



**POLITÉCNICA**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL**

***Producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de ácidos grasos en Pseudomonas putida KT2440: optimización del proceso y cambio de escala en biorreactor tipo tanque agitado***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autor: Marina Rodríguez Carreiro**

**Tutoras: Isabel Díaz Rodríguez/M<sup>a</sup> Auxiliadora Prieto Jiménez**

**Junio de 2019**



**POLITÉCNICA**



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID ESCUELA  
TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de ácidos grasos en *Pseudomonas putida* KT2440: optimización del proceso y cambio de escala en biorreactor tipo tanque agitado

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Marina Rodríguez Carreiro**

**MADRID,  
2019**

Directora: M<sup>a</sup> Auxiliadora Prieto Jiménez y  
Alberto Rodríguez Martín

Profesora: Isabel Díaz Rodríguez

Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal



**POLITÉCNICA**



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS EN *PSEUDOMONAS PUTIDA* KT2440: OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO Y CAMBIO DE ESCALA EN BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO

Memoria presentada por Marina Rodríguez Carreiro para la obtención del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid

Fdo: Marina Rodríguez Carreiro

Vº Bº Tutor

**Dña. M<sup>a</sup> Auxiliadora Prieto Jiménez**

**Dpto. de Biotecnología Microbiana y de Plantas**

**Centro de Investigaciones Biológicas**

Vº Bº Tutor UPM

**Dña. Isabel Díaz Rodríguez**

**Catedrática de universidad**

**Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal**

**ETSIAAB – Universidad Politécnica de Madrid**

Madrid, junio 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible sin la gran ayuda de todos los integrantes de los grupos de “Biotecnología de Polímeros”, “Biotecnología Medioambiental” y “Microbiología Medioambiental”, del departamento “Biología Microbiana y de Plantas” del Centro de Investigaciones Biológicas, que nunca han dudado en ayudarme a lo largo de mi estancia. En especial a Auxi por permitirme formar parte de su increíble equipo, a Manuel y Erika por hacer de estos meses en el laboratorio algo más que un trabajo, y por supuesto a Alberto, que me lo ha enseñado todo, y desde el primer momento se ha preocupado por mí, y por este trabajo, que es tan suyo como mío.

Muchísimas gracias a mis amigos, Almudena, Andrea, Aroa, Cristina, Marina, Eugenio, y gracias a Víctor, porque estos cuatro años del grado de Biotecnología parecían un camino imposible, pero con vosotros lo recorrería todas las veces que fueran necesarias.

Y, por último, gracias a mi padre y a mi madre, y a mis hermanos, Laura y Santiago, por ser las personas que más me apoyan y quieren.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
SUMMARY .....	x
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1.- La problemática de los envases de plástico y su sostenibilidad .....	1
1.2.- Bioplásticos como alternativa a los polímeros convencionales .....	1
1.3.- Pseudomonas putida y su potencial como microorganismo productor de polihidroxialcanoatos .....	3
1.4.- Objetivos del trabajo.....	4
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1.- Materiales.....	5
2.1.1: Reactivos.....	5
2.1.2: Composición de medios de cultivos y conservación .....	6
2.1.3: Microorganismo empleado .....	7
2.1.4: Equipos de laboratorio.....	7
2.2.- Métodos experimentales .....	9
2.2.1: Métodos de análisis.....	9
2.2.1.1: Cuantificación de sustratos.....	9
2.2.1.2: Cuantificación de biomasa.....	11
2.2.1.3: Cuantificación de PHA.....	12
2.2.2: Protocolos experimentales .....	13
2.2.2.1: Conservación y mantenimiento de microorganismos .....	13
2.2.2.2: Obtención del biocatalizador celular.....	14
2.2.2.3: Ensayos de producción de PHA.....	14
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	16
3.1.- Optimización de la composición del medio de cultivo .....	16
3.1.1: Concentración inicial de octanoato sódico .....	16
3.1.2: Concentración inicial de fosfato.....	18
3.2.- Optimización de la velocidad de agitación del cultivo en matraz .....	20
3.3.- Estudio del modo de operación.....	21
3.4.- Estudios en reactor .....	24
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES .....	27
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA.....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: REACTIVOS EMPLEADOS EN LA REALIZACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS, INDICANDO SU FÓRMULA MOLECULAR, PUREZA Y LA CASA COMERCIAL QUE LOS DISTRIBUYE, CON SU CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN. ....	5
TABLA 2: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO LURIA-BERTANI (LB).....	6
TABLA 3: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO R MODIFICADO (R-MOD), DISTINGUIENDO EN AZUL EL MEDIO BÁSICO AUTOCLAVABLE, Y EN VERDE LOS COMPONENTES QUE SE INCORPORAN FILTRADOS UNA VEZ AUTOCLAVADO EL MEDIO BÁSICO. ....	6
TABLA 4: COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE METALES TRAZA DEL MEDIO DE CULTIVO R-MOD. ....	7
TABLA 5: VALORES MÁXIMOS DE LA TASA DE CRECIMIENTO, CONCENTRACIÓN DE PHA Y RENDIMIENTO PHA EN FUNCIÓN DEL SUSTRATO CONSUMIDO, EN EL ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO. 18	
TABLA 6: VALORES MÁXIMOS DE LA TASA DE CRECIMIENTO, CONCENTRACIÓN DE PHA Y RENDIMIENTO PHA EN FUNCIÓN DEL SUSTRATO CONSUMIDO, EN EL ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO. ....	20
TABLA 7: DATOS MÁXIMOS DE LA TASA DE CRECIMIENTO, CONCENTRACIÓN DE PHA, RENDIMIENTO PHA EN FUNCIÓN DEL SUSTRATO CONSUMIDO, Y PORCENTAJE DE AMONIO Y FOSFATO CONSUMIDOS, EN LAS TRES VELOCIDADES DE AGITACIÓN EN MATRAZ ESTUDIADAS. ....	21
TABLA 8: DATOS MÁXIMOS DE LA TASA DE CRECIMIENTO, CONCENTRACIÓN DE PHA, RENDIMIENTO PHA EN FUNCIÓN DEL SUSTRATO CONSUMIDO, Y PORCENTAJE DE AMONIO Y FOSFATO CONSUMIDOS, EN LAS 4 VELOCIDADES DE AGITACIÓN EN BIORREACTOR ESTUDIADAS. ....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS.....	2
FIGURA 2: PSEUDOMONAS PUTIDA KT2440 CON GRÁNULOS INTRACELULARES DE PHA (EXTRAÍDA DE MARTÍNEZ ET AL. 2016) .....	4
FIGURA 3: RECTA PATRÓN DEL CATIÓN AMONIO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL COMPUESTO EN LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS MEDIANTE LA RELACIÓN DE RESULTADOS DE ABSORBANCIA Y VALORES DE CONCENTRACIÓN. ....	10
FIGURA 4: RECTA PATRÓN DEL ANIÓN FOSFATO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL COMPUESTO EN LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS MEDIANTE LA RELACIÓN DE RESULTADOS DE ABSORBANCIA Y VALORES DE CONCENTRACIÓN. ....	10
FIGURA 5: CROMATOGRAMA TIPO OCTANOATO DETECTADO A UNA LONGITUD DE ONDA DE 210 NM Y CON UN TIEMPO DE RETENCIÓN DE 16,7 MINUTOS. ....	11
FIGURA 6: RECTA PATRÓN DEL OCTANOATO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL COMPUESTO EN LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS MEDIANTE LA RELACIÓN DE RESULTADOS DE ABSORBANCIA Y VALORES DE CONCENTRACIÓN. ....	11
FIGURA 7: RECTA DE CALIBRADO DE LA BIOMASA PARA SU CUANTIFICACIÓN EN LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS MEDIANTE LA RELACIÓN DE DATOS DE ABSORBANCIA Y VALORES DE CONCENTRACIÓN.....	12
FIGURA 8: TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE MONÓMEROS DE PHA EN METIL ÉSTERES MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA METANOLISIS, CON EL OBJETIVO DE CONOCER LA COMPOSICIÓN DEL BIOPOLÍMERO SINTETIZADO MEDIANTE GC/MS. (TORRI ET AL.,2014).....	12
FIGURA 9: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE OCTANOATO SÓDICO EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DEL TIEMPO: (A) PRODUCCIÓN DE BIOMASA BACTERIANA; (B) CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO; (C) PRODUCTIVIDAD DE PHA. ....	17
FIGURA 10: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE FOSFATO MONOPOTÁSICO EN EL MEDIO DE CULTIVO A LO LARGO DEL TIEMPO: (A) PRODUCCIÓN DE BIOMASA BACTERIANA; (B) CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO; (C) PRODUCTIVIDAD DE PHA.....	19
FIGURA 11: ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EN MATRAZ A LO LARGO DEL TIEMPO: (A) PRODUCCIÓN DE BIOMASA BACTERIANA; (B) CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO; (C) PRODUCTIVIDAD DE PHA. .....	21
FIGURA 12: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA, OCTANOATO, AMONIO Y PORCENTAJE DE PHA EN PESO SECO DEL CULTIVO EN MEDIO R-MOD OPTIMIZADO, EN MODO DE OPERACIÓN BATCH. ....	22
FIGURA 13: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA, OCTANOATO, AMONIO Y PORCENTAJE DE PHA EN PESO SECO DEL CULTIVO EN MEDIO R-MOD OPTIMIZADO, EN MODO DE OPERACIÓN FED-BATCH, CON PULSOS DE 15 HORAS.....	22
FIGURA 14: ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA, OCTANOATO, AMONIO Y PORCENTAJE DE PHA EN PESO SECO DEL CULTIVO EN MEDIO R-MOD OPTIMIZADO, EN MODO DE OPERACIÓN FED-BATCH, CON PULSOS DE 22 HORAS.....	24
FIGURA 15: ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EN BIORREACTOR A LO LARGO DEL TIEMPO: (A) PRODUCCIÓN DE BIOMASA BACTERIANA; (B) CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO; (C) PRODUCTIVIDAD DE PHA. .....	25

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Grado Celsius
$C_X$	Concentración de biomasa (g/L)
$C_{X_0}$	Concentración inicial de biomasa (g/L)
$C_{PHA}$	Concentración de PHA (g/L)
$C_{PHA}^{max}$	Concentración máxima de PHA (g/L)
eV	Electronvoltio
g	Gramo
h	Hora
L	Litro
ln	Logaritmo neperiano
M	Molar
m	Metro
mA	Miliamperio
Mb	1000000 pares de base
mg	Miligramo
min	Minuto
$\mu$	Tasa de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu^{max}$	Tasa máxima de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu\text{L}$	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
N	Velocidad de agitación (rpm)
nm	Nanómetro
$r_{PHA}$	Productividad de PHA
rpm	Revoluciones por minuto
t	Tiempo
v/v	Relación volumen/volumen
$Y_{PHA/S}$	Rendimiento de PHA al sustrato (g/g)
$Y_{PHA/S}^{max}$	Rendimiento máximo de PHA al sustrato (g/g)

## LISTA DE ABREVIATURAS

CoA	Coenzima A
CDW	Peso celular seco (g)
DAD	Detector UV de Diodo de Array
GAPs	Proteínas de unión a gránulo
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
GC/MS	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
OCT	Octanoato de sodio
OD	Densidad óptica (-)
PHA	Poli-hidroxi-álcanoatos
lcl-PHA	Poli-hidroxi-álcanoatos de cadena larga
mcl-PHA	Poli-hidroxi-álcanoatos de cadena media
scl- PHA	Poli-hidroxi-álcanoatos de cadena corta
PHO	Poli-3(hidroxi-hexanoico-co-hidroxi-octanoico)
PLA	Ácido poliláctico
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Anión fosfato
R-mod	Medio de cultivo R modificado
ROS	Especies reactivas del oxígeno
UV	Ultravioleta
Vis	Visible

## SUMMARY

The work carried out focuses on the optimization of the culture medium of *Pseudomonas putida* KT2440 with the aim of increasing its growth, as well as the production of medium-chain polyhydroxyalcanoates (*mcl*-PHAs).

For this purpose, the initial concentrations of the carbon source (sodium octanoate) and phosphates (monopotassium phosphate) that showed better results during the optimization of the medium were analysed and selected separately. It was performed by studying a moderate range of concentrations of these nutrients in the culture medium in agitated flask.

The stirring speed in the flasks has been optimized in order to establish the best growing conditions and thus facilitate the scaling to laboratory bioreactor (2 litres of workload). The fermenting culture has been carried out with the optimized growth medium and under different stirring conditions to select the one that provided optimal growth and production of PHA.

In addition, tests were also performed under semi-continuous modes of operation (*fed-batch*) in flask, to determine the possibility of prolonging the cultivation over time, to increase cell growth and PHA production in comparison to previous discontinuous culture (*batch*).

For the study and selection of the best parameters of all the tests carried out, a multitude of analysis techniques were used. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used for the detection of carbon sources consumption, The consumption of phosphates and ammonium, as well as for the quantification of the biomass produced in the broth were examined by spectrophotometry techniques. The production of biopolymers was analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer, showing the monomer composition of the biopolymers produced. Finally, the bioreactor culture features auxiliary probes coupled to the fermenter for pH monitoring and temperature control.

