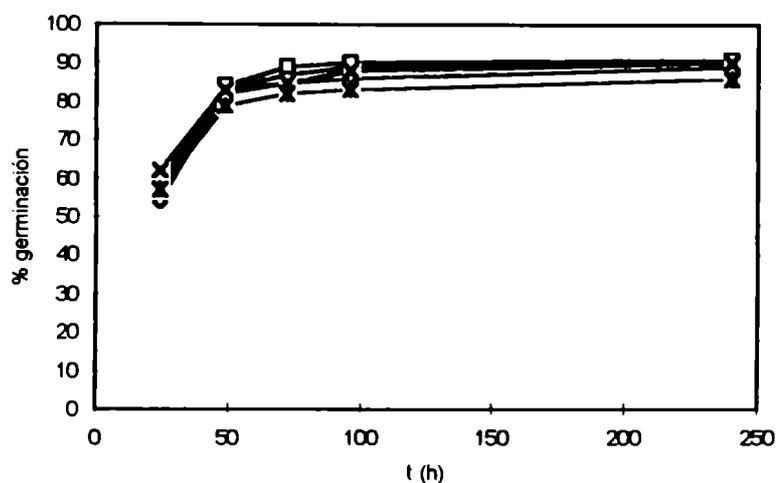


Figura 83: Porcentaje de germinación de semillas de alfalfa control y peleteadas con PHB en función del tiempo en cámaras húmedas incubadas a 30°C. □ : testigo 1, ◇ : testigo 2, Δ : tratada 1, \* : tratada 2.

Tratamiento PHB 1: semilla peleteada con una solución clorofórmica de 2 g/l de PHB. Tratamiento PHB 2: con 6 g/l de PHB.

De la Figura 83 se desprende que no hay diferencia entre los porcentajes de germinación entre las semillas control y las peleteadas con una película de PHB.

En una segunda siembra, la energía de germinación no disminuyó en las semillas peleteadas con PHB (2g/l) luego de 4 meses de haberlas almacenadas (International Rules for Seed Testing Rules 1996).

### 8.2.1.3. Peso total, aéreo y de raíz de plantas de alfalfa provenientes de semillas control y peleteadas con PHB

Se sembraron las semillas en las condiciones indicadas anteriormente, obteniéndose los siguientes resultados:

tratamiento	germinadas/sembradas	germinación (%)
Testigo 1	23/25	92
Testigo 2	20/23	87
PHB 1	24/25	96
PHB 2	23/25	92

Tratamiento PHB 1: peleteada con una solución clorofórmica de 3 g/l de PHB. Tratamiento PHB 2: con 6 g/l de PHB.

Tabla N° 37: Porcentaje de germinación de semillas de alfalfa control y peleteadas con dos extractos con diferente concentración de PHB en cámaras húmedas incubadas a 30°C durante 5 días.

Una vez germinadas, las semillas se transplantaron a pequeñas macetas plásticas con un sustrato inerte de vermiculita y se colocaron en un sector aislado de un invernadero cenital (Laboratorio de Semillas, Facultad de Agronomía, UBA). Se regó diariamente alternando medio de Crone líquido y agua corriente.

A los 30 días las plántulas son descalzadas y se llevaron al Laboratorio para medir peso de la raíz, peso de la parte aérea y peso total de cada plántula para cada tratamiento. Se pesó a la décima de gramo.

Tratamientos	Peso total (mg)	Peso aéreo (mg)	Peso raíz (mg)
testigo 1	17.1	10.1	7
testigo 2	15.4	8.0	7.4
PHB 1	14.4	8.1	6.3
PHB 2	16.2	7.6	4.8

Tratamiento PHB 1: peleteada con una solución clorofórmica de 3 g/l de PHB. Tratamiento PHB 2: con 6 g/l de PHB.

Tabla N° 38: Peso aéreo, de raíz y total de plantas de alfalfa provenientes de semillas control y de semillas peleteadas con PHB incubadas en macetas plásticas con vermiculita en invernadero.

Se efectuaron otras 3 repeticiones del experimento anterior, en condiciones similares, con 7 plantas por tratamiento. Al analizar los datos estadísticamente (software Statistica) se obtuvo que no hubo diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95% entre los dos tratamientos (tratamiento PHB 1 vs. testigo 1 y tratamiento PHB 2 vs. testigo 2) en las variables medidas.

#### **8.2.1.4. Siembras de semillas de alfalfa sin tratar e inoculadas con *Rhizobium meliloti* y peleteadas con PHB**

En segundo lugar, se ensayó que diferencias existían en el peso de las plantas cuando la bacteria fijadora de nitrógeno *R. meliloti* fue inoculada en la semilla y luego peleteada con PHB, con el fin de mejorar el proceso de inoculación e implantamiento de las pasturas a campo.

En la siguiente Tabla se muestran los porcentajes de germinación de semillas de alfalfa control y de semillas inoculadas con *R. meliloti* y peleteadas con PHB.

Tratamiento	sembradas/ germinadas	% germinación
testigo	41/43	95
	40/43	93
	44/48	92
promedio		93.2
inoculada y peleteada	47/50	94
	44/47	93.6
	47/50	94
promedio		93.9

Tabla N° 39: Porcentaje de germinación de semillas de alfalfa control si ntratar e inoculadas con *Rhizobium meliloti* y peleteadas con PHB.

Luego de 38 días de incubación en las mismas condiciones que antes, se procedió a descalzar las plantas y determinar la altura y el peso de raíz, aéreo y total de las mismas. En este caso se contó además el número de nódulos que las bacterias producen en la raíz de la alfalfa.

tratamientos	altura (cm)	nódulos	peso total (mg)	peso aéreo (mg)	peso raíz (mg)
testigo	5.9	0	32.2	17.3	14.9
peleteada	13.7	9	93.4	60	23.4

semilla peleteada utilizando una solución clorofórmica de 6 g/l de PHB

Tabla N° 40: Altura, n° de nódulos, peso aéreo, de raíz y peso total de plantas de alfalfa provenientes de semillas sin tratar (control) y de semillas inoculadas con *R. meliloti* y peleteadas con PHB. Testigo promedio de 8 medidas, peleteada: promedio de 12 medidas.

En este caso fue notoria la diferencia en las variables medidas entre los dos tratamientos, debido a que las plantas de semillas inoculadas y peleteadas presentaron nódulos activos. Los rizobios sobrevivieron eficazmente al proceso de peleteado de las semillas.

La altura promedio de las plantas provenientes de semillas inoculadas y peleteadas fue de 13.6 cm respecto de 6.0 cm para el testigo. El peso total promedio de las inoculadas y peleteadas fue de 93.4 mg, mientras que el del control fue de 30.3 mg.

### **8.2.2. PHB como película para la oclusión de enzimas**

La adición de celulosa en ensilados de forrajes a campo mejora notablemente su preservación, dado que provee de hidratos de carbono solubles a las bacterias ácido-lácticas que conservan el silo, por medio de la producción de ácido láctico. Sin embargo, cuando se incorporan enzimas al silo, deben tenerse en cuenta las condiciones del medio, que pueden afectar la actividad enzimática, como así también la presencia de proteasas, que se liberan de las células vegetales durante el picado del forraje.

En la mayoría de los casos se debe recurrir a algún modo de protección de la enzima, como lo es el microencapsulado de la misma en una matriz polimérica protectora. En general, la estabilización de las enzimas solubles se lleva a cabo por inmovilización en diferentes matrices (orgánicas o inorgánicas), ya sea por mecanismos de adsorción o bien por medio de uniones covalentes (por ejemplo, en el caso de la inmovilización con glutaraldehído, donde las proteínas se unen químicamente al glutaraldehído formando bases de Schiff). En el caso de la microencapsulación, las enzimas están físicamente rodeadas en geles, microcápsulas o polímeros, con poros suficientemente pequeños para que las moléculas de la enzima no sean arrastradas, pero lo suficientemente grandes para permitir la difusión libre de sustratos y productos de bajo peso molecular a través de la barrera. Entre los polímeros utilizados para el encapsulado de enzimas se encuentran la poliacrilamida, el polivinilalcohol, el almidón y polímeros derivados de la celulosa (Crueger y Crueger 1989).

El microencapsulado de la enzima con PHB se propone como método nuevo y ventajoso dado que este poliéster biodegradable resulta inocuo para el ganado.

### 8.2.2.1. Actividad de la enzima celulasa y proteína retenida a diferentes cargas de enzima en PHB

Se utilizaron tres muestras de PHB de diferentes peso molecular relativo, obtenidas de *Azotobacter chroococcum* 6B. En un primer ensayo se utilizaron diferentes cargas de enzima en PHB (8, 12 y 16 % p/p) para microencapsular la celulasa. Se determinó en cada caso el porcentaje de proteína retenida por el polímero y la actividad de la enzima microencapsulada que quedó retenida (Figuras 84 y 85, respectivamente ).

