

Biosíntesis y extracción de Polihidroxicanoatos por *Pseudomonas putida* usando residuos orgánicos como sustrato

Cyntia Rocío Flores-Juárez¹, Ana Raquel S. Estilla-Escamilla¹, Juan Pablo Leyva-Hurtado¹, Fabiola Ramos-Alemán¹, Daniel Hernández-Arriaga², Julio Cesar González-Olvera³

¹División industrial área de Nanotecnología, Universidad Tecnológica de Querétaro, Querétaro, Qro. C.P. 76148, México

²Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica, Tecnológico Nacional de México, Campus Querétaro, C.P. 76000, Querétaro, Qro., México

³Universidad Politécnica de Santa Rosa Jáuregui, Parque Industrial Querétaro, C.P. 76220, Santa Rosa Jáuregui, Qro., México

Correspondencia: cynthia.flores@uteq.edu.mx

Resumen

Bacterias como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*, tienen la capacidad de producir biopolímeros como los polihidroxicanoatos (PHA), principalmente PHAs de cadena corta como el polihidroxiacetato (PHA) y co-polímeros PHB-PHV (polihidroxiacetato-polihidroxiacetato). En esta investigación se evaluó la producción de PHAs a partir de una cepa de *P. putida* usando residuos de glicerol y lactosuero como fuentes de carbono, también se realizó un comparativo entre dos métodos de extracción de PHAs con solventes orgánicos, se evaluaron los métodos que utilizan dispersiones hipoclorito de sodio-cloroformo y 1,2-propilencarbonato. Del comparativo entre fuentes de carbono, los resultados mostraron que el glicerol al 1% (v/v) es una mejor fuente de carbono con un rendimiento de 1.337 g/L en comparación a los lactosueros que mostraron un rendimiento de 0.830 g/L, así mismo, en el comparativo entre métodos de extracción, el método con dispersiones hipoclorito de sodio-cloroformo resultó con rendimientos más altos en cuanto a producción de PHAs cuantificados de forma gravimétrica.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos, *Pseudomonas putida*, biopolímeros.

Abstract

Bacteria such as *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida*, have the ability to produce biopolymers such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), mainly short-chain PHAs such as polyhydroxybutyrate (PHB) and co-polymers such as PHB-PHV (polyhydroxybutyrate-polyhydroxyvalerate). In this investigation, the production of PHAs from a strain of *P. putida* was evaluated using glycerol and whey as carbon sources. A comparison was also made between two different extraction methods with organic solvent, using dispersions with sodium hypochlorite and chloroform and 1,2-propylenecarbonate. From the comparison between carbon sources, the results showed that glycerol at 1% (v/v) is a better carbon source with a yield of 1.337 g/L compared to whey that showed a yield of 0.830 g/L, likewise, in the comparison between extraction methods, the method with sodium hypochlorite-chloroform dispersions resulted in higher yields in terms of gravimetrically quantified PHAs production.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas putida*, biopolymers.

Artículo arbitrado

Recibido:

15 de febrero de 2023

Aceptado:

23 de febrero de 2023

Introducción

Los PHAs son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos almacenados en forma de gránulos intracelulares que se acumulan en diferentes especies bacterianas bajo estrés nutricional generado por exceso en una fuente de carbono y déficit de otros nutrientes como nitrógeno, fósforo y magnesio (Shah & Kumar, 2021). Los PHA son considerados como candidatos para el reemplazo de los polímeros tradicionales de origen petroquímico (Trakunjae et al., 2022). El interés sobre los PHA ha aumentado enormemente durante la última década debido a que, además de ser biodegradables y biocompatibles, se pueden obtener a partir de recursos renovables como son los residuos de la industria láctea o de glicerol, residuo de la producción de biodiesel buscando revalorizar este tipo de residuos de manera que sean aprovechados y no ocasionen un mayor impacto al ambiente (Bedade et al., 2021; Kanavaki et al., 2021). En la actualidad se conocen decenas de géneros diferentes de bacterias productoras de PHA, tanto Gram negativas como Gram positivas, que los acumulan en el citoplasma bajo ciertas y determinadas condiciones de cultivo. Gran parte del éxito de estos biopolímeros estará dado por el tipo de sustrato utilizado, así como el método de extracción, ya que tradicionalmente se utilizan solventes orgánicos como el cloroformo que limitan el proceso de escalamiento. Se han evaluado diferentes alternativas más verdes en el proceso de extracción como el 1,2-propilencarbonato, sin embargo, hasta el momento el cloroformo sigue siendo la alternativa con más alto rendimiento (Etxabide et al., 2022; Wongmoon & Napathorn, 2022).