In this way it was possible to study the best production strategy for PHA production by *P. putida* KT2440 at laboratory scale, which will provide the key parameters for the scale of the process to industrial-sized equipment or pilot plant type.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

### **1.1.- La problemática de los envases de plástico y su sostenibilidad.**

En la actualidad los plásticos son uno de los materiales que gobiernan nuestro día a día, pues presentan una gran versatilidad, su fabricación implica procesos de bajo coste y energía, y son productos de una alta estabilidad. Sin embargo, es esta última característica la que presenta una importante problemática, por su resistencia a la biodegradación y dificultad en la gestión de residuos.

Los plásticos son polímeros, estructuras de gran tamaño y longitud, formadas por miles de unidades estructurales denominadas monómeros. Esos materiales se fabrican convencionalmente a partir de combustibles fósiles, siendo el petróleo el más usado y conocido. El tratamiento desde el crudo al producto final incluye procesos de polimerización y policondensación. La producción de este tipo de materiales es energéticamente eficiente y de bajo coste, lo que, junto con su versatilidad y durabilidad, explica su uso masivo en la sociedad.

La problemática fundamental del plástico a nivel medioambiental reside en su baja degradabilidad, lo cual dificulta su gestión como residuo. El tratamiento de materias plásticas se puede clasificar en cuatro procesos distintos: entierro de desechos, incineración, reciclado mecánico y químico y biodegradación (North & Halden, 2013). El destino de los plásticos en vertederos implica un gran espacio físico, además de suponer una fuente de contaminación medioambiental grave. La incineración permite el retorno de parte de la energía suministrada en la fabricación de los polímeros, pero genera problemas medioambientales y de salud humana, por la liberación de gases de efecto invernadero y cenizas. El reciclado de materias plásticas implica su transformación como nuevo material de partida. Es posible tratarlo mecánicamente, triturarlo y obtener envases, embalajes y fibras textiles, o bien, si esto no es posible, se prensan y convierten en materiales de construcción. También es posible aplicar procedimientos químicos como la glicolisis o procesos de cracking catalítico. Por último, es importante resaltar que la degradación natural de estos compuestos es un proceso muy lento (más de 50 años) que normalmente consiste en fragmentación (microplásticos) más que en degradación química.

Como se puede observar, existen multitud de técnicas en el tratamiento de plásticos, aunque los inconvenientes derivados de la fabricación masiva de envases convencionales son más acusados que las posibles soluciones. Se están realizando numerosos esfuerzos de concienciación social sobre el uso masivo de los plásticos y su gestión como residuos, aunque el camino por recorrer sea aún largo.

### **1.2.- Bioplásticos como alternativa a los polímeros convencionales.**

Según las estadísticas oficiales, en 2018 se produjeron aproximadamente 350 millones de toneladas de plástico en todo el mundo, siendo de ese total el 18,5 % fabricados en Europa, segundo productor mundial después de Asia (PlasticEurope, 2018). En 2016 la producción mundial fue de 335 millones de toneladas, de las cuales solamente 27 fueron recogidas para ser tratadas en plantas de reciclado. Esta baja tasa de reciclaje, unida a la baja degradabilidad de los plásticos convencionales, ha impulsado el desarrollo de nuevas alternativas como sustituyentes de estos materiales. Además, su fabricación requiere del uso de materias primas no renovables, por lo que no es energética ni medioambientalmente sostenible. Sin embargo, el desarrollo de nuevos materiales sustitutivos que se degraden de manera natural en poco tiempo supondría un importante avance en el tratamiento de estos materiales.

Los bioplásticos son polímeros biodegradables sintetizados por seres vivos. Es posible obtenerlos a partir de biomasa o procesos de fermentación bacteriana. Estos elementos presentan multitud de propiedades similares a los plásticos de origen petroquímico (Verlinden *et al.*, 2007; Prados & Maicas, 2016), lo que los convierte en potenciales sustituyentes de los materiales plásticos convencionales.

Existen distintos tipos de bioplásticos, entre los que destacan los basados en almidón, los polihidroxialcanoatos (PHAs) y los derivados de ácido poliláctico (PLA) (Endres, 2017). Sus aplicaciones son muy diversas, tanto como las de los plásticos convencionales. Se fabrican como envases; en biomedicina como biomateriales de ingeniería de tejidos o nanocarriers de medicamentos; como biocombustibles, gracias a la esterificación de PHA, de la cual se obtienen productos que pueden ser utilizados como biodiesel (Chen, 2009).

Los PHAs son biopolímeros producidos por un amplio rango de seres vivos. Los principales candidatos para la producción de estos materiales a escala industrial son plantas y bacterias. Sin embargo, los organismos vegetales dan lugar a unos rendimientos reducidos si se comparan con los obtenidos en procariontes, a lo que se añaden problemas de crecimiento y desarrollo adecuado de la planta en las condiciones de síntesis del biomaterial (Verlinden *et al.*, 2007). Es por esto por lo que el desarrollo de la mayoría de procesos de producción industrial de PHAs utilizan como productores organismos bacterianos, que acumulan estas sustancias intracelularmente como reserva nutritiva, en forma de gránulos insolubles cuando se cultivan en condiciones de limitación de nutrientes (Gumel *et al.*, 2014).

Estructuralmente son polímeros de hasta 150 monómeros distintos de ácidos grasos hidroxilados en el carbono 3, que presentan esterificado su grupo carboxilo para crear uniones con el grupo hidroxilo del siguiente monómero y así elongar la molécula (Figura 1) (Prados & Maicas, 2016; Muhammadi *et al.*, 2015).

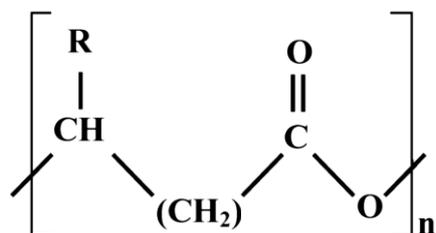


Figura 1: Estructura química de los polihidroxialcanoatos

En función de la longitud de los monómeros que conforman el PHA, se clasifican en tres grupos distintos:

- De cadena corta (*scl-PHAs*): los monómeros presentan de 3 a 5 carbonos.
- De cadena media (*mcl-PHAs*): monómeros con 6 a 14 carbonos.
- De cadena larga (*lcl-PHAs*): cuando los monómeros tienen más de 14 carbonos.

En su síntesis están involucradas numerosas rutas metabólicas centrales en la bacteria, siendo clave la molécula acetil-coA (Chen, 2009), implicada en la ruta de los ácidos tricarbóxicos, la  $\beta$ -oxidación y la producción de ácidos grasos. También se han desarrollado etapas de síntesis química, las cuales dan lugar a fibras de menor longitud, pero donde es más eficaz el control en el diseño estructural de los monómeros mediante estrategias in vivo.

Los PHAs son polímeros biodegradables; es decir, su síntesis y descomposición están mediada por enzimas microbianas (Karmann *et al.*, 2017). En el suelo existen multitud de bacterias con la capacidad de degradar este tipo de biopolímeros. Las enzimas encargadas de su hidrólisis, las despolimerasas, pueden ser intracelulares, empleadas

por el organismo productor para el aprovechamiento de esta reserva nutricional, o bien extracelulares, sintetizadas por organismos de la comunidad microbiana para su uso como fuente de carbono (Jendrossek *et al.*, 1996).

A pesar de que los bioplásticos están comenzando a ser comercializados por distintas empresas, hoy en día no pueden competir comercialmente con los plásticos convencionales. La producción de plásticos a partir de materia orgánica es un proceso de alta eficacia y bajo coste, altamente desarrollado, mientras que la síntesis de biopolímeros bacterianos no es rentable a la hora de referirlo a una escala industrial. Requiere de un estudio previo del organismo productor y de la ruta de síntesis, y posteriores procesos de recuperación del bioproducto de interés, lo que implica una gran inversión, de tiempo y recursos técnicos y económicos. Por ello, la comunidad científica y en especial el área de la biotecnología están destinando grandes esfuerzos a mejorar los procesos de síntesis biológica de este tipo de compuestos. La Directiva 2018/852 de la Unión Europea, que obliga a la sustitución de envases convencionales por otros biodegradables en el año 2025, ha supuesto un enorme impulso al conocimiento y optimización de las condiciones de producción de bioplásticos microbiano, con algunos ejemplos de implantación comercial en las empresas "BioplastTech" o "Ercros", que tienen implantados procesos de producción de PHA a escala industrial.

### **1.3.- *Pseudomonas putida* y su potencial como microorganismo productor de polihidroxicanoatos**

Las especies miembro del género *Pseudomonas spp* pertenecen al filo de las Proteobacterias, de la subclase gamma (Nelson *et al.*, 2002), grupo de bacterias aeróbicas Gram negativas altamente diverso morfológica y fisiológicamente. Destacan por su gran adaptabilidad a la hora de ocupar distintos ambientes (Nikel *et al.*, 2014), encontrando desde patógenos de animales y plantas, hasta colonizadores de suelo.

En particular *Pseudomonas putida* es una especie saprófita con un alto potencial en aplicaciones biotecnológicas, como biorremediación ambiental, producción de biocombustibles, y mejora del crecimiento y control de plagas vegetales por encontrarse algunas cepas asociadas a raíces de plantas (Prieto *et al.*, 2016). Una de las cepas más usadas en experimentación es *P. putida* KT2440. Este microorganismo presenta una gran versatilidad en el modelado de su genoma, el cual está totalmente secuenciado (Nelson *et al.*, 2002). Además de su gran adaptabilidad a la hora de ocupar nichos, justificada por la resistencia a diversos ambientes adversos, y de su versatilidad metabólica, precisa de unos requerimientos nutricionales mínimos para crecer de manera rápida (Poblete-Castro *et al.*, 2012). Todas estas características junto con que ha sido clasificado como un organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Federal Register, 1982), hacen de esta bacteria una alternativa idónea como herramienta biotecnológica.

La capacidad de *P. putida* de producir y acumular biopolímeros como polihidroxicanoatos (PHAs) ha sido altamente descrita y estudiada en multitud de condiciones distintas (Figura 2). Destaca la producción de PHAs de cadena media (*mcl-PHAs*), que se acumulan en el citoplasma en forma de gránulos, rodeados de una monocapa de fosfolípidos y proteínas asociadas (*granule-associated proteins, GAPs*) (Prieto *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2016). Los polímeros de PHA constituyen un importante reservorio de carbono y energía, tanto para la bacteria productora, como para la comunidad microbiana vecina. El catabolismo de estas moléculas está sujeto a la actividad de despolimerasas intracelulares y extracelulares; en *P. putida* destaca la despolimerasa intracelular PhaZ<sub>KT</sub>, que actúa sobre los gránulos de PHA del interior celular cuando los requerimientos nutricionales y energéticos están limitados (De Eugenio *et al.*, 2007; De Eugenio *et al.*, 2008). Estas enzimas han sido descritas en otro tipo de especies bacterianas como *Streptomyces* (Gangoiti *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012).

El enorme potencial que presenta *P. putida* KT2440 como cepa productora de bioplásticos sustituyentes a los derivados petroquímicos usados actualmente, ha provocado el aumento de múltiples proyectos y novedosas tecnologías para poder desarrollar un plan de producción a nivel industrial de bioplásticos.

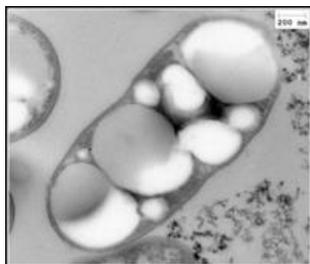


Figura 2: *Pseudomonas putida* KT2440 con gránulos intracelulares de PHA (extraída de Martínez et al. 2016)

Se ha descrito ampliamente que la producción y acumulación de PHA en el interior celular se ve favorecida cuando las bacterias se cultivan en medios de crecimiento definidos limitados en nutrientes básicos, como carbono, nitrógeno y fósforo, o bien combinaciones de ellos.

Las fuentes de carbono más utilizadas para este proceso son ácidos grasos de distinta longitud. En el metabolismo de *P. putida*, estos compuestos están destinados a la producción de biomasa y a la síntesis de derivados hidrocarbonados, como distintos tipos de PHAs. La limitación de este nutriente provoca una notable disminución en la producción de biopolímeros (Poblete-Castro et al., 2012, Fig 1). La mayor parte del carbono se destina a producción de biomasa como supervivencia de la población. Por lo tanto, se concluye que la fuente de carbono es esencial para la producción de PHAs, en aquella concentración en la cual las células bacterianas no vean comprometido su crecimiento, para así destinar parte del carbono a la síntesis de biopolímeros.

La amplia información descrita en bibliografía permite concluir que ciertos estreses nutricionales provocan una reacción en la bacteria que se traduce en un incremento en la producción del biopolímero y en el crecimiento celular (Lee et al., 2000; Zinn et al., 1998). La limitación de la fuente de nitrógeno puede mejorar la producción de PHA bajo determinadas concentraciones de carbono, aunque puede afectar a la síntesis de biomasa, reduciendo con ello el rendimiento del proceso (Johnson et al., 2010). Un cultivo en condiciones de limitación de fósforo puede mejorar considerablemente la velocidad global del proceso, entendida como la de crecimiento de la biomasa, etapa en la que también se produce la acumulación de PHAs en forma de gránulos (Lee et al., 2000). La optimización del medio de cultivo, acotando las concentraciones de sus componentes en torno a valores limitados (ratios C/N y C/P), es clave para progresar en el desarrollo de nuevos materiales renovables como son los bioplásticos.