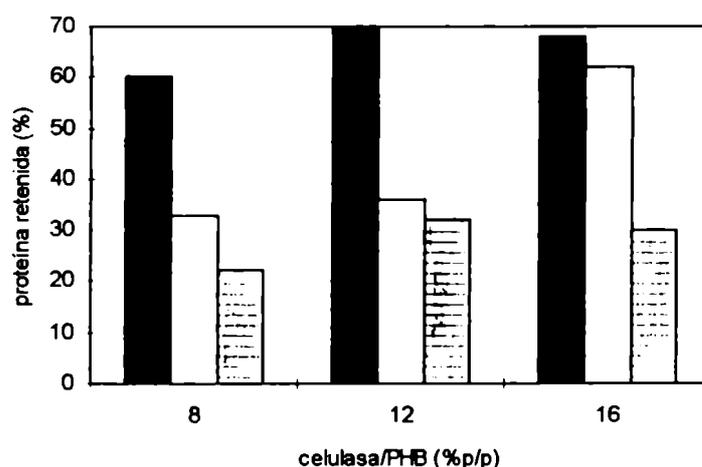


Figura 84: Proteína retenida (% respecto del control) para diferente carga de celulasa en PHB. De izquierda a derecha: PHB de  $M_r$  1020, 335 y 1350 kDa.

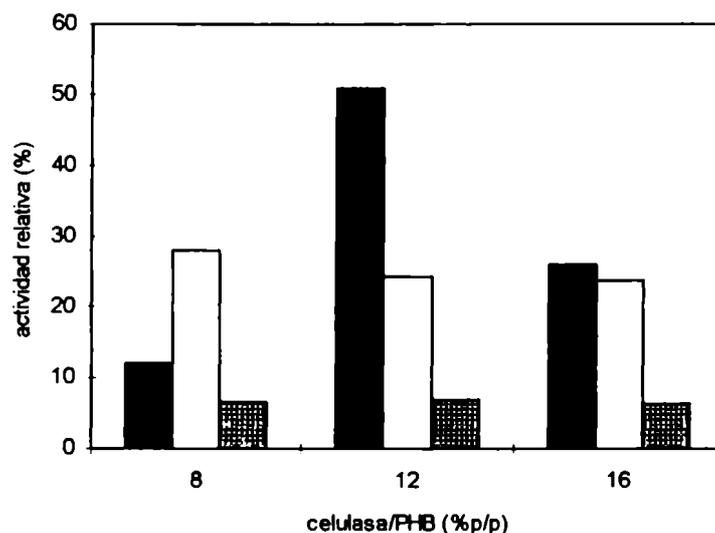


Figura 85: Actividad de celulasa relativa al control (sin microencapsular) para distinta carga de celulasa en PHB. De izquierda a derecha: PHB de  $M_r$  1020, 335 y 1350 kDa.

La mayor retención de proteína (70%) y de actividad (50%) se obtuvo con el PHB de  $M_r$  1020 kDa (PHB 1) al 12% de concentración. Para el polímero de 335 kDa (PHB 2) se obtuvo un 62% de retención cuando se lo utilizó a concentración del 16%. No existió correlación evidente entre el peso molecular y el porcentaje de proteína retenida o la actividad. Sin embargo, si pudo observarse que las muestras con  $M_r$  de 1350 kDa dieron baja retención y actividad en las tres proporciones ensayadas de celulasa en PHB, por lo que pesos moleculares mayores a alrededor de 1000 kDa no serían adecuados para el microencapsulado en las condiciones experimentadas.

La actividad de la enzima retenida se muestra en la Figura 84. Para PHB 1 al 12%, se obtuvo el 51% de actividad respecto a un control (celulasa sin microencapsular). Para el resto de las muestras la actividad obtenida fue inferior al 30% del control.

#### 8.2.2.2. Decaimiento en el tiempo de la actividad de la celulasa microencapsulada

Se determinó la actividad de la enzima microencapsulada en el PHB 1 al 12% y en PHB 2 al 16%, luego de transcurridos diferentes tiempos desde el microencapsulado, con el

fin de evaluar la estabilidad del sistema enzima/polímero teniendo en cuenta su posible aplicabilidad como producto aditivo de ensilados.

La actividad para cada día se comparó con la de una muestra de celulasa no encapsulada. Todas las muestras se mantuvieron en solución buffer a pH 7, desde el día 0 hasta el momento de evaluar su actividad por la técnica convencional ( ver Materiales y Métodos).

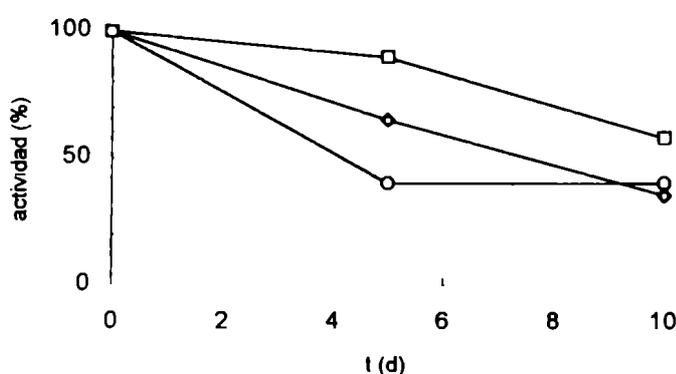


Figura 86: Actividad de la enzima celulasa microencapsulada en PHB relativa al control en función del tiempo. □ : PHB 1, ○ : PHB 2, ◇ : control.

La celulasa control (sin microencapsular), presentó un decaimiento lineal de la actividad a lo largo de los días, observándose en el décimo día, el 38% de su actividad inicial. La celulasa encapsulada en PHB 1 al 12% mantuvo el 90% de su actividad inicial hasta los 5 días luego de microencapsulada. A los 10 días este valor decayó al 60%. Para la celulasa microencapsulada en PHB 2 al 16 %, el decaimiento se produjo más abruptamente que para el control, alcanzando el valor mínimo de actividad a los 5 días (Figura 86). Se observó que la celulasa microencapsulada en PHB 1 mantuvo su actividad por más tiempo que la enzima control, lo cual es muy importante dado que la actividad de la celulasa dentro del silo no se requiere inmediatamente sino luego de algunos días de iniciada la fermentación.

Como conclusión, los experimentos realizados permitieron poner a punto la técnica para el microencapsulado de la celulasa en PHB, habiéndose obtenido los resultados más

favorables al utilizar concentraciones del 8% p/p de la enzima en PHB Y; con un tiempo óptimo de contacto de 10 minutos entre la celulasa y la suspensión del polímero en cloroformo. Bajo estas condiciones se obtuvo un 70% de proteína retenida, cuya actividad fue del 51% respecto de la enzima control sin microencapsular.

Comparando los resultados obtenidos con las tres muestras de PHB se verificó que no existió correlación entre el peso molecular del polímero PHB y la capacidad de retención de proteína. Sin embargo, de acuerdo a las Figuras 84 y 85, al utilizar PHB de peso molecular relativo mayor a 1020 kDa, se obtuvieron bajas retenciones de proteína y también reducida actividad enzimática.

## CONCLUSIONES

---

De las tres cepas seleccionadas en el screening inicial se eligió una de ellas (llamada 6B) en base a sus contenidos de PHB en células crecidas en erlenmeyers agitados en medio de Burk para fijadores de nitrógeno.

Al optimizar el medio de Burk se observó que las concentraciones de calcio y magnesio podía ser aumentadas para incrementar la biomasa y el contenido de PHB. La aireación óptima en erlenmeyers agitados se encontró a una relación 1:10 entre el volumen del medio y el del recipiente, en concordancia con que *Azotobacter* es un genero aeróbico con una alta tasa de consumo de oxígeno (Aiba et al, 1967).

De todas las condiciones de cultivo ensayadas en fermentador concluimos que para la obtención de una alta biomasa bacteriana con alto contenido de PHB son necesarias bajas tasas de aireación y una alta relación carbono/nitrógeno de los cultivos en fermentador. En las condiciones experimentales ensayadas con la cepa 6B, una aireación de 0.5 vvm y una relación C/N 69 probaron ser las condiciones de cultivo más eficaces. El agregado adicional de una fuente de carbono simple o compleja durante el curso de la fermentación contribuyó a aumentar el contenido celular de PHB, simultáneamente con la imposición al sistema de una condición metabólica que favorezca la biosíntesis de PHB. En nuestros experimentos esa condición metabólica se creó en fase estacionaria por medio de la limitación de oxígeno producida al burbujear N<sub>2</sub> gaseoso, teniendo en cuenta que la acumulación de PHB se induce con muy bajas tensiones de oxígeno disuelto, tendientes a cero (Carter y Dawes, 1979).