Método

Microrganismo y medio de cultivo

Para evaluar la bioconversión del glicerol y el lactosuero en PHAs se utilizó una cepa de la bacteria gram negativa *Pseudomonas putida*, aislada y caracterizada previamente. Se preparó un medio de cultivo mínimo mineral con la siguiente composición: 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g/L de K_2HPO_4 , 1.5 g/L de KH_2PO_4 , 0.2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 mL de

solución de metales traza que contiene 0.3 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L de EDTA y 1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Como fuente de carbono se usó glicerol al 1 y 2%, lactosuero al 1 y 2% (v/v) y glucosa al 1% (m/v) como control positivo. El medio de cultivo se autoclavó a 121 °C por 15 minutos para asegurar esterilidad. La producción del biopolímero se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen útil de 50 mL añadiendo 10% de inóculo al caldo de cultivo. Se incubó a 30 °C durante 72 h en agitación constante a 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos para recuperar la biomasa. Se descartó el sobrenadante y la biomasa se secó a 40 °C durante 24 h para determinar el peso seco. Se procedió a realizar la extracción del biopolímero con los métodos propuestos, tomando al método hipoclorito de sodio-cloroformo como método de referencia y que se describe en el siguiente apartado. Los experimentos para el comparativo entre los dos métodos de extracción se realizaron solamente con las fermentaciones de glucosa al 1% (m/v).

Métodos de extracción de PHAs

Para el comparativo entre los métodos de extracción se realizó una fermentación con el método descrito en el apartado anterior y usando glucosa al 1% como sustrato, todas las mediciones se hicieron por duplicado. La biomasa seca se pretrató con el hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% y cloroformo (CHCl_3) en una proporción (1:1) considerando 1 mL por cada 0.02 g de biomasa seca. La mezcla se agitó por 1 h a temperatura ambiente y posterior a ello se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se descartó la fase acuosa conteniendo el hipoclorito de sodio. Se adicionó 1 volumen de metanol y se dejó reposar a 4 °C durante 24 h para precipitar los PHA. Por último, se dejó evaporar hasta peso constante (Pradhan et al., 2018). Se evaluó un método alternativo que consistió en el uso de 1,2-propilencarbonato como solvente orgánico. Se adicionó 1,2-propilencarbonato en una proporción de 25 mL por 1 g de biomasa seca. Se incubó a 100 °C durante 30 minutos. Se dejó reposar 24 h, se añadió 1 volumen de acetona para precipitar el PHA, se centrifugó la mezcla y se descartó el

sobrenadante, dejando evaporar a hasta secar completamente. El cálculo de rendimiento de los PHAs se realizó mediante gravimetría (Rao et al., 2019; Trakunjae et al., 2022).

Caracterización de PHAs

Las muestras de PHA se caracterizaron mediante espectrofotometría UV, la metodología consiste en realizar una reacción de oxidación entre el PHA recuperado y H_2SO_4 concentrado. Las muestras se incubaron a 100 °C durante 1 h, promoviendo la ruptura de los polímeros a monómeros y la posterior oxidación de estos hasta ácido crotonico, el cual se cuantificó mediante espectrofotometría a 235 nm.

Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se realizó una prueba de ANOVA de un factor para determinar diferencias estadísticamente significativas y prueba de Tukey para comparación de medias entre pruebas.

Resultados y discusión

Se realizaron fermentaciones con *Pseudomonas putida* para evaluar su capacidad para producir PHA con diferentes sustratos, así mismo, se evaluaron dos metodologías para recuperar el polihidroxialcanoato de la biomasa celular. Tradicionalmente se ha utilizado al cloroformo como solvente principal, debido a su alta solubilidad con compuestos lipídicos, sin embargo, tiene la desventaja de ser un compuesto con alta toxicidad a la salud y al medio ambiente. Como alternativa se evaluó un solvente menos contaminante en este caso, el 1,2-propilencarbonato.