#### 1.4.- Objetivos del trabajo

El objetivo de este trabajo es optimizar el medio de crecimiento de *P. putida* KT2440 limitando la fuente de fosfatos para así mejorar la producción de bioplásticos, además de realizar el cambio de escala de este proceso a biorreactor tipo tanque agitado, estudiando complementariamente el modo de operación más adecuado para maximizar la síntesis del producto de interés. Como fuente de carbono se emplea ácido octanoico, en forma de octanoato de sodio, un ácido graso de cadena media que se encuentra en aceites vegetales. De esta manera, se podría desarrollar un proceso industrial sostenible de producción de bioplástico a partir de residuos de aceites vegetales.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se expone de manera detallada el procedimiento llevado a cabo para la realización de todos los experimentos, así como los reactivos, equipos y material empleados. También se indican los protocolos experimentales seguidos en el laboratorio, de todas las fases del cultivo bacteriano y de las técnicas de análisis de los distintos componentes del medio de crecimiento.

### 2.1.- Materiales

Seguidamente se detallan los reactivos, los medios de cultivo, el microorganismo empleado y los equipos de los que se dispusieron en la realización de este trabajo.

#### 2.1.1: Reactivos

En este apartado se resumen en una tabla los reactivos empleados a lo largo de todo el proceso (Tabla 1).

*Tabla 1: Reactivos empleados en la realización de los experimentos, indicando su fórmula molecular, pureza y la casa comercial que los distribuye, con su código de identificación.*

Compuesto	Fórmula molecular	Marca	Pureza	Código
Acetonitrilo	CH <sub>3</sub> CN	VWR	100,0 %	20060.320
Ácido cítrico monohidratado	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	Merck	99,5-100,0 %	1.00244.0500
Ácido clorhídrico	HCl	Merck	37,0 %	1.00317.1000
Ácido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Honeywell	95,0-97,0 %	016-020-00-8
Antiespumante	-	Sigma-Aldrich	-	A6426-100G
Borato de sodio	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	Honeywell	100,0 %	1303-96-4
Cloroformo	ClCH <sub>3</sub>	Merck	100,0 %	1.02445.1000
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck	99,0-100 %	1.02382.1000
Fenol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Merck	99,0-100,0 %	1.00206.0250
Fosfato monopotásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	100,0 %	1.04873.1000
Fosfato diamónico	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	100,0 %	1.01207.0506
Glicerol		PanReacAppliChem	87,0 %	A 3739,1000
Molibdato amónico tetrahidratado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>7</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich	81,0-83,0 %	MO878-100G
Hipoclorito sódico	NaClO	Merck	6,0-14,0 %	1.05614.2500
Kit comercial destinado a la cuantificación de fosfatos	-	Sigma-Aldrich	-	MAK030-1KT
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Merck	100,0 %	1.06009.1000
Ácido m-toluico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Fluka	>99,0 %	
Nitroprusiato sódico dihidratado	C <sub>5</sub> N <sub>6</sub> OFe	Sigma-Aldrich	100,0 %	S-0501
Sulfato de amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	≥ 99,5 %	1.01217.1000

<b>Sulfato de cobre pentahidratado</b>	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	Fluka	≥ 99,0 %	61240
<b>Sulfato ferroso monohidratado</b>	FeSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	Fluka	>76,0 %	4490
<b>Sulfato de magnesio heptahidratado</b>	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Merck	100,0 %	1.05886.0506
<b>Sulfato de manganeso monohidratado</b>	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O;	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %	M7634-100G
<b>Sulfato de sodio</b>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acros Organics	< 99,0 %	424410010
<b>Sulfato de zinc pentahidratado</b>	ZnSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	Merck	99,5-100,0 %	1.08883.0500
<b>Octanoato sódico</b>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NaO <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %	C5038-500G

## 2.1.2: Composición de medios de cultivos y conservación:

Medio Luria-Bertani (LB) (Tabla 2):

Tabla 2: Composición del medio de cultivo Luria-Bertani (LB).

Compuesto	Concentración (g/L)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

El pH se ajusta a 7 con hidróxido sódico, NaOH 10 M, y se esteriliza en autoclave.

Medio R modificado (R-mod) (Tabla 3):

Tabla 3: Composición del medio de cultivo R modificado (R-mod), distinguiendo en azul el medio básico autoclavable, y en verde los componentes que se incorporan filtrados una vez autoclavado el medio básico.

Compuesto	Concentración (g/L)	Concentración (ml/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	-
Ácido cítrico	0,8	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O*	1,4	-
Solución metales traza**	-	10
Octanoato sódico	***	

 Medio Básico  
 Medio Completo

\*Se prepara a partir de una disolución concentrada de MgSO<sub>4</sub> 1M.

\*\* La solución de metales traza contiene por litro de ácido clorhídrico, HCl 5 M (Tabla 4):

Tabla 4: Composición de la solución de metales traza del medio de cultivo R-mod.

Compuesto	Concentración (g/L)
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10
CaCl <sub>2</sub>	2
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,2
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,5
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	1
(NH <sub>4</sub> ) Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 10H <sub>2</sub> O	0,02

\*\*\* Se han realizado ensayos para optimizar esta variable entre 2,5 y 20 g/L.

La formulación del medio comienza con la preparación del medio R-mod básico, que se esteriliza en autoclave. A continuación, se completa añadiendo en orden los compuestos indicados en la Tabla 3. Se ajusta el pH a 7 con una disolución concentrada de NaOH 10 M, y, por último, se filtra el medio completo en condiciones estériles con la ayuda de una bomba de vacío.

Los medios se conservan a temperatura ambiente.

### 2.1.3: Microorganismo empleado

En este trabajo se experimentó con la bacteria Gram negativa *Pseudomonas putida* KT2440. Fue suministrada por el propio grupo de Biotecnología de los Polímeros del departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

### 2.1.4: Equipos de laboratorio

**Centrífuga:** utilizada con el objetivo de aislar el pellet de biomasa del sobrenadante gracias a la aplicación de fuerzas centrífugas. Se trabajó con la centrífuga de la casa Eppendorf, modelo 5810 R. La componen:

**pH-metro:** permite la medición del pH de las muestras, por la detección de la actividad de los iones H<sup>+</sup>, mediante un diferencial eléctrico entre dos electrodos. Se usó el modelo Basic 20 de la marca *Crison*.

**Incubadora orbital:** se usa para realizar las etapas de obtención de la cepa productora y los ensayos realizados en agitación a temperatura constante a escala de matraz agitado. Se empleó el modelo innova 44 de *New Brunswick Scientific*.

**Campana de flujo laminar:** este sistema permite crear un ambiente estéril en el que trabajar con *P. putida* KT2440 evitando contaminaciones del cultivo y del material de trabajo. Se trabajó con la campana de flujo de la casa *Fisher Scientific*, modelo Telstar AV-30/70, limpiando su interior con etanol al 95% antes y después de su uso.

**Campana de extracción de laboratorio:** evita la exposición a sustancias y vapores peligrosos cuando su manipulación es necesaria. Se empleó la campana de gases de la marca *Burdinola*.

**Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS):** este equipo permite la separación y detección de los monómeros de PHA que han sido convertidos en metil-ésteres, mediante diferencias en su volatilidad.

El cromatógrafo de gases empleado pertenece a la casa *Agilent*, modelo 7890. La fase estacionaria está constituida por una columna HP 5 MS (30 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor de película), y la fase móvil es helio. El espectrómetro de masas pertenece también a la casa *Agilent*, y es el modelo 5975C; presenta un analizador de los espectros iónicos de tipo cuadrupolo.

**Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC):** se emplea para determinar el contenido de octanoato sódico. La cromatografía líquida de alta resolución permite separar distintos compuestos presentes en una muestra en función de la afinidad que manifiesten con una fase móvil y una fase estacionaria. De esta manera, una mezcla de la fase móvil y la muestra se hace pasar a lo largo de la columna; el octanoato reaccionará con la fase estacionaria y se liberará en un mayor tiempo de retención. El dispositivo HPLC usado pertenece a la casa *Agilent*, modelo 1260 Infinity II LC. Presenta cinco módulos distintos: la bomba, que impulsa la fase móvil y la muestra a través del sistema; el inyector o la toma de muestras, donde se mezcla el volumen de la muestra y la fase móvil y se conduce hacia la columna; el horno, en el cual se posiciona la columna y se alcanza la temperatura requerida en el método de análisis; detector de diodo-array, el cual proyecta una longitud de onda al volumen que sale de la columna, en el rango UV-visible, y mide el espectro de absorción de cada compuesto y su tiempo de salida; detector de índice de refracción, que mide la diferencia en la refracción de la luz entre la fase móvil sin muestra, y el volumen que sale de la columna.

**Espectrofotómetro de ultravioleta visible:** se utiliza para la cuantificación de compuestos de interés mediante su espectro de absorción de longitudes de onda abarcadas entre el ultravioleta y el visible. Esto crea una señal eléctrica que se transforma en medida de absorbancia. Se trabajó con un espectrofotómetro UV-VIS de la marca *Jenck*, modelo UV-1240 a dos longitudes de onda distintas: 633 nm para la cuantificación de amonios, y 600 nm para determinar densidad óptica (OD).

**Estufa de cultivo:** a 30 °C permite el crecimiento bacteriano en medio sólido. Se usó una estufa de la casa *J.P.Selecta*, de baja temperatura con tecnología *Peltier*.

**Fotómetro para multiplacas *MultiSkán*:** se utiliza para medir absorbancia en placas de 96 pocillos con el objetivo de cuantificar  $PO_4^{3-}$  en las muestras extraídas. Se trabajó con un *MultiSkán* de la marca *Thermo Scientific*.

**Reactor:** se trabajó con el modelo BIOSTAT® B-Plus, de la casa *Sartorius BBI Systems*. Permite el estudio del crecimiento bacteriano a una mayor escala que en matraz. Consta de:

- Cuba de vidrio, con una capacidad máxima de 2 litros de volumen de trabajo.
- Sistema de refrigeración formado por un encamisado por el que circula el agua de refrigeración, y un depósito, el cual bombea de manera continua el refrigerante por el sistema, para mantener así una temperatura constante durante el ensayo.
- Motor de agitación con dos agitadores (turbinas *Rushton* de 6 palas cada una).
- Sistema de aireación, formado por un "sparger" que burbujea el aire al cultivo bacteriano, un medidor de caudal, una válvula de regulación y toma de aire.
- Termopar que indica la temperatura del caldo de cultivo, cuya señal se encuentra acoplada al sistema de refrigeración para mantener en todo momento el valor fijado como punto de consigna.
- Sonda de pH.
- Sonda de oxígeno disuelto.

- Tomamuestras.
- Condensador, acoplado a la línea de salida de gas y conectado al agua de refrigeración, para evitar la pérdida de nivel por arrastre (“stripping”).

**Balanza de precisión:** utilizada para la medida de los componentes de los medios de cultivo, así como biomasa liofilizada para la cuantificación de PHA. Se trabajó con una balanza de precisión de la casa VWR.

**Autoclave:** se usó el esterilizador de la casa *Matachana*, serie SC500, con el objetivo de esterilizar todo el material empleado en el transcurso de este trabajo.

**Liofilizador:** este dispositivo permite la deshidratación completa en condiciones de vacío de muestras congeladas de biomasa, recogidas a lo largo de los ensayos de producción de PHA. Esta etapa es necesaria como paso previo a la cuantificación del bioplástico, para eliminar el agua contenida en la biomasa y facilitar la extracción de los metil-ésteres de los monómeros de PHA. Se trabajó con el modelo Benchtop K de la casa *VirTis*.

## 2.2.- Métodos experimentales

En este apartado se indican de forma detallada los métodos de análisis y los protocolos experimentales que se han realizado. En los métodos de análisis se recogen las técnicas empleadas para la cuantificación de los sustratos de interés del medio, así como de la biomasa bacteriana y PHA. Entre los protocolos experimentales se describe la conservación, mantenimiento y precultivo de *P. putida* KT2440, además de la puesta a punto en la producción de PHA, tanto a escala de matraz como de biorreactor.

### 2.2.1: Métodos de análisis

#### 2.2.1.1: Cuantificación de sustratos

- **Ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ):** se emplea un método colorimétrico, el método de *Berthelot* (Escapa *et al.*, 2012), el cual se basa en la reacción entre iones de amonio y fenol que, bajo condiciones oxidantes, da lugar a la formación de indofenol, de color azul. Esta sustancia presenta una alta absorbancia de longitudes de onda de entre 630 y 720 nm. Para ello es necesaria la preparación de dos soluciones, la solución A (5 g fenol y 22,5 mg nitroprusiato sódico en un volumen final de 500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ) y la solución B (2,75 ml de hipoclorito sódico al 12%, 2,5 g NaOH en un volumen final de 500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Estas soluciones se preparan en campana de extracción, y la solución A se protege de la exposición a la luz.