Respecto de los experimentos de coproducción de PHB y EPS pudo concluirse que la sacarosa fue la fuente de carbono más adecuada de las experimentadas para la obtención de PHB con *A. chroococcum* 6B, considerando que la velocidad de crecimiento fue la máxima obtenida en esas condiciones experimentales y que el contenido de PHB fue alto (0.4 g PHB/g peso seco a 48 h), junto con una fracción de PHB cercana a 1 durante 72 h de cultivo.

Cuando se evaluaron los rendimientos de biomasa y de PHB a partir de la glucosa consumida ( $Y_{x/\text{glu}}$ ,  $Y_{\text{PHB}/\text{glu}}$ ) se observó que también una aireación de 0.5 vvm y una la relación C/N de 69 fueron las condiciones más favorables para la bioconversión. Tasas de aireación más elevadas fueron favorables para la obtención de mayor biomasa en menor tiempo de cultivo, dado que *Azotobacter* sp. es un genero aerobio estricto con una alta tasa metabólica.

Dado que es conocido que la deficiencia de nitrógeno induce la bioacumulación, es posible pensar que un microorganismo fijador de nitrógeno como *Azotobacter chroococcum* 6B, que no requiere la presencia de una fuente de nitrógeno combinado en la formulación de su medio de cultivo, crezca acumulando grandes cantidades de PHB. Sin embargo, cultivos crecidos de la cepa 6B en condiciones de fijación de nitrógeno dieron como resultado biomazas reducidas con poco o ningún contenido de PHB. Cuando se agregó nitrógeno combinado como amonio al medio Bm bajo cultivo en fermentador a una tasa de aireación de 0.5 vvm, la biomasa y el contenido de PHB aumentaron considerablemente. Esto probó que la fijación de nitrógeno y la acumulación paralela de PHB representaron para la bacteria un gasto energético elevado, y que el agregado de amonio exime al microorganismo de disponer de una alta cantidad de poder reductor para la fijación de nitrógeno.

Al aplicar el modelo de Yamane (1992) para la obtención del rendimiento teórico de PHB obtenido a partir de la glucosa consumida ( $Y^{\text{teo}}_{\text{PHB}/\text{glu}}$ ) del rendimiento real obtenido ( $Y^{\text{ov}}_{\text{PHB}/\text{glu}}$ ) y del contenido de PHB a cultivos en fermentador efectuados a distintas relaciones C/N a 0.5 vvm se verificó que los resultados se ajustaron razonablemente al modelo. También aquí el mayor  $Y^{\text{ov}}_{\text{PHB}/\text{glu}}$  obtenido fue a C/N 69 (0.31 g PHB/g de glucosa consumida). Estos resultados son paralelos a los obtenidos para el rendimiento de células por gramo de glucosa utilizada para la producción de energía ( $Y_E$ ) a esa relación C/N, calculada por el método de Stouthamer y Bettenhausen (1973).

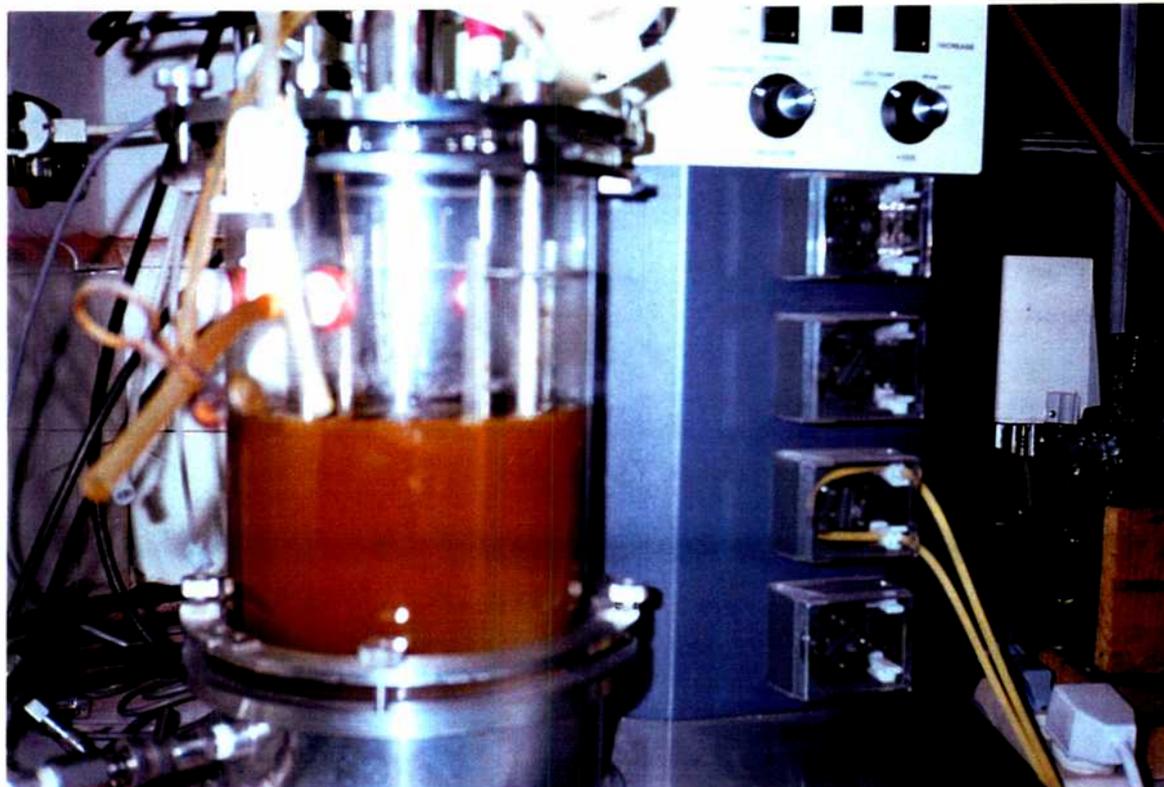
Los resultados obtenidos para las velocidades de transferencia de oxígeno en fermentador deben solamente tomarse como guía para el cultivo en mayor escala,

La máxima productividad (0.11 g/l.h) alcanzada se alcanzó con la condición fermentación optimizada (0.5 vvm, C/N 69, fed-batch de glucosa en fase estacionaria en anaerobiosis).

De las fuentes de carbono complejas ensayadas sólo la melaza de caña de azúcar demostró ser capaz de sustentar un crecimiento aceptable de *A. chroococcum* 6B, a pesar de ello en cultivos en fermentador el  $X_{PHB}$  no superó 15% del peso seco bacteriano. ucosa como fuente de carbono. Asimismo, la productividad máxima alcanzada en medio Bm con melaza (al 5% p/v) fue considerablemente menor que con glucosa. Al ensayar un sistema semi-continuo de alimentación con melaza en fase estacionaria sobre células crecidas con glucosa en las condiciones optimizadas se observó que se podía mantener constante la productividad de PHB.

Respecto de las propiedades físicas del PHB obtenido en cada caso, el parámetro más importante evaluado fue el peso molecular. Valores máximos de 2250 y 2930 kDa fueron obtenidos, que se encuentran dentro de los más altos reportados para el PHB obtenible del género *Azotobacter*. El peso molecular varió considerablemente con las distintas condiciones de fermentación como el pH, la temperatura, fuente de carbono y tasa de aireación. Las mayores temperatura de descomposición obtenidas para las distintas muestras de PHB se asociaron a los pesos moleculares más altos. El PHB obtenido demostró ser biodegradable, de cristalinidad media, altamente transparente, resistente a solventes y con aceptable resistencia mecánica a la tracción, que pudo ser modificada en un amplio rango; lo que extiende el espectro de aplicaciones del PHB obtenido a varios usos (recubrimiento, películas, embalajes, envases y moldeados; como así también en los casos de las aplicaciones desarrolladas en medicina y en agricultura).

