

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Amanda Mora^{1*}, Javier Gómez², Alejandro Salazar³, Silvia Sánchez⁴, Ana Carolina Cardona⁵, Guillermo Correa⁶, María Yepes⁷, Mauricio Marín⁸

1: Química, M.Sc., D.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

2: Ingeniero Químico, M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

3: Ingeniero Biológico, M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

4: Bacterióloga, M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

5: Ingeniera Biológica. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

6: Ingeniero Forestal, M.Sc., Ph.D. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

7: Química, M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

8: Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia

* E-mail: almora@unal.edu.co

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de poliésteres de ácidos hidroxialcanoicos (Figura 1), que pueden ser sintetizados y acumulados de manera intracelular, como reserva de carbono y energía, por una amplia variedad de microorganismos. Los PHAs exhiben propiedades fisicoquímicas comparables con los polímeros de origen petroquímico, con la ventaja de que pueden ser degradados hasta CO₂ y H₂O bajo condiciones aerobias o hasta metano en condiciones anaerobias; por lo que son objeto de una gran variedad de estudios en el nivel internacional.

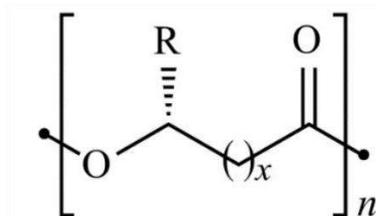


Figura 1. Estructura general de los PHAs. R, grupo alquilo C₁-C₁₄. x, varía desde 1 a 4. n, varía desde 100-35000 unidades.

Pese a sus ventajas la producción de los PHAs a gran escala es limitada, debido a los altos costos de producción, comparados con sus homólogos sintéticos. La inversión alta está asociada principalmente con la fuente de carbono empleada en el proceso fermentativo y con los procesos de recuperación y purificación de los PHAs, que al ser cuerpos de inclusión intracelular demandan grandes volúmenes de solventes con grado de pureza alto. De otro lado, la estructura del PHAs sintetizados por los microorganismos durante el proceso fermentativo, no es fácil de controlar. En

principio se indica que las cadenas poliméricas de PHAs que se obtienen por síntesis microbiana, depende de: (i) la composición de los medios de cultivo, (ii) la naturaleza del sustrato, (iii) la maquinaria enzimática del microorganismo, (iv) de las condiciones operacionales empleadas en el proceso productivo (e.g. T, pH y oxígeno disuelto), así como, (v) de las estrategias de alimentación de los sistemas de fermentación (e.g. lotes, lote-alimentado y continuo). No obstante, los avances en las tecnologías de fermentación, ofrecen herramientas para abordar uno de los factores de mayor influencia en la producción de PHAs, como es la optimización de parámetros operacionales enfocados a maximizar los rendimientos de producción a una mayor escala productiva.

En el grupo de investigación, Producción, Estructura y Aplicación de Biomoléculas (PROBIOM), de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, se han desarrollado algunos trabajos enfocados en diferentes puntos críticos del proceso productivo de los PHAs, a saber:

(i) *Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique* [1]. En esta investigación se aislaron 248 colonias bacterianas de suelos contaminados con residuos del beneficio de fique (*Furcraea bedinghausii*) en el municipio de Guarne (Antioquia), evaluándose su capacidad como productoras de PHAs. Se realizaron tinciones con rojo y azul de Nilo y detección por PCR del gen *phaC*. Las bacterias positivas a dichas pruebas, fueron identificadas utilizando análisis filogenético de secuencias de 16S del ADNr y pruebas bioquímicas. Cuatro cepas de los morfotipos bacterianos encontrados, presentaron potencial para producir PHAs, de los cuales dos fueron identificados como miembros de la especie *Bacillus megaterium*, uno como *B. mycoides* y el otro como *Gordonia* sp. El gen *phaC* se detectó en los dos aislamientos de *B. megaterium*. El análisis cromatográfico, que se realizó mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS/SIM, permitió detectar al polihidroxi-butarato (PHB) como el principal componente de los PHAs sintetizados por *B. megaterium* a partir de glucosa como fuente de carbono.