En primer lugar, se realizan diluciones seriadas de las muestras a cuantificar para que las medidas espectrofotométricas estén dentro del límite de detección del método. En cubetas de espectrofotometría con tapa se añaden 50  $\mu\text{L}$  de muestra diluida 100 veces (se hacen duplicados de cada muestra). En campana de extracción se añaden 0,5 ml de la solución A a las cubetas, se agita con la ayuda de vórtex y se añaden 0,5 ml de la solución B y se vuelve a agitar en vórtex.

Se incuban las cubetas 30 minutos a 30 °C, y tras este periodo se mide la absorbancia a 633 nm.

Para poder relacionar los valores de absorbancia con concentraciones del ion amonio es necesario realizar diluciones de concentración conocida a partir del medio de cultivo empleado, R-mod (Figura 3).

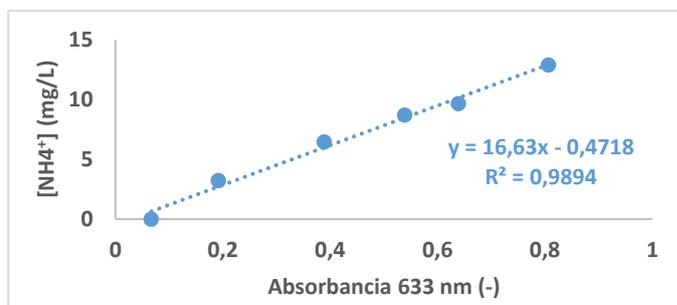


Figura 3: Recta patrón del catión amonio para la cuantificación del compuesto en las muestras extraídas mediante la relación de resultados de absorbancia y valores de concentración.

Se sigue el mismo procedimiento de colorimetría que con las muestras y se mide la absorbancia a 633 nm. Como se conoce la concentración del ion amonio se puede hacer una relación con los valores de absorbancia. Se representan en una gráfica los valores de absorbancia frente a los de [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] y se obtiene la ecuación de la recta patrón (del tipo  $y = ax+b$ ). Con esta fórmula es posible conocer la concentración de amonio de las muestras del cultivo.

- **Anión fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>):** se cuantifica por colorimetría empleando un kit comercial, formado por una disolución de concentración conocida de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (10 mM) y un reactivo fotosensible. Los fosfatos presentes en la muestra reaccionan con el reactivo anterior, que cambia su coloración de naranja a verde. La intensidad de dicho color se mide por absorbancia a 650 nm. De la solución patrón se toman alícuotas para hacer diluciones seriadas y obtener la recta de calibrado (Figura 4) y las muestras del medio de fermentación se diluyen adecuadamente, de forma que las medidas de absorbancia posteriores se encuentren dentro del límite de detección del método.

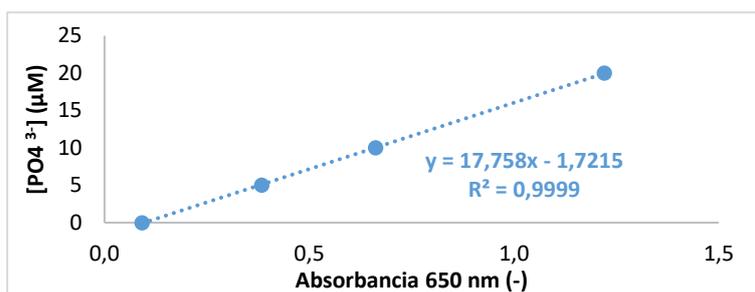


Figura 4: Recta patrón del anión fosfato para la cuantificación del compuesto en las muestras extraídas mediante la relación de resultados de absorbancia y valores de concentración.

Respecto a las muestras, se diluyen 10 veces en un volumen final de 1 ml, y a partir de esta dilución se aplica otra 1:1000 (1 µL de dilución 1:10 en 999 µL de H<sub>2</sub>O miliQ).

La cuantificación se realiza en placas de 96 pocillos, añadiendo 200 µL de muestra y/o patrón por duplicado. A continuación, se añaden a cada pocillo, 30 µL de la solución *Reagent* y se mezcla. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos, protegiéndola de la luz con papel de aluminio. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia en un equipo *MultiSkan* a una longitud de onda de 650 nm. Interpolando estas medidas en la recta de calibrado se puede obtener una relación entre estos dos parámetros y así conocer la [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>] en las muestras del cultivo.

-**Octanoato sódico:** para determinar el contenido de octanoato de sodio se emplea cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En este caso la fase móvil es una solución compuesta por acetonitrilo al 30% y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, y la fase estacionaria es la columna *Aminex HPX-87H* (Korkakaki et al. 2017, Borrero de Acuña et al. 2014) de la casa *BIO-RAD*, ideada para cuantificar ácidos orgánicos y azúcares entre otros compuestos. La separación se realiza

mediante exclusión iónica; es decir, las partículas del interior de la columna (9  $\mu$ L) están impregnadas de una solución ácida (pH 1-3), con la cual los compuestos a medir interactúan de distinta manera. En función de la afinidad de éstos con la fase móvil y el relleno de la columna se van eluyendo a distintos tiempos durante el análisis, pudiendo ser cuantificados mediante diferentes detectores. En este caso, el compuesto analizado por esta técnica es el octanoato sódico, cuya detección ha sido determinada mediante el diodo de array (DAD) a 210 nm.

El método empleado se desarrolla a una temperatura de 30,5°C, toma 15  $\mu$ L de muestra, y tarda en analizarse 20 minutos a un caudal de 0,4 ml/min. El área del octanoato detectada en cada cromatograma (ver Figura 5) se interpola con una recta de calibrado, que la relaciona con la concentración de este compuesto, de la forma que se muestra en la Figura 6.

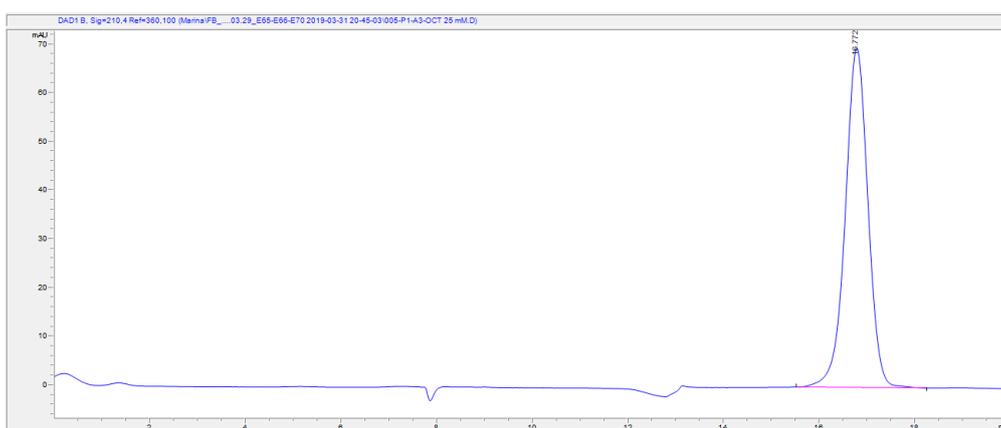


Figura 5: Cromatograma tipo octanoato detectado a una longitud de onda de 210 nm y con un tiempo de retención de 16,7 minutos.

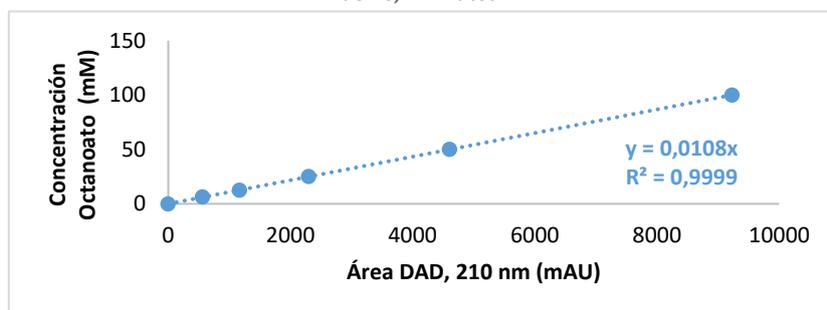


Figura 6: Recta patrón del octanoato para la cuantificación del compuesto en las muestras extraídas mediante la relación de resultados de absorbancia y valores de concentración.

### 2.2.1.2: Cuantificación de biomasa

De cada una de las muestras extraídas en los experimentos de producción de PHA se mide su densidad óptica (OD) a 600 nm. Para poder relacionar las medidas espectrofotométricas con la concentración real de biomasa en el caldo (*Cell Dry Weight*, CDW, g/L) es necesario elaborar una recta de calibrado, a partir de muestras de volumen y contenido en biomasa conocidos (Figura 7).

La elaboración de la recta patrón comienza con el reparto de alícuotas de cultivo bacteriano en tubos *Falcon* de 50 ml, pesados previamente vacíos en una balanza de precisión. En paralelo, se guarda otra alícuota del mismo caldo, que se utilizará posteriormente para hacer diluciones seriadas y obtener distintas medidas de absorbancia del mismo cultivo. El caldo de los tubos se centrifuga y el pellet se congela a - 80 °C y se liofilizan. A continuación, se pesan los

Falcon con el pellet liofilizado de nuevo. La diferencia de pesadas con el tubo vacío se corresponde con la biomasa seca. Dividiendo este valor entre el volumen de partida se calcula la concentración de biomasa ( $C_x$ ) en cada uno de los tubos.

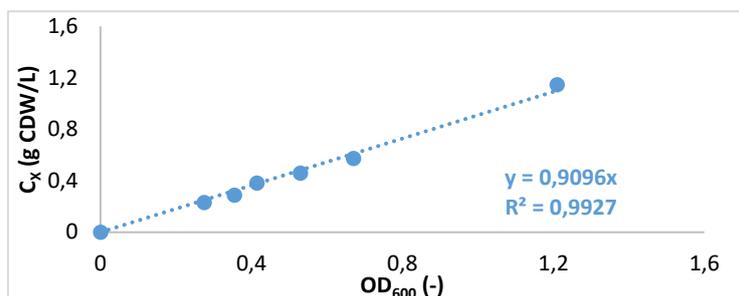


Figura 7: Recta de calibrado de la biomasa para su cuantificación en las muestras extraídas mediante la relación de datos de absorbancia y valores de concentración.

En paralelo se hacen diluciones seriadas (de la alícuota mencionada anteriormente y para cada dilución la OD. Se calcula el peso seco celular en g/L para cada dilución en cada uno de los tres Falcon. De esta manera, para cada tubo se obtiene una curva  $C_x$  vs Absorbancia. Su representación se corresponde con recta (de tipo  $y = ax$ ) y su ecuación relaciona directamente la concentración de biomasa en peso seco con la densidad óptica del caldo de fermentación. La ecuación empleada en este informe se corresponde con la que aparece en la Figura 7, cuya pendiente es el promedio de las tres réplicas obtenidas del procedimiento anterior.

### 2.2.1.3: Cuantificación de PHA

Para determinar el contenido de PHA se lleva a cabo la extracción del biopolímero a una fase orgánica en medio ácido y su posterior transformación en los monómeros estructurales que lo forman. Estos se transforman en metil-ésteres para que después puedan ser detectados por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS) (Escapa *et al.*, 2012) (Figura 8).

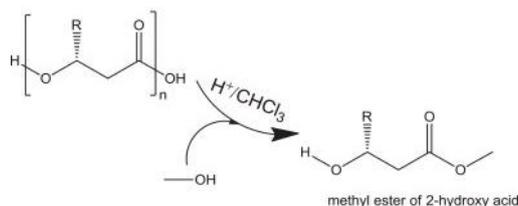


Figura 8: Transformación química de monómeros de PHA en metil ésteres mediante la técnica de la metanolisis, con el objetivo de conocer la composición del biopolímero sintetizado mediante GC/MS. (Torri *et al.*, 2014)

En primer lugar, es necesaria la elaboración de una recta patrón, para evaluar la eficacia de la extracción del PHA a la fase orgánica, por lo que un par de días antes se prepara una disolución de PHA de composición conocida, a una concentración de 0,5 mg/ml en cloroformo,  $\text{CICH}_3$  y se añaden por duplicado distintos volúmenes a tubos de vidrio para obtener alícuotas del polímero de masa conocida (de 0,5 a 2 mg). Se dejan evaporar en la campana de extracción.

Por otro lado, se liofiliza biomasa de las muestras extraídas de los cultivos, y se pesa, de cada uno entre 3 y 6 mg por duplicado en tubos de vidrio, para realizar el proceso a partir de una muestra de masa conocida. A continuación, a cada uno de los tubos, además de los de la recta patrón, se le incluye un imán de agitación, 2 ml de solución de 0,5 mg/ml de 3-metilbenzoato (patrón interno) en  $\text{CICH}_3$  y 2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en metanol al 15% para la

detección de poli-3(hidroxihexanoico-co-hidroioctanoico (PHO), usado como estándar del PHA producido por la bacteria. Ambas soluciones deben mantenerse en hielo para evitar la evaporación de los disolventes. Una vez añadidos estos componentes se tapan los tubos con los tapones de rosca, y se incuban a 100 °C, a 1000 revoluciones por minuto (rpm) en baño de aceite durante 5 horas en el interior de una campana de extracción.