## APENDICE

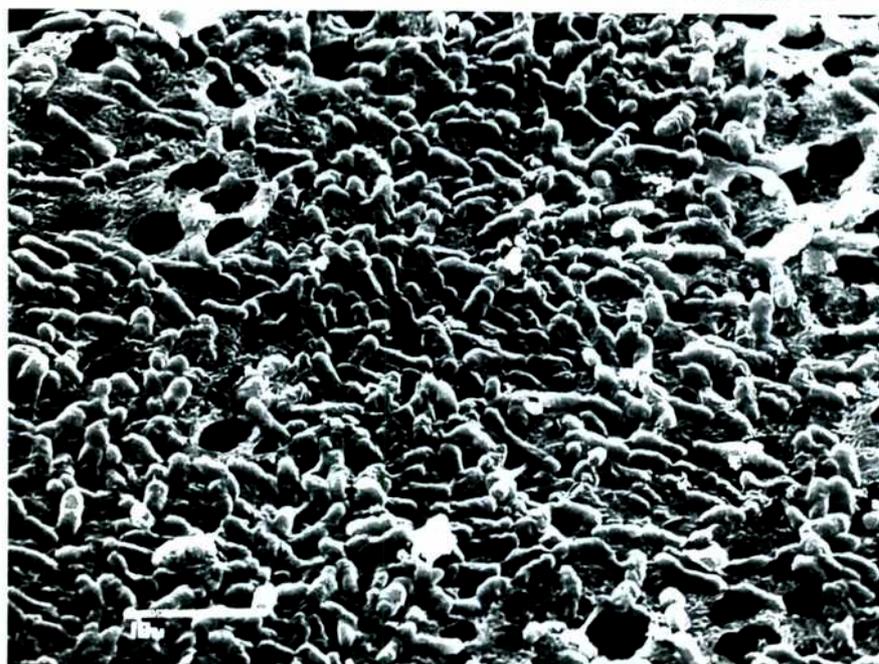


**Fermentador de laboratorio de 6 litros de capacidad total**

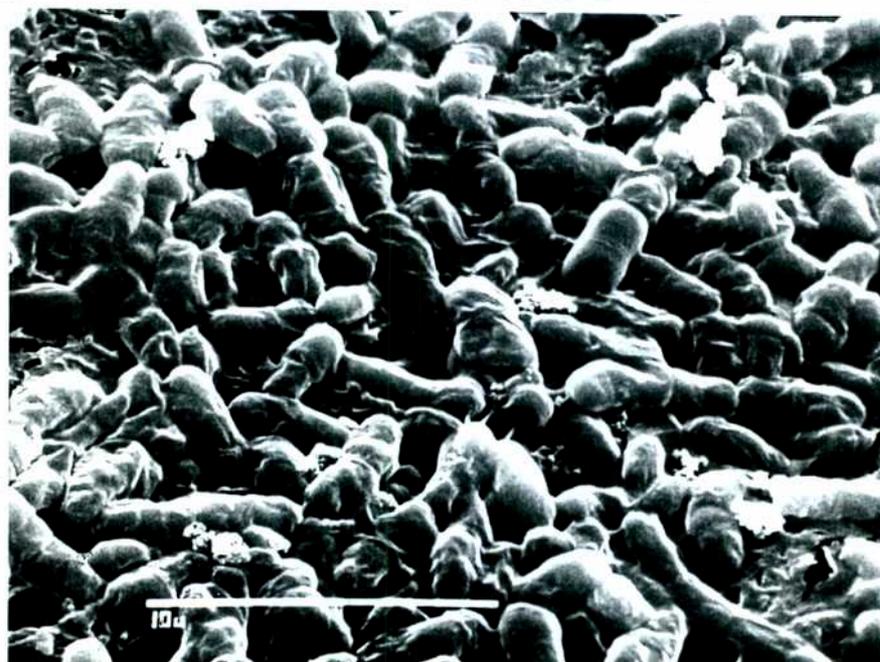


**Cromatógrafo gaseoso**

Microfotografía electrónica de la cepa 6B sobre un soporte de papel de filtro



A: 1900x



B: 4500x

## VI. BIBLIOGRAFIA

---

- Abbate M., Martuscelli E., Ragosta G. y Scarinzi G. 1991. Tensile properties and impact behaviour of poly(D(-)3-hydroxybutyrate)/rubber blends. *J. Mater. Sci.* 26: 1119-1125.
- Aiba, Nagai y Nishizawa. 1967. Dynamic behavior of microorganisms. Some experiments in batch and continuous culture of *Azotobacter i.* *Fermentacion e Ingenieria (Hak-ko)*, Vol 5: 452-460.
- Akhtar S., Pouton C. y Notarianni L. 1992. Crystallization behaviour and drug release from bacterial polyhydroxyalkanoates. *Polymer* 33: 117-126.
- Akita S., Einaga Y., Miyaki Y. y Fujita H. 1976. Solution properties of Poly(D- $\beta$ -hydroxybutyrate). Biosynthesis and characterization. *Macromolecules* 9,5:774-780.
- Akiyama M, Taima Y. y Doi Y. 1992. Production of PHA by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. *Appl. Microb. Biotechnol.* 37: 698-701.
- Alderete J.E., D.W. Karl y C-H. Park. 1993. Production of Poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a fed-batch culture. *Biotechnol Prog.* 9: 520-525.
- Allen O. 1959. *Methods on experimental soil bacteriology*. Minneapolis, USA.
- Amos Dale A y Mc Imerney M. 1989. PHA in *Syntrophomonas wolfei*. *Arch. Microbiol.* 152 172-177.
- Andersen P.R. 1989. Control of PHB molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. M. Sc. Thesis. University of Reading and The Technical University of Denmark.
- Anderson A., Dawes E., Haywood G. y Byrom D. (April 1990) European patent 90304267.9.
- Anderson A., Dawes E., Haywood G. y Byrom D. (April 1990) European patent 90304267.9.
- Anderson A.J. y Dawes E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 54,4: 450-472.
- Anderson, A. J., Haywood G. y Dawes E.A. 1990. The biosynthesis and composition of bacterial poly (hydroxyalkanoates). *Int. J. Biol. Macromol.* 12:102-105.

- Aragao G., Lindley N., Uribelarrea J. y Pareilleux A. 1994. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 18, 8: 937-942.
- Asenjo J. y Suk J. 1985. Kinetics and models for the bioconversion of methane into a intracellular polymer, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB). *Biotechnol. and Bioeng. Symposium N°15* 225-234.
- Asenjo J.A. y Suk J. 1986. Microbial conversion of methane into PHB growth and intracellular product accumulation in a type II Methanotroph. *J.Ferm. Technol.*, 64, 271-178.
- Asenjo J., Schmidt A., Andersen P. y Andrews B. 1995. Effect of single nutrient limitation on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering* 46:5 497-502.
- Barham P. 1984. Nucleation behaviour of poly-3-hydroxybutyrate. *J. Mater. Sci.* 19, 3826-3834.
- Barnard G.N. y Sanders J. 1989. The PHB granule in vivo. *The J.Biol.Chem.*, 164: 3286-3291.
- Beijerinck M. 1901. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II* 7, 561-582.
- Bergen R. 1968. Rubber-reinforced plastics: graft polymers versus polymer blends. *Appl. Polym. Symposia* 7: 47-51.
- Berger, E., Ramsay B., Ramsay J. y Chavarie C. 1989. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol. Tech.* 3:227-232.
- Bertrand J.L., Ramsay B., Ramsay J. y Chavarie C. 1990. Biosynthesis of PHA from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. *Appl. Environ.Microbiol.* 56,3133-3138.
- Beumer G., Van Blitterswijk C. y Ponec M. 1994. Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an in vivo evaluation. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 545-552.
- Bleakley B., Gaskins M., Hubbell D. y Zam S. 1988. Floc formation by *Azospirillum lipoferum* grown on Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microb.* 54:2986-2995.
- Bormann E., Leißner M. y Beer B. 1998. Growth associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates. *Appl. Microb. Biotechnol.* 49: 84-88.

- Bourque D., Pomerleau Y. y Groleau D. 1995. High-cell-density production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44: 367-376.
- Boyce S. y Hansbrough J. 1988. Biological attachment, growth and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6-sulfate substrate. *Surgery*, 103: 421-431.
- Bradel R. y Reichert K. 1993. Modelling of molar mass distribution of poly(D-(-)-3-hydroxybutyrate) during bacterial synthesis. *Makromol. Chem.* 194: 1983-1990.
- Brandl H., Bachofen R., Mayer J. y Wintermantel E. 1995. Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Can. J. Microb.* 41,1: 143-153.
- Brandl, H., Gross R., Lenz R., Llyod R. y Clinton Fuller R. 1991. The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 155:337-340.
- Brandl, H., E. J. Knee, R. C. Fuller, R. A. Gross y R. W. Lenz. 1989. Ability of phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int. J. Biol. Macromol.* 11:49-55.
- Brandl H., Gross R., Lenz R. y Clinton Fuller R. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1977-1982.
- Brandrup J. e Immergut E.H. 1989. *Polymer Handbook*. Third Edition. John Wiley & Sons, USA.
- Braunegg G., Lefebvre G., Renner G., Zeiser A., Haage G. y Loidl-Lanthaler K. 1995. Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. *Can. J. Microb.* 41,1: 239-248.
- Braunegg G., Sonnleitner B. y Lafferty R. 1978. A rapid gas chromatographic method of the determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6:29-37.
- Breuer U., Ackermann J. y Babel W. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and overproduction of exopolysaccharides in a mutant of a methylotrophic bacterium. *Can. J. Microb.* 41,1: 55-59.
- Budwill, K., Feodorak P. y Page, W. 1992. Methanogenic degradation of Poly(3-hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microb.* 58:1398-1401.