(ii) *Identificación molecular de bacterias productoras de polihidroxicanoatos en subproductos de lácteos y caña de azúcar* [2]. En este trabajo se evaluó la presencia de bacterias productoras de PHAs en lactosueros derivados de la producción de quesos, y en melaza, cachaza y bagazo de caña de azúcar. El aislamiento bacteriano se realizó en medio mínimo de sales suplementado con glucosa al 2% y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de Rojo de Nilo (0,1%). Las colonias que presentaron fluorescencia a 340 nm en este medio, se evaluaron nuevamente mediante microscopía de fluorescencia con Azul de Nilo. Aquellas cepas que resultaron positivas para ambas pruebas fueron consideradas como potenciales productores de PHAs e identificadas por secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal. Seguidamente se evaluó, en algunas de éstas, la presencia del gen *phaC* mediante PCR con cebadores específicos. Se detectaron 38 cepas productoras de PHAs, representando 18 morfotipos bacterianos. Fueron identificadas en los sustratos de lactosuero cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Enterococcus*; mientras que en los subproductos de caña de azúcar se encontraron cepas de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Gluconobacter*. El gen *phaC* se detectó por PCR en 16 bacterias.

(iii) *Producción de polihidroxicanoatos a partir de sustratos azucarados inexplorados* [3]. En este estudio se evaluó por primera vez dos sustratos de carbono de bajo costo (i.e. pulpa de Algarrobo y jugo de fique) para la producción a escala de laboratorio de polihidroxicanoatos (PHAs) con *Bacillus megaterium*. La detección e identificación de PHA se hizo mediante

cromatografía de gases con detector selectivo de masas operado en el modo de Monitoreo de Ion Selectivo (GC-MS/SIM). Los resultados sugieren que la producción de PHA a partir de pulpa de algarrobo (de *Hymenaea courbaril*) puede ser tan alta como con melaza de caña. Más aún, puede servir para la síntesis del tipo de PHAs más comercializado (*i.e.* Polihidroxibutirato; PHB) y/o de otras variedades (*e.g.* Polihidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato; PHBV) con diferentes propiedades y posibles aplicaciones.

(iv) *Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos* [4]. En este estudio se evaluó la producción de polihidroxibutirato (PHB) usando las cepas nativas, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sp.*, y *Lactococcus lactis* y los sustratos, glicerol grado reactivo(GGR), glicerol residual subproducto de la producción de biodiesel a partir de aceite de palma (GRSB), aceites de *Jatropha*, ricino, frituras y lactosuero. Se estudiaron diferentes sistemas bacteria-sustrato por triplicado, a escala laboratorio bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de sustrato, empleando 50 mL de cultivo en matraces de 250 mL. Se cuantificó el crecimiento bacteriano en todos los sistemas; obteniéndose la mayor acumulación de PHAs para el sistema *B. megaterium*:GGR. Este alcance previo permitió proponer un diseño estadístico de optimización con el GRSB.

De todo lo anterior, se determinó que las bacterias aisladas tienen potencial en la producción de PHAs a partir de fuentes de carbono de diferente naturaleza (*i.e.* pulpa de algarrobo y glicerol residual), lo cual abre la posibilidad de emplear las bacterias obtenidas en procesos alternativos, ambientalmente sostenibles y generadores de valor agregado de subproductos y residuos agroindustriales.

REFERENCIAS

- [1] Sánchez, S. A., Marín, M. A., Mora, A. L., *et al.*, “Identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in soils contaminated with fique wastes”, *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, no. 2, pp. 89–100, 2012.
- [2] Cardona, A. C., Mora, A., Marín, M., “Molecular identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria isolated from dairy and sugarcane residues”, *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, vol. 66, no. 2, pp. 7129–7140, 2013.
- [3] Salazar, A., Yepes, M., Correa, G., *et al.*, “Polyhydroxyalkanoate production from unexplored sugar substrates”, *Dyna*, vol. 81, no. 185, pp. 73–77, 2014.
- [4] Gómez, J., Mora, A., Yepes, M., *et al.*, “Production and characterization of polyhydroxyalkanoates and native microorganisms synthesized from fatty waste”, *International Journal of Polymer Science*, vol. 2016, p. 12, 2016.