Posteriormente se retiran los tubos del aceite y se dejan en hielo. Cuando se hayan enfriado se elimina la fase acuosa formada y se lava la orgánica para evitar que el pH ácido dañe la columna de detección como se detalla a continuación. Para cada tubo:

- Se vierte el contenido del tubo en un *Falcon* de 15 ml debidamente rotulado.
- Se añade 1 ml de H<sub>2</sub>O miliQ al tubo de metanolisis y se vuelve a verter el contenido en el *Falcon* de 15 ml. Al *Falcon* de 15 ml se le adiciona un cacillo de sulfato de sodio en polvo para retener el agua que quedara contenida en la fase orgánica.

Se centrifugan todos los *Falcon* 15 minutos a 3800 rpm y 4 °C. Las dos fases aparecerán separadas y se procederá a desechar con una pipeta Pasteur la fase acuosa (en la parte superior del tubo). A continuación, se adiciona 1 ml de H<sub>2</sub>O miliQ a cada *Falcon* y se vuelve a mezclar todo el volumen del tubo. El objetivo de este lavado es extraer el ácido residual a la fase acuosa y eliminarlo del cloroformo que contiene los metil-ésteres del biopolímero. Seguidamente Se centrifugan los *Falcon* durante 15 minutos a 3800 rpm y 4 °C y se desecha de nuevo la fase acuosa. Se repite este paso una vez más.

Finalizado el segundo lavado con agua, se desecha la fase acuosa y se pasan 200 µL de la fase orgánica a viales de cromatografía con adaptadores, y debidamente rotulados. Es necesario comprobar que el pH de las muestras se encuentra entre 4-6 para evitar daños en el equipo de cromatografía. Los viales se conservan a 3 °C en el frigorífico y el contenido en peso seco de los metil-ésteres se cuantifica por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

En el análisis de GC/MS se realiza un barrido de temperaturas, de menor a mayor, a lo largo del cual los distintos componentes de las muestras se evaporan y atraviesan la columna del cromatógrafo, dando lugar a distintos tiempos de elución, los cuales identifican las sustancias que son distintas. Además, en el espectrofotómetro de masas se aplica una energía de ionización de 70 eV para obtener los espectros de ionización, y gracias a un detector, es posible diferenciar moléculas muy similares.

## **2.2.2: Protocolos experimentales**

### **2.2.2.1: Conservación y mantenimiento de microorganismos**

El objetivo de esta etapa es obtener un caldo concentrado en *P. putida* KT2440 que se va a utilizar durante los ensayos de laboratorio, manteniéndolo en una disolución conservadora a baja temperatura (solución “stock”).

Se parte de una disolución congelada a – 80 °C de *P. putida* KT2440. A continuación, se transfiere parte del volumen de este concentrado a medio LB sólido, con el objetivo de obtener colonias aisladas de la cepa de interés. Con una micropipeta y una punta estéril, se pone en contacto esta última con el stock bacteriano parcialmente descongelado y se siembra la placa pasando la punta de la micropipeta que ha tocado el cultivo por la superficie del medio sólido en movimientos en *zig-zag*.

Seguidamente la placa se incuba a 30 °C durante 24 horas en el interior de una estufa de cultivo y, posteriormente, las colonias se siembran de forma aislada en tubos *Falcon* de 50 ml con 10 ml de medio LB líquido. Una vez llenos los *Falcon*, se siembran con una colonia aislada de la placa Petri. De esta manera se asegura que cada cultivo líquido proviene de una única colonia, tanto en esta etapa como en las fases posteriores hasta su conservación a baja temperatura.

Los tubos se incuban a 30 °C entre 12-14 horas en agitación de 200 rpm, como primera etapa de acondicionamiento a un medio líquido. Pasado este periodo se transfiere el volumen necesario de estos tubos *Falcon* a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio LB, de forma que la densidad óptima a 600nm inicial de cada cultivo se sitúe en 0,2 unidades. Estos cultivos se incuban a 30 °C, durante 24 horas a 200 rpm en incubadora orbital. Por último, se transfieren en condiciones de esterilidad 700 µl de cultivo a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se les añaden 300 µL de glicerol al 85%. La mezcla constituye la solución de conservación o “*stock*”, que se mantiene a – 80 °C.

### 2.2.2.2: Obtención del biocatalizador celular

Esta etapa se realiza con el objetivo de acondicionar las células a medio líquido y temperatura ambiente y asegurar que el inóculo se encuentra en un estado metabólico activo antes de comenzar los ensayos de producción de PHA. Se parte de un “*stock*” de *P. putida* KT2440 congelado a – 80 °C, el cual se siembra en medio LB sólido de la manera descrita en el apartado 2.2.2.1.

Se realiza un pre-cultivo, para el cual se siembra un pool colonias en matraz Erlenmeyer de 250 ml con medio LB líquido estéril, en proporción 1:5 medio aire.

Se incuba a 30 °C entre 12 y 14 horas en incubadora orbital a 200 rpm. Pasado este periodo, el microorganismo está listo para ser cultivado en los distintos medios seleccionados para la producción de PHA, tanto a escala de matraz agitado como de biorreactor.

### 2.2.2.3: Ensayos de producción de PHA

Los ensayos de producción se pueden dividir en dos bloques distintos en función de la escala empleada, experimentos en matraz, con un volumen de cultivo de 50 ml, o en biorreactor, con un volumen de 2 litros.

**Matraz:** se parte de los pre-cultivos en LB líquido, los cuales se centrifugan 15 minutos a 3800 rpm y 4°C en tubos *Falcon*. Se desecha el sobrenadante, y la biomasa sedimentada en el fondo del tubo, o *pellet*, se resuspende en 5 ml de solución salina, para eliminar los restos de los nutrientes contenidos en el medio LB antes de comenzar los experimentos de producción de PHA (lavado de la biomasa). Esta etapa debe repetirse dos veces más. Tras el último lavado se mide la densidad óptica para conocer qué volumen de inóculo es necesario añadir al medio de producción para empezar el ensayo en una  $OD_{600} = 0,2$  (Escapa et al., 2011). La siembra se realiza en campana de flujo laminar.

A esta escala se llevaron a cabo dos modos de producción distintos, en continuo y en discontinuo, con objetivos diferentes:

- **Experimentos en discontinuo (*batch*):** se realizan para determinar las condiciones óptimas de crecimiento (formulación del medio de cultivo, concentración inicial de sustrato y velocidad óptima de agitación). El matraz sembrado se incuba a 30 °C en agitación de 200 rpm. Durante el crecimiento se toman muestras

para analizar la evolución de la biomasa y la composición del caldo de fermentación. En el caso concreto del estudio de velocidad de agitación los ensayos han sido realizados a 200, 300 y 400 rpm.

- **Experimentos en continuo (*fed-batch*):** se realizan con el objetivo de mantener en el tiempo el crecimiento bacteriano y la producción de PHA, es decir, concentrar el caldo de biomasa y que la síntesis del biopolímero no se detenga debido al agotamiento de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. El matraz sembrado se incuba a 30 °C en agitación de 200 rpm y difiere del *batch* en que periódicamente se añaden pulsos de nutrientes al caldo de cultivo; es decir, se opera en semi-continuo con la fase líquida. En este bioproceso se ha estudiado la adición de fuentes de carbono, fosfato, amonio, o bien una combinación de ellos, a partir de los resultados derivados de los experimentos en discontinuo.

En el momento de dar el primer pulso hay que tener en cuenta el volumen que se ha extraído con las muestras e intentar reponerlo con el mismo. El pH se ajusta a 7 para regresar a las condiciones iniciales de producción.

En ambos modos de operación, se toman medidas de pH y OD a 600 nm de todas las muestras extraídas durante la fermentación. Después se centrifugan a 4 °C 3800 rpm entre 15-20 minutos, dependiendo de la carga celular. Se extrae 1 ml de sobrenadante que se lleva a un vial de HPLC para su posterior análisis, y el resto se descarta. El pellet se congela a - 80 °C y se liofiliza posteriormente para analizar el contenido en PHA mediante GC/MS.

**Biorreactor:** en los experimentos en reactor se trabaja con un volumen de medio R-mod de 2 litros, teniendo en cuenta un inóculo de 100 ml (5% v/v).

En primer lugar, se prepara medio R-mod básico (Tabla 3), y se autoclava junto con la cuba de reacción, habiendo calibrado previamente la sonda de pH.

Se protegen con papel de aluminio las zonas sensibles a las altas temperaturas. Una vez que el conjunto ha sido esterilizado se conecta a la unidad de control y se seleccionan las condiciones experimentales de temperatura, agitación y aireación. En este estudio se ha trabajado a 30°C, alimentando un caudal de aire de 2 L/min y variando la velocidad de agitación entre 200 y 800 rpm. Antes de la adición del inóculo se completa el medio R-mod añadiendo las soluciones de fuente de carbono, magnesio y metales traza y se calibra la sonda de oxígeno, haciendo pasar aire estéril por la cuba de reacción a la velocidad deseada durante 12-14 horas para facilitar la polarización del electrodo de medida.

Por último, se añade el volumen de inóculo necesario (desarrollado de la misma manera que en el punto 2.2.2.1) para que en el caldo del cultivo del fermentador la OD<sub>600</sub> inicial sea de 0,2-0,3.

En este caso el sistema de operación es en *batch*, por lo que, durante la fermentación, se toman muestras del biorreactor para cuantificar la biomasa, el octanoato, el PHA y las fuentes de nitrógeno y fósforo a lo largo del cultivo. El objetivo de estos ensayos es la realización con éxito del cambio de escala de matraz agitado a biorreactor, optimizando la velocidad de transporte de oxígeno a través de la agitación.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se describen los resultados más relevantes del presente trabajo. La organización de los mismos se ha llevado a cabo teniendo en cuenta la escala del proceso (matraz agitado y biorreactor) y las variables de estudio. Los epígrafes 3.1-3.3 muestran los estudios de optimización de la composición del medio de cultivo, la velocidad de agitación y el modo de operación en matraz, mientras que la sección 3.4 se centra en los estudios de cambio de escala en biorreactor. Para el desarrollo de la discusión de estos resultados se han definido las variables de rendimiento de PHA al sustrato ( $Y_{P/S}$ ), su productividad ( $r_{PHA}$ ) y la tasa de crecimiento del microorganismo ( $\mu$ ), mostradas en las ecuaciones (1-3), respectivamente:

$$Y_{P/S} = \frac{C_{PHA}(t)}{C_{OCT}(t_0) - C_{OCT}(t)} \quad (g \text{ PHA} / g \text{ OCT}) \quad (1)$$

$$r_{PHA} = \frac{C_{PHA}(t) - C_{PHA}(t_0)}{t - t_0} \quad (g \text{ PHA} / L \cdot h) \quad (2)$$

$$C_x = C_{x_0} \cdot e^{\mu t} \rightarrow \ln \frac{C_x}{C_{x_0}} = \mu t \rightarrow \mu = \frac{\ln \frac{C_x}{C_{x_0}}}{t} \quad (h^{-1}) \quad (3)$$

donde el subíndice "OCT" hace referencia al octanoato, "t" al tiempo de cultivo al que se recoge la muestra, "X" a la biomasa y "0" a la condición inicial de cada ensayo.

El rendimiento indica la cantidad de producto que se obtiene a un tiempo determinado en función del sustrato consumido por el cultivo en dicho intervalo. La productividad hace referencia a la velocidad con la que se acumula el PHA en el interior de las células. La biomasa producida es una variable dependiente de la concentración inicial del microorganismo, de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y del tiempo. La curva de crecimiento sigue una expresión exponencial dependiente del tiempo, siendo  $\mu$  la pendiente de dicha curva, cuyo valor va cambiando según evoluciona el crecimiento, siendo máximo en la fase exponencial del mismo ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ). Cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria, la tasa de crecimiento desciende hasta alcanzar un valor próximo a 0, momento a partir del cual no se detecta un aumento de la población celular.

### 3.1.- Optimización de la composición del medio de cultivo

*P. putida* KT2440 se cultivó en matraz agitado en medio R-mod (Lee *et al.* 2000), a distintas concentraciones iniciales de la fuente de carbono y de fósforo. El objetivo de estos experimentos fue seleccionar las concentraciones óptimas de estos nutrientes para aumentar la producción de biomasa bacteriana y PHA y su almacenamiento en el interior celular, así como la velocidad global del proceso. En primer lugar, se fijó la mejor concentración de ácido octanoico como nutriente carbonado, y después, en base a su valor óptimo, se estudió la influencia de la reducción de la fuente de fosfato sobre la fermentación.

#### 3.1.1: Concentración inicial de octanoato sódico

Para este primer estudio se tomó como referencia el artículo de Lee *et al.* 2000 para realizar un barrido de concentraciones iniciales de este sustrato, entre 2,5 y 20 g/L. Todos estos ensayos se realizaron en incubadora orbital, bajo unas condiciones de temperatura y agitación de 30 °C y 200 rpm, respectivamente.

La evolución temporal de la productividad y las concentraciones de octanoato y biomasa para este estudio se muestran en la Figura 9.