- Byrom D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. *Trends Biotechnol*, 5: 246-250.
- Byrom D. 1992. Production of PHB:PHV copolymers. *FEMS Microb. Lett.* 103, 247-250.
- Carter, I y Dawes E. 1979. Effect of oxygen concentration and growth rate on glucose metabolism, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and respiration of *Azotobacter*. *J. Gen. Microbiol.*, 110: 393-400.
- Catalogue of Cultures ATCC (American Type Culture Collection. Culture media. Washington 1994.
- Ceccorulli, G. M. Pizzoli y M. Scandola. 1992. Plasticization of bacterial PHB. *Macromolecules*, 25, 3304-3306.
- Chen W., Chen J., Chang S. y Su C. 1985. Bacterial alginate produced by a mutant of *A. vinelandii*. *Appl. Environ. Microb.* 49, 543-546.
- Chen G., Konig K. y Lafferty R. 1992. Effects of medium conditions on molecular weights of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate (PHB-co-HV) produced by strains of *Alcaligenes latus*. *FEMS Microb. Rev.* 103: 408-409.
- Cohen G. y Johnstone D. 1964. Extracellular polysaccharides of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 88,2: 329-338.
- Crueger W. y Crueger A. 1989. *Biotechnology: Manual de Microbiología Industrial*. Editorial Acribia SA. Zaragoza, España.
- Daniel M., Choi J., Kim J. y Lebeault J. 1992a. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of PHB by methylotrophic bacterium *Pseudomonas* 135. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 702-706.
- Daniel M., Barbatian J., Kim J. y Lebeault J. 1992b. Partial purification and characterization of B-hydroxybutyric acid dehydrogenase of a methylotrophic bacteria *Pseudomonas* 135. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 707-713.
- Dawes E.A. y Senior P. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10:135-266.
- Delafield, Doudoroff, M., Palleroni N.J., Lusty C. and Contopoulos R. 1965. Decomposition of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 90:1455-1465.

- De Koning G. y Lemstra P. 1992. The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] in vivo. *Polymer* 33, 3292-3294.
- De Koning G. y Lemstra P. 1993. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer* 34, 4089-4094.
- De Koning G. 1995. Physical properties of bacterial poly(R-3-hydroxyalkanoates). *Can. J. Microb.* 41,1: 303-309.
- Dennis D. y Slater S. 1994. U.S. Patent 05, 371, 002.
- De Waard P., Van der Val H., Huijberts G. y Eggink G. 1993. Heteronuclear NMR analysis of unsaturated fatty acids in poly(3-hydroxyalkanoates): study of  $\beta$ -oxidation in *P. putida*. *J. Biol. Chem.* 268: 315-319.
- Doi Y. e Iwata K., 1998. Biodegradation of Biosynthetic and Chemoshyntetic polymers. Simposio Internacional de Polihidroxiálcanoatos, Göttingen, Alemania.
- Doi Y., Kawaguchi Y., Koyama N., Nakamura S., Hiramitsu M., Yoshida Y. y Kimura H. 1992. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microb. Rev.* 103, 103-108.
- Doi Y. 1990. "Microbial polyesters", VCH Publishers, New York.
- Doi Y, Y. Kanesawa, Y. Kawaguchi and M. Kunioka. 1989. Nuclear magnetic resonance studies of PHB and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2932-2938.
- Doi Y., Tamaki M., Kunioka M. y Soga K. 1987. Biosynthesis of an unusual copolyester (10% mol 3-hydroxybutyrate and 90% mol 3-hydroxyvalerate units) in *Alcaligenes eutrophus* from pentanoic acid *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1635-1636.
- Domb A. 1993. "Degradable polymer blends. I. Screening of miscible polymers". *Journal Polym. Sci.: Part A: Polymer Chemistry*, Vol.31: 1973-1981.
- Domb A., Amselem S., Shah J. y Maniar M. 1992. Degradable polymers for site-specific drug delivery. *Polymers for Advanced Technologies*, 3: 279-292.
- Doudoroff M. y Stanier R. 1959. Role of Poly- $\beta$ -hidroxibutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature*, 183: 1440-1442.
- Dunlop W. y Robards A.W. 1973. Ultrastructural study of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 114:1271-1280.

- Dzene A. 1998. Biodegradability of PHB and its modified systems in soils. Abstracts of the International Symposium of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers, Münster, Alemania, Junio 3-6, 1998
- Eggink G., De Waard P y Huijberts G. 1995. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Can. J. Microb.* 41, 1: 14-21.
- Eggink G., De Waard P. y Huijberb G. 1992. The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for PHA formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 159-164.
- Emeruwa A.C. y Hawirko R. 1973. PHB during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.*, 116: 989-993.
- Fernández Castillo, R., F. Rodríguez Valera, J. González Ramos, y Ruiz Berraquero. 1986. Accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 214-216.
- Food and Agricultural Organization (FAO) 1978. Boletín de servicios agrícolas sobre residuos agroindustriales. Roma.
- Findlay, R. H. y White D. 1983. Polymeric beta-hidroxialkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Env. Microbiol.*, 45: 71-78.
- Fritzsche, K., Lenz R., y Clinton Fuller R. 1990a. An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group. *Makromol. Chem.* 191:1957-1965.
- Fritzsche, K., Lenz R. y Clinton Fuller R. 1990b. Bacterial polyesters containing branched poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) units. *Int. J. Biol. Macromol.* 12:92-101.
- Fukui, T., Yoshimoto A., Matsumoto M., Hosokawa S., Saito T., Nishikawa H. y Tomita K.. 1976. Enzymatic synthesis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in *Zooglea ramigera*. *Arch. Microbiol.* 110:149-156.
- Fukui, T., Narikawa Y., Miwa K., Shirakawa Y., Saito T., Nishikawa H. y Tomita K. 1988. Effect of limited tryptic modification of a bacterial PHB depolymerase on its catalytic activity. *Biochem. Biophys. Acta.*, 952: 164-171.
- García Lillo, J. y Rodríguez-Valera F. 1990. Effect of culture conditions on PHB production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2517-2521.
- Gaspar Rosas, A. 1998. Curso de reología de materiales poliméricos argentinos. Instituto Nacional de Tecnología Industrial-Sanico. Julio de 1998.

Gerhardt P. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC.

Gertsberg G. 1998. Effect of phosphate supply on PHB biosynthesis in *Azotobacter chroococcum*. Simposio Internacional de Polihidroxicanoatos, Göttingen, Alemania.

Gilmore D., Antoun S., Lenz R. y Clinton Fuller R. 1992. *J. Ind. Microb.* 10: 199-206.

González L., Martínez T. y Salmeron M. 1994. Production of PHAs by a mutant strain of *A. chroococcum* from waste olive exudate as substrate. Patente Span ES 2 061 405.

Gorenflo V. 1998. Physical and Technical Properties of polyesters containing 4-HV and medium chain-length hydroxyalkanoic acids. Presentado en el Simposio Internacional de biopolimeros, 3-6 junio, Göttingen, Alemania.

Grassie N., Murray E. y Holmes P. 1984. The thermal degradation of poly(-(D)- $\beta$ -hydroxybutyric acid). Part 2. Changes in molecular weight. *Polym. Degr. Stabil.* 6: 95-103.

Griebel R. y Merrick J.M. 1971. Metabolism of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: Effect of mild alkaline extraction on native Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *J. Bacteriol.* 108:782-789.

Griebel R., Smith Z. y Merrick J.M. 1968. Metabolism of PHB. I. Purification composition and properties of native PHB granules from *Bacillus megaterium*. *Biochem.*, 7: 3676-3681.

Hangii U. 1995. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumers goods. *FEMS Microb. Rev.* 16 213-220.

Harrison S.T., Chase H., Amor S., Bonthron K. y Sanders S. 1992. Platicization of PHB in vivo. *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 50-56.

Haywood G.W., Anderson A. y Dawes E.A. 1989a. A survey of the accumulation of novel PHA by bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 11: 471-476.

Haywood G.W., Anderson A. y Dawes E.A. 1989b. The importance of PHB synthase substrate specificity in PHA synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 57: 1-6.

Haywood G.W., Anderson A., Ewing D. y Dawes E.A. 1990. Accumulation of a PHA containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrate by *Pseudomonas* strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3354-3359.