Respecto a la biomasa producida, el medio con el cual se obtiene una mayor concentración bacteriana es el que parte de 10 g/L de octanoato sódico. Bajo esta condición, se alcanza una concentración en torno a los 11 g/L en 33 horas. En el medio con 5 g/L iniciales la concentración celular máxima que se alcanza es 6,5 g/L a las 15,5 horas, mientras que, en el ensayo de menor contenido en sustrato carbonado, 2,5 g/L de octanoato, la fase estacionaria se alcanza alrededor de las 8 h, con una producción de 2 g/L de biomasa. En los medios con 15 y 20 g/L iniciales de octanoato sódico se observó una inhibición del crecimiento por exceso de fuente de carbono, mucho más evidente en el caso más extremo (ver Figura 9A). Existe, por tanto, una limitación bacteriana a la hora de metabolizar el sustrato carbonado cuando su concentración inicial es superior a 10 g/L.

En relación con el consumo de octanoato (Figura 9B), se observó que en los medios que partieron de 2,5, 5 y 10 g/L el sustrato se consume en el momento en el que alcanzaban la fase estacionaria, es decir, a las horas 13, 15,5 y 36 respectivamente. Esto quiere decir que, en condiciones no inhibitorias, la fuente de carbono se agota totalmente y que dicho flujo se dirige fundamentalmente a la producción de biomasa (incluido el PHA intracelular). En los medios con 15 y 20 g/L la evolución de la concentración de octanoato a lo largo del tiempo se mantiene constante; es decir, no se observa un consumo de la fuente de carbono.

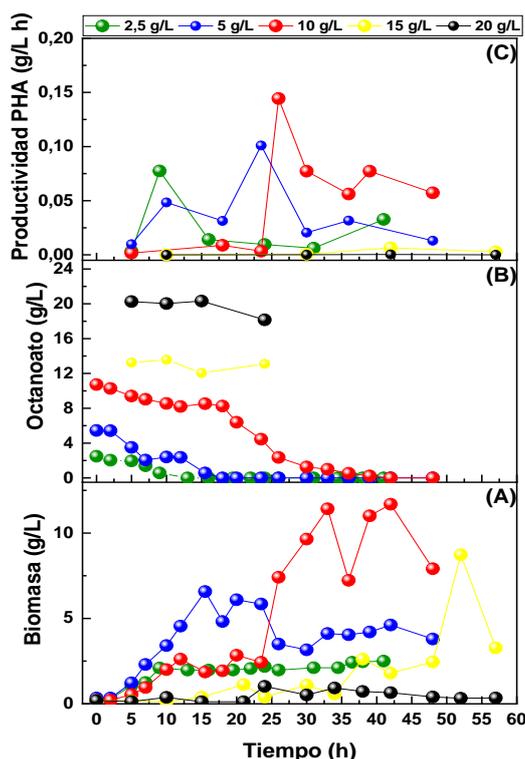


Figura 9: Estudio de la concentración inicial de octanoato sódico en el medio de cultivo a lo largo del tiempo: (A) producción de biomasa bacteriana; (B) consumo de la fuente de carbono; (C) productividad de PHA.

Finalmente, la producción de PHA en cada medio de cultivo aumenta a medida que se aumenta la concentración de ácido octanoico desde 2,5 a 10 g/L, siendo a 15 g/L muy reducida y no competitiva, y a 20 g/L prácticamente nula. En términos de productividad ( $r_{PHA}$ ) (ecuación 2) partiendo de 10 g/L de fuente de carbono se alcanza el valor más elevado en este estudio (0,14 g/L · h a las 26 horas, unos 3,7 g/L totales de PHA), para después disminuir en torno a los 0,06 g/L · h. Este valor es similar en el ensayo de 5 g/L (0,10 g/L a las 23,5 horas), pero la diferencia fundamental entre ambos reside en la concentración total de biomasa alcanzada en esos instantes, lo que

hace más adecuado trabajar con 10 g/L de octanoato, ya que el contenido total de PHA es mayor que en el otro caso (ver Figura 9A). En todos los casos, se observa un descenso muy importante de este parámetro cuando las células entran en fase estacionaria. Este fenómeno es debido al consumo del PHA acumulado como mantenimiento metabólico en ausencia de otra fuente de carbono, tal y como muestra la Figura 9.

En términos de rendimiento ( $Y_{PHA/S}$ ) (ecuación 1), los máximos de los medios con 2,5, 5 y 10 g/L se alcanzan a las horas 9, 23,5 y 30, y son de 0,36, 0,44 y 0,46 g PHA producido / g octanoato consumido, respectivamente. Estos valores justifican de nuevo la selección de la condición inicial de 10 g/L de sustrato carbonado como la más adecuada para este proceso, ya que a pesar de que, la velocidad de crecimiento es ligeramente inferior a las otras dos condiciones viables (2,5 y 5 g/L) se obtienen mayores concentraciones de biomasa y de PHA, con un alto rendimiento en base al consumo de sustrato.

A modo de resumen, en la Tabla 5 se recogen los resultados de la tasa máxima de crecimiento, la concentración máxima de PHA y el rendimiento máximo de PHA en función del sustrato consumido, para las cinco condiciones de concentración inicial de octanoico estudiadas. Las mayores tasas de crecimiento se dan con 5 y 10 g/L de octanoato, siendo la última, la concentración a la cual se obtiene una mayor concentración de PHA, y por lo tanto mayor rendimiento PHA/octanoico.

Tabla 5: Valores máximos de la tasa de crecimiento, concentración de PHA y rendimiento PHA en función del sustrato consumido, en el estudio de optimización de la fuente de carbono.

$C_{OCT,0}$ (g/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$C_{PHA}^{max}$ (g/L)	$Y_{PHA/S}^{max}$ (g/g)
2,5	0,277	0,69	0,36
5	0,311	2,37	0,44
10	0,223	4,33	0,46
15	0,091	0,27	0,04
20	0,04	0,03	0,01

### 3.1.2: Concentración inicial de fosfato

La reducción de la concentración inicial de fosfato como condición de limitación de nutrientes ha sido indicada como favorable para la acumulación de PHA en *P. putida* (Lee et al., 2000). Por ello se propone estudiar este efecto con tres concentraciones diferentes de  $KH_2PO_4$  (22, 7,5 y 4 g/L), manteniendo constante el contenido inicial de  $(NH_4)_2HPO_4$ , que actúa a su vez como fuente de nitrógeno. En estos ensayos se trabajó con 10 g/L de octanoato de sodio inicial, en base a los resultados del apartado 3.1.1. La elección de la mejor concentración de esta sal se realizó en base a los parámetros de biomasa producida (g/L), octanoato consumido (g/L) y productividad de PHA (g PHA/L·h). Estos resultados se muestran en la Figura 10.

La biomasa máxima producida a 4, 7,5 y 22 g/L fue de 13,46 g/L a las 16 horas, 12,46 g/L a las 32 horas, y 12,46 g/L a 30 las horas, respectivamente. La fase estacionaria a 4 g/L de  $KH_2PO_4$  es la que antes se alcanza, a las 16 horas, mientras que a 7,5 y 22 g/L es en torno a las 30 horas. Para las tres condiciones, en las últimas horas de cultivo, la  $C_x$  medida está entre los 10 y 11 g/L. De esta manera, se observa en el medio más limitado en fosfatos un crecimiento mayor y más rápido.

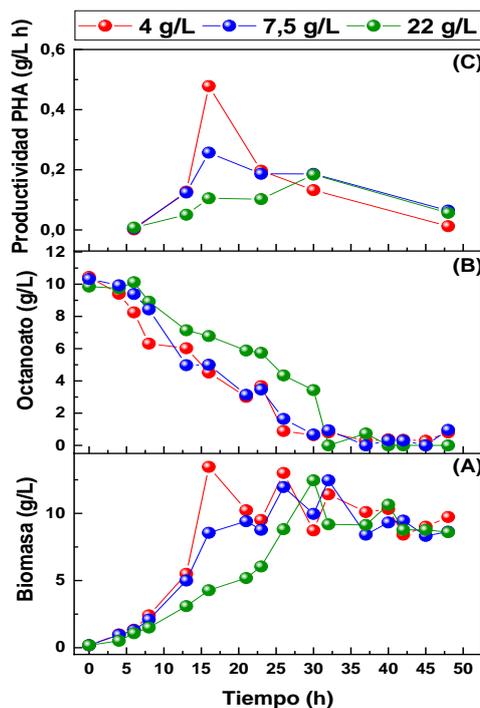


Figura 10: Estudio de la concentración inicial de fosfato monopotásico en el medio de cultivo a lo largo del tiempo: (A) producción de biomasa bacteriana; (B) consumo de la fuente de carbono; (C) productividad de PHA.

El consumo de la fuente de carbono es similar en las condiciones de 4 y 7,5 g/L, sin importantes diferencias, mientras que a 22 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se observa un consumo más lento. En los medios donde el fosfato está más limitado la fuente carbonada se agota en torno a la hora 30, mientras que en la tercera condición esto no ocurre hasta la hora 37.

Respecto al biopolímero producido, las productividades máximas para las condiciones de iniciales de fosfato a 4 y 7,5 g/L se alcanzan a las 16 horas y son de 0,48 y 0,26 g/L · h. Para el medio con 22 g/L la productividad máxima se obtiene a la hora 30 y es de 0,18 g/L · h. En todos los casos se observa una disminución en la productividad tras alcanzar la máxima, lo que se acompaña con una disminución en el contenido de PHA en el cultivo.

En cuanto al rendimiento en función del sustrato empleado por la bacteria, son máximos a las horas de mayor productividad. De las tres condiciones, el mayor rendimiento alcanzado fue en la condición inicial de 4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/g a las 16 horas.

Debido a que a una concentración inicial de 4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se produce la mayor concentración de biomasa en menor tiempo, y se obtiene la mayor productividad de PHA, se considera esta condición como idónea para formular el medio de producción de ahora en adelante.

La Tabla 6 muestra las tasas máximas de crecimiento, la concentración máxima de PHA y el rendimiento máximo de PHA en función del sustrato consumido, para las tres condiciones estudiadas de concentración inicial de fosfatos. Todos estos parámetros son superiores a 4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , por lo que se seleccionó como la mejor concentración inicial de este reactivo

Tabla 6: Valores máximos de la tasa de crecimiento, concentración de PHA y rendimiento PHA en función del sustrato consumido, en el estudio de optimización de la concentración de fosfato.

$[\text{KH}_2\text{PO}_4]_0$ (g/L)	$\mu_{max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$C_{\text{PHA}}^{max}$ (g/L)	$Y_{\text{PHA}/S}^{max}$ (g/g)
22	0,223	4,33	0,46
7,5	0,264	5,59	0,58
4	0,282	7,65	0,96

### 3.2.- Optimización de la velocidad de agitación del cultivo en matraz

Con el objetivo de minimizar el tiempo de operación y aproximar con mayor facilidad el cambio de escala de matraz agitado a biorreactor en el cultivo de *P. putida* KT2440, se llevaron a cabo estudios de agitación en incubadora orbital, con el medio de producción optimizado. Se llevó a cabo un barrido de velocidades de agitación entre 200 y 400 rpm. Los resultados más relevantes se muestran en la Figura 11.

Las agitaciones de 300 y 400 rpm no muestran grandes diferencias respecto a la producción de biomasa y la tasa de crecimiento máxima (ecuación 3), ya que ambos perfiles son prácticamente idénticos. Sin embargo, a una agitación de 200 rpm la mayor densidad celular se obtiene en un tiempo mayor, a las 22,5 horas. La  $\mu_{max}$  es directamente proporcional a la agitación del cultivo (ver Tabla 7), observándose un efecto positivo sobre el crecimiento.

En cuanto al consumo de la fuente de carbono, se observa una relación directa entre la velocidad de agitación de los matraces cultivados y la de agotamiento del octanoato sódico. A 400 rpm en torno a la hora 12,5 se agota la fuente de carbono, mientras que a 300 rpm esto ocurre a las 20 horas, y a 200 rpm a las 30 horas.

De nuevo, en la producción de PHA en las distintas condiciones de agitación existe una relación directa entre el aumento de esta variable y la productividad máxima del bioplástico intracelular. De esta manera, a 400, 300 y 200 rpm las productividades máximas obtenidas son 0,32 g/L · h a 12,5 horas, 0,32 g/L · h a las 17 horas y media, y 0,23 g/L · h a las 22,5 horas, respectivamente.

Los rendimientos máximos alcanzados, presentes en la Tabla 7, reflejan un óptimo con respecto a la agitación en matraz, ya que, a 300 rpm, se obtiene el valor más alto en este estudio. La influencia del aumento de la velocidad de agitación es positiva sobre el crecimiento en todo el rango estudiado, pero no así sobre la producción de PHA, siendo menores los valores de concentración y rendimiento a 400 rpm, con respecto a la condición que presenta mejores resultados (300 rpm), tal y como refleja también los valores representados en la Tabla 7.

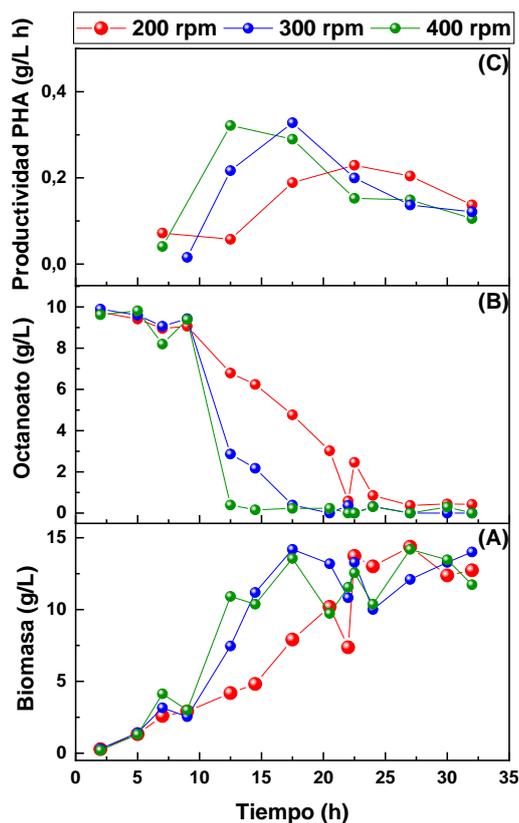


Figura 11: Estudio de la velocidad de agitación del medio de cultivo en matraz a lo largo del tiempo: (A) producción de biomasa bacteriana; (B) consumo de la fuente de carbono; (C) productividad de PHA.

Tabla 7: Datos máximos de la tasa de crecimiento, concentración de PHA, rendimiento PHA en función del sustrato consumido, y porcentaje de amonio y fosfato consumidos, en las tres velocidades de agitación en matraz estudiadas.

N (rpm)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$C_{PHA}^{max}$ (g/L)	$Y_{PHA/S}^{max}$ (g/g)	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] consumido (%)	[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] consumido (%)
200	0,343	5,51	0,58	98,8	13,3
300	0,361	5,73	0,61	98,4	11,1
400	0,413	5,07	0,53	98,6	12,5

### 3.3.- Estudio del modo de operación

La optimización de las variables de operación y composición del medio de cultivo, en discontinuo o *batch*, permitió el desarrollo de estudios preliminares en semi-continuo (*fed-batch*), a escala de matraz agitado. Este modo de operación se caracteriza por la adición de pulsos de una solución nutritiva a lo largo del tiempo de cultivo de la bacteria, para así prolongar su fase de crecimiento exponencial, manteniendo constantes las tasas máximas de crecimiento y producción de bioplástico. De esta manera, se consigue mejorar el rendimiento global del bioproceso.

El cultivo en *batch* a 10 g/L iniciales de octanoato de sodio y 4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> muestra un descenso acusado de la productividad de PHA a partir de la hora 16 (Figura 10). Una posible justificación es el agotamiento de los nutrientes en el caldo de cultivo lo que implica que la bacteria movilice las reservas intracelulares de PHA como fuente de alimento. También se ha demostrado en bibliografía que la reducción de la cantidad del biopolímero producido puede ser debida a un efecto del pH, ya que se ha caracterizado que los valores de pH básicos podrían implicar la

liberación de los gránulos intracelulares de PHA en *P. putida* KT2440 (De Eugenio, 2010), por lo que no formarían parte del pellet de las muestras para la cuantificación de los metil-ésteres del polímero por metanolisis.

Sin embargo, se desconoce cuál de los nutrientes esenciales es el que implica una mayor influencia sobre el crecimiento celular y producción de PHA. Es por esto por lo que la operación en semi-continuo presenta también un mayor interés en este trabajo, ya que sus resultados permitieron identificar los sustratos limitantes del crecimiento y la acumulación del producto de interés (fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo).

Los primeros cultivos en *fed-batch* que se llevaron a cabo fueron enriquecidos, por un lado, solamente con octanoato sódico, y por otro con octanoato sódico, fosfatos y amonio, y se analizaron las concentraciones de biomasa, octanoato, ión amonio y contenido en PHA de la biomasa seca en ambas condiciones (Figura 12). El momento de alimentar el cultivo se estableció cada 15 horas aproximadamente (15, 32, 47, 62 horas), teniendo en cuenta los resultados del medio optimizado en discontinuo (Figura 9A).

La evolución temporal de las variables cuantificadas durante los cultivos en *fed-batch* se muestra en las Figuras 12 y 13. En primer lugar, la concentración de biomasa máxima que se obtiene en el cultivo en *fed-batch* con pulsos de octanoico es de 15,56 g/L a las 47 horas, mientras que en los pulsos enriquecidos además con  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , el mayor valor es de 19,83 g/L a las 81 horas. Se observa, por tanto, una mejoría al adicionar fuente de fósforo y de nitrógeno, aunque el rendimiento con respecto a la biomasa en relación con los sustratos añadidos es bajo.

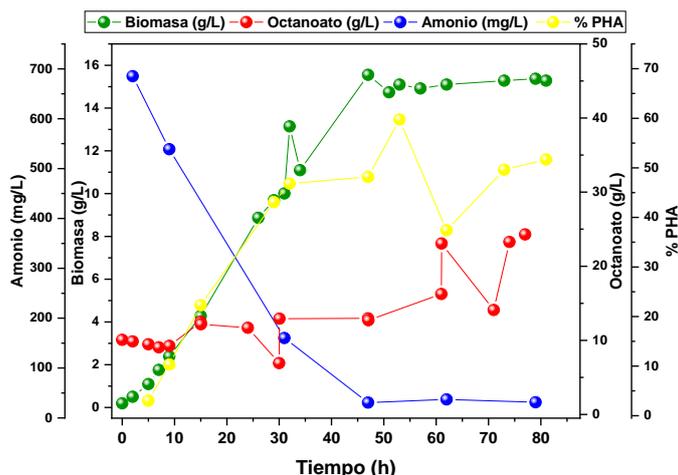


Figura 12: Estudio de la concentración de biomasa, octanoato, amonio y porcentaje de PHA en peso seco del cultivo en medio R-mod optimizado, en modo de operación batch.

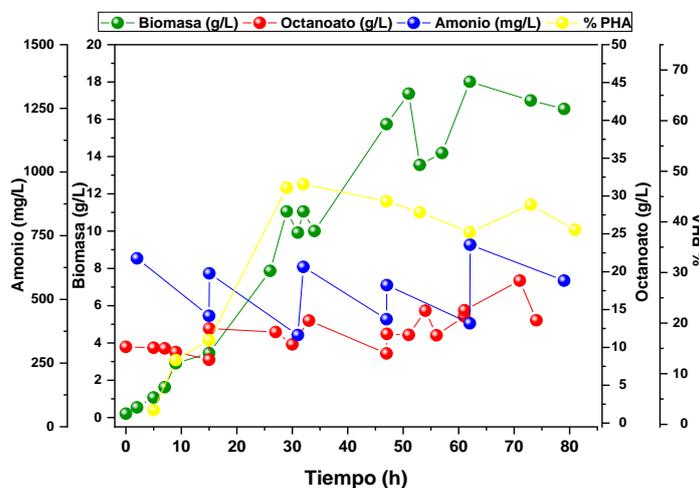


Figura 13: Estudio de la concentración de biomasa, octanoato, amonio y porcentaje de PHA en peso seco del cultivo en medio R-mod optimizado, en modo de operación *fed-batch*, con pulsos de 15 horas.

Los perfiles de consumo de amonio muestran, en el ensayo alimentado solo con octanoato, un agotamiento total a las 47 horas, hora en la cual el cultivo alcanza la fase estacionaria. Por lo tanto, se muestra una clara relación entre la necesidad de fuente de nitrógeno disponible y el crecimiento celular de *P. putida* KT2440. En el caso del cultivo alimentado con pulsos de octanoato y fosfato diamónico, el perfil del ión amonio se ajusta a las 4 adiciones dadas; tras 15 horas la concentración de amonio evoluciona desde los 600 mg/L a los 400 mg/L, para volver a la concentración inicial tras cada pulso. En este caso, la presencia constante de nitrógeno como nutriente para la bacteria retarda la fase estacionaria de crecimiento, permitiendo alcanzar una mayor cantidad de biomasa al final del ensayo.

En cuanto a los perfiles de fuente de carbono, en ambos casos se observa cómo los ciclos de adición de octanoato deben ser optimizados para evitar que el cultivo trabaje en condiciones próximas a la inhibición del crecimiento, tal y como se ha demostrado en el apartado 3.1.1. En las Figuras 13A y 13B se puede observar cómo el primer pulso se adiciona cuando buena parte de este sustrato todavía no ha empezado a consumirse, de modo que siempre se trabaja por encima de los 10 g/L, establecidos como condición óptima de crecimiento en este trabajo.

Por último, el porcentaje de PHA adicionando pulsos de octanoato alcanza un máximo de 59,75% en peso seco a las 53 horas, manteniéndose en torno al 50 % entre las 32 y 81 horas. Al estar el carbono en exceso las bacterias son capaces de mantener su crecimiento, no de aumentarlo porque el nitrógeno está agotado, y además producir PHA. En el caso del otro cultivo en *fed-batch* se alcanza un máximo a las 29 horas de 46,76 % en peso seco, para después mantenerse en torno al 40 % hasta el final del cultivo. En este último cultivo la población bacteriana se encuentra en fase exponencial de forma continuada, obteniendo concentraciones mayores de biomasa que en el otro cultivo semi-continuo, por lo que, dado que el porcentaje de PHA está expresado en función del peso seco, los valores de producción de PHA son mayores.

Ya que los resultados obtenidos en este ensayo fueron prometedores, se llevó a cabo un último cultivo en *fed-batch*, realizando pulsos de los nutrientes por separado y adaptando sus horas de alimentación. De esta manera se mantuvo igual la alimentación de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , a las mismas horas, y los pulsos de octanoato se dieron a las 22 horas, para evitar los errores cometidos anteriormente. Los resultados de las concentraciones de biomasa, octanoato, ión amonio y % de PHA se recogen en la Figura 14.

Las concentraciones de biomasa obtenidas en estas condiciones fueron mucho mayores que en los experimentos anteriores, alcanzando los 32,75 g/L de biomasa a las 130 horas. En este caso solo fueron necesarios 3 pulsos de fosfato diamónico, añadidos en función de la cuantificación de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo. A partir de la hora 120, cuando ya no se continua con la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y este descende en el cultivo, la producción de biomasa también se ve reducida.

En el caso de la concentración de octanoato, el cambio de los ciclos de adición tiene un efecto positivo sobre el comportamiento del cultivo, lográndose un consumo más eficaz y trabajando la mayor parte del tiempo en condiciones no inhibitorias (Figura 14B). El porcentaje de PHA se mantuvo constante, alrededor del 40 % en peso seco a partir de la hora 27, sin observarse un aumento acompañado del crecimiento exponencial de *P. putida* KT2440.

Al estar las fuentes de carbono y nitrógeno en las concentraciones óptimas de cultivo el desarrollo celular puede continuar en el tiempo, produciendo simultáneamente biomasa y PHA además PHA, ya que la disponibilidad de ambos nutrientes lo permiten.

Como consecuencia de los resultados expuestos, se puede concluir que, en un cultivo con un modo de operación semi-continuo, los mejores tiempos de alimentación de octanoato sódico y fosfato diamónico son 22 y 15 horas, respectivamente, obteniendo altas concentraciones de biomasa y una producción de PHA mantenida en el tiempo de manera constante.

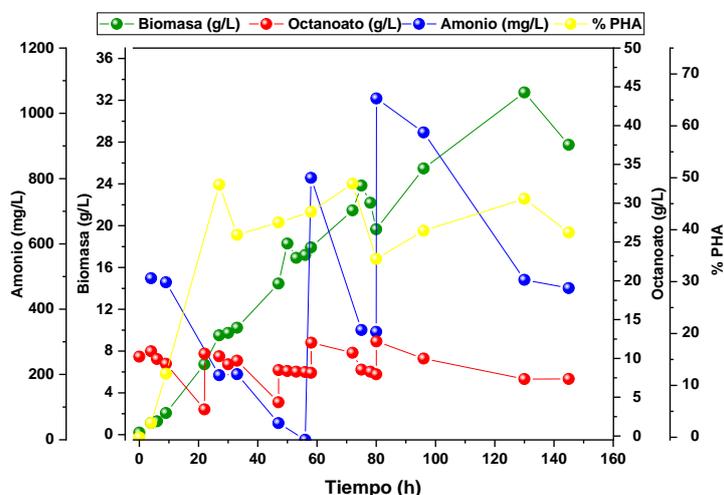


Figura 14: Estudio de la concentración de biomasa, octanoato, amonio y porcentaje de PHA en peso seco del cultivo en medio R-mod optimizado, en modo de operación fed-batch, con pulsos de 22 horas.

### 3.4.- Estudios en reactor

Con el objetivo de escalar el proceso de producción y acumulación de PHAs a un volumen de trabajo de 2 litros se realizaron estudios de cultivo de *P. putida* KT2440 en biorreactor de tipo tanque agitado. Se trabajó con el medio R-mod optimizado según el punto 3.1, a 4 agitaciones distintas (200, 450, 600 y 800 rpm), para así determinar la velocidad óptima para el crecimiento bacteriano y la producción de PHA a una escala de laboratorio.

Los resultados obtenidos en base a la biomasa producida (g/L), fuente de carbono consumida (g/L) y productividad de PHA (g/L · h) se muestran en la Figura 15.