- Haywood G.W., Anderson A., Chou L. y Dawes E.A. 1988a. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the PHA synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett., 52: 91-96.
- Haywood G.W., Anderson A., Chu L. y Dawes E.A. 1988b. The role of NADH and NADPH- linked acetoacetyl-CoA reductase in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organisms *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 52: 259-264.
- Heinze H. y Lafferty R. 1980. A kinetic model for growth and synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16. European J. App. Microbiol. Biotech. 11: 8-16.
- Henry R., Cannon D. y Winkelman J. 1974. Clinical Chemistry. Principles and Techniques, 2nd. ed. Harper and Row Publishers Inc. N.Y. p. 1288.
- Hobbelink H. 1992. La Biotecnología y el futuro de la agricultura mundial. pág.108-111. Editorial Nordan, Montevideo, Uruguay.
- Holmes P.A. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys. Technol. 16:32-36.
- Hori K., Soga K. y Doi Y. 1994. Effect of culture conditions on molecular weights of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from octanoate. Biotechnol. Lett. 16: 709-714.
- Hori Y., Takahashi Y., Yamaguchi A. y Hagiwara T. 1995. Chemical synthesis of novel biodegradable polyesters. Can. J. Microb. 41,1: 282-288.
- Hrabak O. 1992. Industrial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. FEMS Microb. Rev. 103. 251-255.
- Hughes L. y Richardson K. 1981. PHB fermentation Process, *Alcaligenes*. Europ. Patent 8130337.5
- Huijberts, G., Eggink G., Waard P., Huisman G. y Witholt B. 1992. *Pseudomonas putida* KT 2442. Cultivated on glucose accumulates PHA consisting of saturated and unsaturated monomers. Appl. Environ. Microbiol., 58: 536-544.
- Huisman, G.W., Wonink E., Meima R., Kazemier B., Terpstra P. y Witholt B.. 1991. Metabolism of PHAs by *Pseudomonas oleovorans*. J. Biol.Chem. 266: 2191-2198.
- Huisman, G.W., De Leuw O., Eggink G. y Witholt B. 1989. Synthesis of PHA is a common feature of *fluorescent pseudomonads*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1949-1954.

- International Rules for Seed Testing Rules. 1996. Seed Science and Technology 24: Supplement.
- Jackson, F. A. y E. A. Dawes. 1976. Regulation of tricarboxylic acid cycle and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. J. Gen. Microbiol. 97:303-312.
- Jacob. G.S., J.R. Garbow and J. Scharfer. 1986. Direct measurement of PHB in *Pseudomonad* by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR. J.Biol.Chem., 261: 16785-16787.
- Jansen J., Schiffers B., Mathot P. y Brakel J. 1994. Use of bacteria protections in pelleting for preinoculation of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). Seed Science & Technology, 22: 329-336.
- Jarman T., Deavin L., Slocombe S. y Rigaelato R. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *A. vinelandii*. J. Gen. Microb. 107, 59-64.
- Jensen, T. y Sicko L. 1971. Fine structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules in a blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. J. Bacteriol. 106: 683-686.
- Jurtshuk P., Manning Sog. y Barrera C. 1968. Isolation and purification of the D- (-)- $\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase of *Azotobacter vinelandii*. Can. J. Microb. 14, 775-783.
- Kamat, M., Kelkar S. y Vermani M. 1995. Production of exopolysaccharides from *Azotobacter vinelandii*. J. Ferment. Bioeng. 80,6: 599-602.
- Kawaguchi Y. y Doi Y. 1990. Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction. FEMS Microb. Lett. 70: 151-156.
- Kawaguchi Y. y Doi Y. 1992. Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. Macromolecules 25: 2324-2329.
- Karr D., Waters J. y Emerich D. 1983. Analysis of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. Appl. Environ. Microb. 46: 1339-1344.
- Kim G., Yun K., Bae S. y Rhee Y. 1992a. Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes* sp. SH-69 in batch culture. Biotechnol.Lett. , 27-32.

- Kim G., Beo Soo, Lee Y. y Chang H. 1992b. Production of PHB by fed-batch culture of recombinant *E.coli*. *Biotechnol. Lett.*, 14: 811-816.
- Kim O., Gross R. y Rutherford D. 1995. Bioengineering of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for advanced material applications: incorporation of cyano and nitrophenoxy side chain substituents. *Can. J. Microb.* 41,1: 32-43.
- King P. 1982. *Biotechnology. An industrial view*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 32: 2-8.
- Kofronova O., Ptackova L. y Chaloupka J. 1994. Poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Bacillus megaterium*. *Folia Microbiol.* 166-167.
- Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H., Braunegg G. y Lafferty R. 1983. Poly-D-hydroxybutyric acid-a biologically degradable vehicle to regard release of a drug. *Pharm. Ind.* 45: 1004-1007.
- Korsatko W., Wabnegg B., Tillian H., Braunegg G. y Lafferty R. 1983. Poly-D-hydroxybutyric acid-a biodegradable former for long-term medication dosage. 3. Studies on compatibility of poly-HBA implantation tablets in tissue culture and animals. *Pharm. Ind.* 46: 952-954.
- Krieg N. y Holt J. 1984. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kroschwitz J. 1990. *Polymers: Polymer characterization and analysis*. John Wiley & Sons. 1990.
- Krupp, L. y Jewell W. 1992. Biodegradability of modified plastic films in controlled biological environments. *Environ. Sci. Technol.* 26: 193-198.
- Kumagai Y. y Doi Y. 1992. Physical properties and biodegradability of poly(3-hydroxybutyrate)-based blends. *FEMS Microb. Rev.* 103, 451-452.
- Kumar K. y Ethiraj S. 1976. Influence of methanol and groundnut oil on citric acid production from sugar cane juice by *Aspergillus niger*. *Int. Sugar J.* 78 (925): 13-15.
- Kunioka, M. Kawaguchi Y. y Doi Y. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 569-573.
- Kunioka, M., Nakamura Y. y Doi Y. 1988. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* form organic acids. *Polym. Commun.* 29: 174-176.
- Lageveen, R. G., Huisman G., Preusting H., Ketelaar P., Eggink G. y Witholt B. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation

- and composition of poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2924-2932.
- Lauzier C.A., Monasterios C., Saracovan I., Marchessault R., Ramsay B.A., Lednicky F., Janatova V. y Lopour P. 1991. In vitro and in vivo evaluation of PHB and PHB reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* 12:841-847.
- Lee S. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. and Bioeng* 49:1, 1-14.
- Lee I., Kim G., Choi D., Yeon B. y Park Y. 1996. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ferm. Bioeng.* 81, 3: 25-258.
- Lee I., Stegantseva E., Savenkova L. and Park Y. 1995. Effect of nitrogen and oxygen supply on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azotobacter chroococcum*. *J. Microb. Biotechnol.* 5,2:100-104.
- Lee I., Nam S., Choi E., Chang H. y Park Y. 1993. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and measurement of related enzyme activities in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ferm. Bioeng.* 76,5 : 416-418.
- Lehrle R., Williams R., French C. y Hammond T. 1995. Thermolysis and methanolysis of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate): random scission assessed by statistical analysis of molecular weight distributions. *Macromolecules* 28, 4408-4414.
- Leisola L. y Linko L., 1976. Measurement of total cellulase activity using dyed Avicel. *Anal. Biochem.* 70: 592.
- Lemoigne M. 1926. Origine de l'acide  $\beta$ -oxobutyrique obtenue par autolyse microbienne. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 95: 1359-1360.
- Lemoigne M. y Girard H. 1943. Reserves lipidiques  $\beta$ -hydroxybutyriques chez *Azotobacter chroococcum*. *Compt. Rend.* 217: 557-558.
- Lenz R. W., Yang J., Bin Wu, Jeff Harlan C. y Barron A. 1995. Chemical synthesis of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by the polymerization of (R-S)- $\beta$ -butyrolactone with aluminoxane catalysts. *Can. J. Microb.* 41,1: 274-281.
- Liebergesell, M, Mayer F. y A. Steinbuchel. 1993. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 292-300.

- Lotti, N. y Scandola M. 1992. Miscibility of bacterial PHB-co-3-HV with ester substituted celluloses. *Polymer Bulletin*, 29: 407-413.
- Lusty C.J. y Doudoroff M. 1966. PHB depolymerases of *Pseudomonas lemoigne*. *Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 960-965.
- Luzier W. 1992. Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 839-842.
- Mac Neil B. y Harvey L. 1990. *Fermentation. A practical approach*. IRL Press, at Oxford University Press. Oxford.
- Manchak J. y Page W. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology* 140: 953-963.
- Mansfield D., Anderson A. y Naylor L. 1995. Regulation of PHB metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Can. J. Microb.* 41,1: 44-49.
- Marchessault R., Monasterios C., Jesudason J., Ramsay B., Saracovan J., Ramsay J. y Saito T. 1994. *Polym. Degrad. Stab.* 45: 187-196.
- Mas-Castellá J. y Guerrero R. 1995. Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) accumulation in bacterioplankton from Lake Cisó (Spain). *Can. J. Microb.* 41,1: 80-83.
- Masamune S., Walsh C., Sinskey A. and Peoples O.P. 1989. Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by  $\beta$ -ketoacyl thiolase. *Pure & Appl. Chem.* 61:303-312.
- Matavulj M. y Molitoris H. 1992. Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi. *FEMS Microb. Rev.* 103: 323-332.
- Mergaert J., Wouters A., Anderson C. y Swings J. 1995. In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can. J. Microb.* 41,1: 154-159.
- Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J. y Kersters K. 1992. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microb. Rev.* 103: 317-322.
- Merrick J.M. 1965. Effect of polymyxin B, tyrocidine, gramicidin D and other antibiotics on the enzymatic hydrolysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 90,4: 965-969.
- Merrick, J.M. y Doudoroff M. 1960. Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacteria. *Nature*, 189: 890-892.

- Miclaus, N., Vannini C., Celano G., Piccolo A. y Simoncini S. 1992. Evidence of reduced PHB biosynthesis in free living nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter chroococcum*, following acquired resistance to the fungicide captan. *The Science of the Total Environment*, 123/124: 361-375.
- Microbiología Industrial II. 1986. Centro de Estudiantes de Ingeniería "La Línea Recta", Secretaría de Materiales de Estudio y Biblioteca.
- Miyazaki S. S. 1997. Utilización de plásticos biodegradables. *Revista Supercampo*, año IV, N°38, pág. 54. Editorial Perfil.
- Morikawa, H. y Marchessault R. 1981. Pyrolysis of bacterial polyalkanoates. *Can.J.Chem.* 59: 2306-2313.
- Morin, F.G. y Marchessault R. 1992. Solid State <sup>13</sup>C NMR study of the molecular dynamics in amorphous crystalline PHA. *Macromolecules*, 25: 576-581.
- Mulchandani A., Luong J. y Groon G. 1989. Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of PHB acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC17697. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 11-17.
- Mulder E. y Botoronegoro S. 1974. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria. In *The Biology of Nitrogen Fixation*, Plant. Physiol. 37-86. A. Quispel, Editor. American Elsevier Publishing Company, Inc. New York.
- Muller B. y Jendrossek D. 1993. Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 487-492.
- Nakamura S., Doi Y. y Scandola M. 1992. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4 hydroxybutyrate). *Macromolecules* 25: 4237-4240.
- Neijssel O. M. 1993. Microbial adaptation to extreme environments. Department of Microbiology, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
- Nickerson K. y Kenneth W. 1982. Purification of poly-β-hydroxybutyrate by density gradient centrifugation in sodium bromide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1208-1209.
- Odham G., Tunlid A., Westerdahl G. y Marden P. 1986. Combined determination of poly-β-hydroxyalkanoic and cellular fatty acids in starved marine bacteria and sewage sludge by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 905-910.
- Oeding, V. y Schlegel H. 1973. β-Ketothiolase from *Hydrogenomas eutropha* H16 and its significance in the regulation of PHB metabolism. *Biochem. J.* 134: 239-248.

- Orts, W., Marchessault R. y Bluhm T. 1991. Thermodynamics of the melting point depression in PHB-co- $\beta$ -PHV copolymers. *Macromolecules*, 24: 6435-6438.
- Ostle A. y Holt J. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Appl. Env. Microbiol.*, 44: 238-241.
- Page W., Bhanthumnavin N., Manchak J. y Ruman M. 1997. Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate- $\beta$ -hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestrus*. *Appl. Microb. Biotechnol.* 8: 88-93.
- Page W., Sherburne R., D'Elia L. y Graham L. 1995. Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1): 22-31.
- Page W. 1995. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. *Can. J. Microb.* 41,1: 1-3.
- Page W. y Manchak J. 1995. The role of  $\beta$ -oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD. *Can. J. Microb.* 41 (Suppl. 1): 106-114.
- Page W. y Chen Q. 1994. The effect of substrate on the molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Lett.* 16,2: 155-160.
- Page W. y Cornish A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microb.* 59, 12: 4236-4244.
- Page W. 1992a. Suitability of commercial beet molasses fraction as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Lett.* 14,5: 385-390.
- Page W. 1992b. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiol. Rev.* 149-158.
- Page W., Manchak J. y Rudy B. 1992. Formation of PHB-co-HV by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2866-2873.
- Page, W. and O.Knosp. 1989. Hyperproduction of PHB during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1334-1339.

- Page, W. 1989. Production of PHB by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 329-333.
- Pearce H.. 1990. Whatever happened to bioplastics. *Scientific European*, 14-17.
- Pecina A. y Paneque A. 1994. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in mucoid and nonmucoid *Azotobacter chroococcum* strains. *Appl. Biochem. and Biotech.* 49, 51-58.
- Pedros-Alió C., Mas J. y Guerrero R. 1985. The influence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* 143: 178-184.
- Peoples O.P. y Sinskey A. 1989a. PHB biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J.Biol. Chem.* 246: 15293-15297.
- Peoples O.P. y Sinskey A. 1989b. PHB biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J.Biol. Chem.* 246: 15298-15303.
- Pierce H. 1990. "Whatever happened to bioplastics" *Scientific European*, 14-17.
- Pirt S.J. 1975. Principles of Microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, England.
- Poirier, Y., Dennis D., Klomparens K. y Somerville C. 1992. PHB a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, 256: 520-523.
- Portoles A., López R. e Hidalgo A. 1968. The action of antibiotics on heteroglucan production by strains of *Azotobacteriaceae*. *Can. J. Microb.* 14, 763-767.
- Pouton C. y Akhtar S. 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 18:2 133-162.
- Powel, K.A., Collison, B.A. y Richardson. 1980. Eur.Patent 80300432.4
- Prescott M. 1950. Manual of Industrial Microbiology. Mc. Graw Hill Publishers.
- Preusting H., W. Hazenberg and B. Witholt. 1993. Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat. *Enzyme Micro. Technol.* 15: 311-316.
- Pries A., Steinbuchel A. y Schlegel H. 1990. Lactose- and galactose-utilizing strains of poly(hydroxyalkanoic acid)- accumulating *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas saccharophilic* obtained by recombinant DNA technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 410-417.

- Quagliano J. y Miyazaki S. 1994. Aislamiento y caracterización de *Azotobacter chroococcum* para la producción de polihidroxialcanoatos. *Rev. Argent. Microbiol.*, 24,1: 21-27.
- Quagliano J. y Miyazaki S. 1997. Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 662-664.
- Quispel A. 1974. The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Ramsay J. A., Berger E., Ramsay B. y Chavarie C. 1990. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnol. Tech.* 4:221-226.
- Ramsay B.A., Lomaliza K., Chavarie C., Dube B., Bataille P. y Ramsay J. 1990. Production of poly-B-hydroxybutyric-co-B-hydroxyvaleric acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2093-2098.
- Ramsay B.A., Ramsay J. y Cooper D. 1989. Production of poly-B-hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 584-589.
- Rees G., Vasiliadis G., May J. y Bayly R. 1992. Differentiation of polyphosphate and PHB granules in an *Acinetobacter* sp. isolated from activated sludge. *FEMS Microb. Lett.* 94: 171-174.
- Reusch, R. N., Hiske T. y Sadoff T. 1987. Cellular incorporation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate into plasma membranes of *Escherichia coli* and *Azotobacter vinelandii* alters native membrane structure. *Can.J. Microbiol.* 33: 435-444.
- Rhee Y.H., Jang J. y Rogers P. 1993. Production of copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes* sp. SH-69. *Biotechnol. Lett.*, 377-382.
- Saito, T., Uzuki K., Yamamoto J., Fukui T., Miwa T., Tomita K., Nakanishi S., Odani L., Suzuki J. y Ishikawa K. 1989. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *J. Bacteriol.*, 171: 184-189.
- Saito T., Saegusa H., Miyata Y. y Fukui T. 1992. Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Zooglea ramigera* I-16-M. *FEMS Microb. Rev.* 103: 333-338.

- Santek B. y Maric V. 1995. Temperature and dissolved oxygen concentration as parameters of *Azotobacter chroococcum* cultivation for use in biofertilizers. *Biotechnol. Lett.* 17,4: 4553-4558.
- Sasikala Ch. y Ramana V. 1996. Biodegradable Polyesters. In *Adv. Appl. Microbiol.* 97-218.
- Scandola M., Ceccorulli G. y Pizzoli M. 1992. Miscibility of bacterial PHB with cellulose esters. *Macromolecules*, 25: 6441-6446.
- Scandola M., Ceccorulli G., Pizzoli M. y Gazzano M. 1992. Study of the crystal phase and crystallization fate of bacterial poly-3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate. *Macromolecules*, 25: 1405-1410.
- Scandola M. y Ceccorulli G. 1990. Viscoelastic relaxations and thermal properties of bacterila poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Int. J. Biol. Macromol.* 12: 112-117.
- Scandola M., Ceccorulli G. y Pizzoli M. 1989. The physical aging of bacterial PHB. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 10: 47-50.
- Scandola M., Pizzoli H. y Ceccorulli G. 1988. Viscoelastic and thermal properties of bacterial poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Int. J. Biol. Macromol.*, 10: 373-377.
- Schink B., Janssen P. y Frings J. 1992. Microbial degradation of natural and of new synthetic polymers. *FEMS Microb. Rev.* 103: 311-316.
- Schirmer A. y Jendrossek D. 1994. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid), P(3OH), by bacteria. Purification and properties of a P(3OH) depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK13 biovar V.
- Schirmer, A, Jendrossek D. y Schlegel H. 1993. Degradation of Poly(3- hydroxyoctanoic acid) P(3OH)Bacteria: Purification and properties of a P(3OH) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1220-1227.
- Schlegel H.G. y Gottschalk G. 1962. Poly- $\beta$ -hydroxybüttersäure, ihre vebreitung funktion und biosynthese. *Angew. Chem.* 74: 342-247.
- Schubert, P., Steinbuchel, A. y Schlegel, H. 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170: 5837-5847.
- Senior P. y Dawes E. 1971. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 125: 55-66.