El aumento de la velocidad de agitación en el cultivo en biorreactor se traduce en la llegada a la fase estacionaria en menor tiempo: 10 horas a 800 rpm, 12 horas a 600 rpm, 21 horas a 450 rpm y 36,25 horas a 200 rpm. La velocidad de agitación tiene un efecto directo sobre la disponibilidad de oxígeno por parte del cultivo, ya que potencia su dispersión en el medio, renueva a mayor velocidad el flujo transferido al caldo desde la fase gaseosa y, por tanto, mejora la accesibilidad de las células de *P. putida* KT2440 a este nutriente (Rodríguez, *et al.* 2018). Sin embargo, un exceso de oxígeno disuelto puede provocar situaciones de estrés oxidativo, por un exceso de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Escobar *et al.*, 2016), y también de estrés hidrodinámico, éste último derivado de la agitación, por un aumento de la tensión tangencial a la que están sometidas las células en continuo movimiento durante la fermentación (Rodríguez *et al.*, 2018). Estas situaciones afectan tanto al crecimiento como al metabolismo bacteriano, pudiendo influir negativamente en el rendimiento y la viabilidad de los procesos biotecnológicos (Escobar *et al.*, 2016).

Como puede observarse, el aumento de la velocidad de agitación favorece el crecimiento de la biomasa, tal y como muestra la Figura 15A. Este hecho es mucho más relevante en los experimentos realizados a 600 y 800 rpm, donde los cultivos alcanzan la fase estacionaria en poco menos de 8 horas. Este fenómeno también se refleja en los

perfiles de concentración de octanoato sódico (Figura 15B) y en las productividades máximas alcanzadas en este estudio. Aunque los perfiles mostrados en la Figura 15 pueden sugerir la selección de la agitación a 600 rpm, lo cierto es que el ensayo realizado a 450 rpm dispone de un intervalo temporal amplio en el que esta variable mantiene su valor más elevado (entre 15 y 22 h), alcanzándose una concentración máxima de PHA en torno a los 10 g/L; mientras

que, en el caso del ensayo a 600 rpm, la producción máxima de este compuesto llega a 7 g/L.

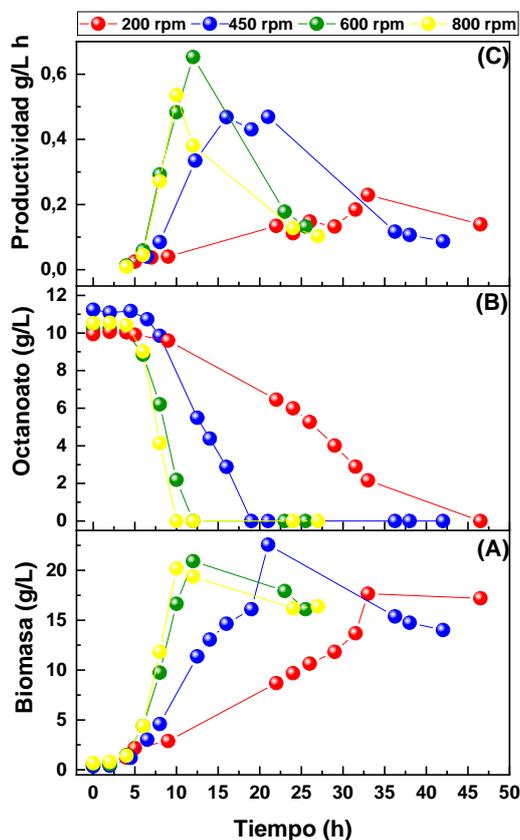


Figura 15: Estudio de la velocidad de agitación del medio de cultivo en biorreactor a lo largo del tiempo: (A) producción de biomasa bacteriana; (B) consumo de la fuente de carbono; (C) productividad de PHA.

El efecto negativo del aumento de la velocidad de transporte de oxígeno sobre la producción de PHA se ve reflejado en el análisis comparativo de los ensayos realizados a 600 y 800 rpm. A pesar de que las curvas de crecimiento son prácticamente idénticas, las diferencias en cuanto a la síntesis del producto de interés son muy significativas. Mientras que en la primera condición los valores de productividad son similares al de 450 rpm (en torno a 0,5 g/(L·h)) a 800 rpm, sin embargo, este valor máximo cae hasta 0,28 g/(L·h). Estas diferencias reflejan un importante cambio metabólico en las células sometidas a condiciones de agitación agresivas, por lo que hacen desaconsejable el empleo de velocidades de transporte de oxígeno tan elevadas para este proceso.

Los resultados obtenidos indican que, respecto a la producción de biomasa, la velocidad de agitación óptima se encuentra en las 450 rpm; sin embargo, respecto a los valores de PHA obtenidos, una agitación de 800 rpm también podría mostrar una alta producción del biopolímero. Para poder concluir estos resultados sería necesario llevar a cabo ensayos adicionales. Del análisis de los resultados de este estudio se puede concluir que el cambio de escala ha sido realizado con éxito, con una velocidad de agitación óptima en torno a las 450 rpm.

Finalmente, en la Tabla 8 se indican los datos de tasas máximas de crecimiento, concentración máxima de PHA y rendimiento máximo de PHA en función del sustrato consumido, para las cuatro condiciones de agitación en biorreactor analizadas, además del porcentaje de amonio y fosfato consumido. Al igual que en matraz agitado los perfiles de consumo son muy similares, sin tener lugar apenas consumo de fosfatos. La mejor velocidad de agitación se encuentra entre las 450 y 600 rpm, pues ambas combinan los mejores resultados obtenidos respecto a  $\mu_{max}$ ,  $C_{PHA}^{max}$  y  $Y_{PHA/S}^{max}$ .

*Tabla 8: Datos máximos de la tasa de crecimiento, concentración de PHA, rendimiento PHA en función del sustrato consumido, y porcentaje de amonio y fosfato consumidos, en las 4 velocidades de agitación en biorreactor estudiadas.*

<b>N (rpm)</b>	<b><math>\mu_{max}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>C_{PHA}^{max}</math> (g/L)</b>	<b><math>Y_{PHA/S}^{max}</math> (g/g)</b>	<b>[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] consumido (%)</b>	<b>[PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>] consumido (%)</b>
<b>200</b>	0,225	5,58	0,558	88,1	12,4
<b>450</b>	0,391	6,34	0,614	91,3	15,1
<b>600</b>	0,431	6,11	0,591	96,7	16,1
<b>800</b>	0,429	5,35	0,535	98,3	15,9

## CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo se han podido deducir las siguientes conclusiones generales:

1. La concentración inicial óptima de octanoato sódico para la producción de biomasa bacteriana y PHA se encuentra en 10 g/L, siendo concentraciones inferiores escasas para un correcto desarrollo del cultivo, y superiores, inhibitorias de este.
2. La concentración inicial óptima de fosfato monopotásico, de las tres estudiadas, para la producción de biomasa bacteriana y PHA se encuentra en 4 g/L.
3. Una mayor velocidad de agitación en matraz provoca un crecimiento celular mayor y en menor tiempo, siendo la producción de PHA también más rápida y mayor.
4. Una mayor velocidad de agitación en biorreactor se traduce en un crecimiento del cultivo de *P. putida* KT2440 más rápido, aunque no necesariamente mayor.
5. El modo de operación en *fed-batch* permite prolongar en el tiempo la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, obteniendo así mayores concentraciones de biomasa y una producción de PHA constante en el tiempo.

## CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA

- Borrero-de Acuña, J., Bielecka, A., Häussler, S., Schobert, M., Jahn, M., & Wittmann, C. et al. (2014). *Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized Pseudomonas putida*. BioMed Central Ltd, 13 (1): 88-103.
- Chen, G. (2010). *Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates*. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, 14 (1): 17-35
- De Eugenio, L., García, P., Luengo, J., Sanz, J., Román, J., García, J., & Prieto, M. (2007). *Biochemical Evidence That phaZ Gene Encodes a Specific Intracellular Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in Pseudomonas putida KT2442*. *Journal Of Biological Chemistry*, 282 (7): 4951-4962.
- De Eugenio, L. I., García, J. L., García, P., Prieto, M. A., & Sanz, J. M. (2008). *Comparative Analysis of the Physiological and Structural Properties of a Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase from Pseudomonas putida KT2442*. *Engineering in Life Sciences*, 8 (3): 260–267.
- De Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J.L., Prieto, M.A. (2010). *The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in Pseudomonas putida KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance*. *Environ Microbiol*, 12 (1): 207-21.
- Endres, H. (2017). *Bioplastics*. *Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology*. Editores: Wagemann K., Tippkötter N. Springer, 166 (1): 427-468.
- Escapa, I., García, J., Bühler, B., Blank, L., & Prieto, M. (2012). *The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 14 (4): 1049-1063.
- Escapa, I., Morales, V., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., García, J., & Prieto, M. (2011). *Disruption of  $\beta$ -oxidation pathway in Pseudomonas putida KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 89 (5): 1583-1598.
- Escobar, S., Rodríguez, A., Gomez, E., Alcon, A., Santos, V., & Garcia-Ochoa, F. (2016). *Influence of oxygen transfer on Pseudomonas putida effects on growth rate and biodesulfurization capacity*. *Bioprocess And Biosystems Engineering*, 39 (4): 545-554.
- Gangoiti, J., Santos, M., Prieto, M., de la Mata, I., Serra, J., & Llama, M. (2012). *Characterization of a Novel Subgroup of Extracellular Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerases from Actinobacteria*. *Applied And Environmental Microbiology*, 78 (20): 7229-7237.
- Gumel, A., Annuar, M., & Heidelberg, T. (2014). *Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by Pseudomonas putida Bet001*. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 45 (2): 427-438.
- Jendrossek, D., Schirmer, A., & Schlegel, H. (1996). *Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 46 (5-6): 451-463.

- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. (2010). *Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs*. *Water Research*, 44 (7): 2141-2152.
- Karmann, S., Panke, S., & Zinn, M. (2017). *The Bistable Behaviour of Pseudomonas putida KT2440 during PHA Depolymerization under Carbon Limitation*. *Bioengineering*, 4 (4): 58.
- Korkakaki, E., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2017). *Impact of phosphate limitation on PHA production in a feast-famine process*. *Water Research*, 126 (1): 472–480.
- Lee, S., Wong, H., Choi, J., Lee, S., Lee, S., & Han, C. (2000). *Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of Pseudomonas putida under phosphorus limitation*. *Biotechnology And Bioengineering*, 68 (4): 466.
- Martínez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E., & Prieto, M. (2016). *Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates*. *Scientific Reports*, 6 (1): 24381.
- Muhammadi, S., Afzal, M., & Hameed, S. (2015). *Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications*. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8 (3-4): 56–77.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... Fraser, C. M. (2002). *Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440*. *Environmental Microbiology*, 4 (12), 799–808.
- Nikel, P. I., Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2014). *Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology*. *Nature Reviews Microbiology*, 12 (5): 368–379.
- North, E. J., & Halden, R. U. (2013). *Plastics and environmental health: the road ahead*. *Reviews on Environmental Health*, 28 (1): 1–8.
- PlasticEurope, 2018, *Plastics- Situación en 2018, Bélgica*. Disponible en Internet: <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1240-plasticos-situacion-en-2018>; consultado el 6/6/2019.
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., dos Santos, V. M., & Wittmann, C. (2012). *Industrial biotechnology of Pseudomonas putida and related species*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (6): 2279–2290.
- Poblete-Castro, I., Escapa, I., Jäger, C., Puchalka, J., Chi Lam, C., & Schomburg, D. et al. (2012). *The metabolic response of P. putida KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach*. *Microbial Cell Factories*, 11 (1): 34.
- Prados, E. and Maicas, S. (2016). *Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA)*. *Universal Journal of Microbiology Research*, 4 (1): 23-30.
- Prieto, A., Escapa, I., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., & de la Peña, F. et al. (2015). *A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 18 (2): 341-357.

- Prieto, M. A., Eugenio, L. I. de, Galàn, B., Luengo, J. M., & Witholt, B. (2007). *Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates*. *Pseudomonas: A Model System in Biology*. Editores: Ramos, J.L., Filloux, A. Springer, 5 (1): 397–428.
- Rodríguez, A., Escobar, S., Gomez, E., Santos, V., & Garcia-Ochoa, F. (2018). *Behavior of several pseudomonas putida strains growth under different agitation and oxygen supply conditions*. *Biotechnology Progress*, 34 (4): 900-909.
- Santos, M., Gangoiti, J., Keul, H., Möller, M., Serra, J. L., & Llama, M. J. (2012). *Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from Streptomyces venezuelae SO1*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (1): 211–222.
- Torri, C., Cordiani, H., Samori, C., Favaro, L., & Fabbri, D. (2014). *Fast procedure for the analysis of poly(hydroxyalkanoates) in bacterial cells by off-line pyrolysis/gas-chromatography with flame ionization detector*. *Journal Of Chromatography A*, 1359 (1): 230-236.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates*. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (6): 1437–1449.
- Zinn, M. (1998). *Dual (C, N) nutrient limited growth of Pseudomonas oleovorans*; Swiss Federal Institute of Technology (ETHZ): Zürich. Tesis Doctoral.