- Senior P.J., Buch, G., Richie G. y Dawes E. A. 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.*, 128: 1193-1201.
- Senior P.J. y Dawes E.A. 1973. The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.*, 134: 225-238.
- Seymour R. 1971. Introduction to Polymer Chemistry. Mc Graw Hill, New York.
- Shi F., Ashby R. y Gross R. 1996. Use of polyethylenglicol to regulate poly(3-hydroxybutyrate) molecular weight during *Alcaligenes eutrophus* cultivations. *Macromolecules* 29: 7753-7758.
- Shirakura Y., Fukui T., Tanio T., Nakayama K., Matsuno R. y Tomita K. 1986. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) polymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Biochim. Biophys. Acta* 748: 331-339.
- Siddegui, P.J.A., Bergman B., Bjorkman P. y Carpenter E. 1992. Ultrastructural and chemical assessment of PHB in the marine cyanobacterium *Thrichodesmium thiebautii*. *FEMS Microb. Lett.* 94: 143-148.
- Sillman C. y Casida Jr. L. 1986. Cyst formation versus poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *Soil Biol. Biochem.* 181: 23-28.
- Sivasamy P., Palaniandavar M., Vijayakumar C. y Lederer K. 1992. The role of  $\beta$ -hydrogen in the degradation of polyesters. *Polym. Degrad. and Stabil.* 38:15-21.
- Slater S., Gallaher T. y Dennis D. 1992. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microb.* 58: 1089-1094.
- Slater S., Voige W. y Dennis D. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* 170: 4431-4436.
- Slepecky R. y Law J.L. 1961. Assay of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82:33-36.
- Smet, M.J., Eggink M., Witholt B., Kingmon J. y Wynberg H. 1983. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.*, 154: 870-878.
- Sonnleitner, B., Heinzle E., Braunegg G., y Lafferty R. 1979. Formal kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplasma*

- rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7: 1-10.
- Srienc, F., B. Arnold y J. E. Bailey. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 982-987.
- Stein R. 1992. Polymer recycling opportunities and limitations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 835-838.
- Steinbüchel A., Aerts K., Babel W., Follner C., Liebergesell M., Madkour M., Mayer F., Pieper U., Pries A., Valentin H. y Wieczorek R. 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microb.* 41,1: 94-105.
- Steinbüchel A. y Pieper U. 1992a. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 1-6.
- Steinbüchel A. y Pieper U. 1992b. Utilization of mutants of *Alcaligenes eutrophus* altered in amino acid metabolism for production of PHBV from unrelated substrates. *FEMS Microb. Lett.* 103: 389-390.
- Steinbüchel A. y Wiese S. 1992. A *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxy butyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 691-697.
- Steinbüchel A. 1991a. "Polyhydroxyalkanoic acids" in *Biomaterials: Novel Materials from biological sources*. David Byrom (Editor) Macmillan Publishers Ltd, Basingstoke pp.123-213.
- Steinbüchel A. 1991b. Recent advances in the knowledge of the metabolism of bacterial PHA and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics. *Acta Biotechnol.*, 11, 419-427.
- Stockdale, H., Ribbons, D.W. y Dawes, E.A. 1968. Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the *Azotobacteriaceae*. *J. Bacteriol.*, 95: 1798-1803.
- Stuart E., Lenz R. y Clinton Fuller R. 1995. The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in *Pseudomonas oleovorans*. *Can. J. Microb.* 41,1: 84-93.

- Suzuki T., Yamane T. y Shimizu S. 1986a. Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:370-374.
- Suzuki T., Yamane T. y Shimizu S. 1986b. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 366-369.
- Suzuki T., Yamane T. y Shimizu S. 1986c. Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 322-329.
- Suzuki T., Deguchi H., Yamane T., Shimizu S. y Gekko K. 1988. Control of molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 487-491
- Swift G. 1992. Biodegradability of polymers in the environment: complexities and significance of definitions and measurements. *FEMS Microb. Rev.* 103: 339-346.
- Taidi B., Anderson A., Dawes E. y Byrom D. 1994. 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: 786-790.
- Takeda M., Matsuoka H., Ban H., Ohashi Y., Hikuma M. y Koizumi J. 1995. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-hydroxyvalerate) by mutant of *Sphaerotilus natans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37-42.
- Tal, S. y Okon Y. 1985. Production of the reserve material PHB and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.*, 31: 608-613.
- Taussky H. y Shorr E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202: 675-685.
- Tavernier P., Portais J., Saucedo Nava J., Courtois J., Courtois B., and Barbotin J., 1997. Coproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and exopolysaccharide (EPS) with two strains of *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63,1: 21-26.
- Tchan Y. y New C. 1984. Genus I. *Azotobacter heijerinckii* 1901, 567AL, p. 220-221.
- En Krieg N. y Holt J. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.

- Tempest D. 1969. Quantitative relationship between inorganic cations and anionic polymers in growing bacteria. *Soc. Gen. Microbiol.* 19, 65-86.
- Tempest D. 1984. *Ann. Rev. Microb.* 58: 459-486.
- Timm A. and A. Steinbuchel. 1990. Formation of polyesters consisting of medium chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3360-3367.
- Timm A., Byrom D. y Steinbuchel A. 1990. Formation of blends of various (poly(3-hydroxyalkanoic)). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 296-301.
- Timmins M. y Lenz R. 1994. *TRIP* 2: 15-19.
- Tombolini R and M. P. Nuti. 1989. PHA biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *Microbiol. Lett.* 60: 299-304.
- Valentin H.E., Schonebaun A. y Steinbuchel A. 1992. Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic poly-hydroxy-alkanoic acid from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 507-514.
- Van der Leij F. y Witholt B. 1995. Strategies for the sustainable production of new biodegradable polyesters in plants: a review. *Can. J. Microb.* 41,1: 222-238.
- Vela G. y Rosenthal R. 1972. Effect of peptone on *Azotobacter* morphology. *J. Bacteriol.* 111: 260-266.
- Verhoogt H., St-Pierre N., Truchon F., Ramsay B., Favis B. y Ramsay J. 1995. Blends containing poly(hydroxybutyrate-co-12%-hydroxyvalerate) and thermoplastic starch. *Can. J. Microb.* 41,1: 323-328.
- Vierkant M., Martin D. y Stewart J., 1990. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in eight strains of the genus *Acinetobacter*. *Canadian Journal of Microbiology*, 36: 657-663.
- Vincent 1975. *Manual Práctico de Rizobiología*. Editorial Hemisferio Sur.
- Wallen R. y Rohwedder R. 1974. Polyhydroxyalkanoates from activated sludge samples. *Environ. Sci. Technol.* 21, 1214-1215.
- Wang D., Cooney C., Demain A., Dunnill P., Humphrey A. y Lilly M. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley and Sons.
- Wang, W. S. y Lundgren D. 1969. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 97: 947-950.

- Ward, A. C., B. I. Rowley, and E. A. Dawes. 1977. Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. J. Gen. Microbiol. 61-68.
- Wendlandt I. 1998. The effect of nutrient deficiency on the accumulation and  $M_r$  of PHB from methane. Presentado en el Simposio Internacional de biopolimeros, 3-6 junio, Göttingen, Alemania.
- Wieczorek, R., Steinbuchel A. y Schmidt B. 1996. Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 23-30.
- Williams D., Anderson A. y Dawes E. 1992. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Rhodococcus ruber*. FEMS Microb. Lett. 103: 387-388.
- Williams A. y Wimpenny J. 1975. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture. J. Gen. Microb. 104, 47-57.
- Williamson D. y Wilkinson J. 1958. The isolation and estimation of the poly-beta-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J. Gen. Microbiol. 19: 198-209.
- Wong P. y Evans H. 1971. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. Plant Physiol. 47:750-755.
- Wulfes A. 1998. Substrate-feeding strategy for toxic and inhibiting substrates for optimal biomass growth in a PHB production process. Abstracts of the International Symposium of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers, Münster, Alemania, Junio 3-6, 1998.