En la figura 1 se muestra el biopolímero resultante del proceso de extracción con el método de dispersiones de hipoclorito de sodio y cloroformo.

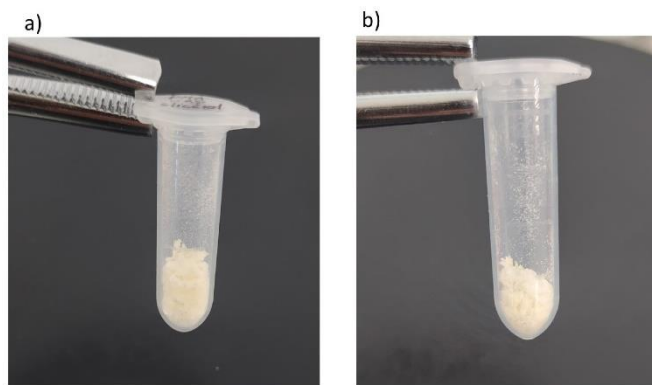


Figura 1. PHA obtenido del proceso de extracción después del proceso de secado. a) PHA obtenido a partir de glicerol 1%, b) PHA obtenido a partir de glucosa 1%. Fuente: elaboración propia.

La Tabla 1 muestra los resultados del comparativo entre los métodos de extracción usando glucosa 1% como fuente de carbono. La metodología que involucra el uso de hipoclorito de sodio como pretratamiento y solubilización con cloroformo mostró rendimientos más altos, con 1.83 g/L de PHA. Este método fue usado como referencia ya que históricamente ha sido el método más utilizado, aunque tiene como desventaja el uso de un solvente altamente tóxico.

El método de extracción con 1,2-propilencarbonato mostró una recuperación de PHA de 0.843 g/L lo cual lo hace un método menos competente en comparación con el cloroformo, dichos resultados se confirman con el análisis estadístico realizado (ANOVA) donde se confirma una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre ambos métodos de extracción evaluados. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y de forma gravimétrica después del proceso de evaporación del solvente.

Método evaluado	PHA recuperado (g/L)
Hipoclorito/cloroformo	1.83 ± 0.11
1,2-propilencarbonato	0.843 ± 0.038

Tabla 1. Comparativo entre métodos de extracción de PHA usando glucosa 1% (m/v) como sustrato. Fuente: elaboración propia.

En la figura 2 se muestran los resultados del comparativo entre el glicerol y los residuos de lactosuero en cuanto a su potencial para producir PHAs. Se tiene al glicerol como mejor alternativa produciendo 1.337 g/L y 1.275 g/L para glicerol al 1 y 2%.

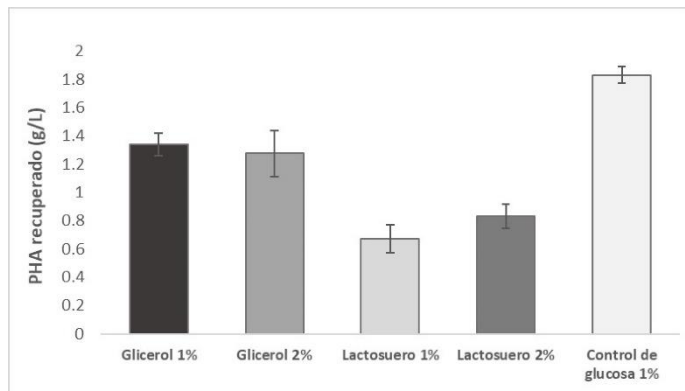


Figura 2. Rendimientos de PHAs obtenidos con glicerol y lactosuero. Fuente: elaboración propia.

El mejor resultado del glicerol al 1% podría ser explicado por la relación C/N que existe, ya que se ha reportado que relaciones C/N muy grandes reducen la producción de los PHAs (Márquez Romero, 2020) mientras que el lactosuero mostró rendimientos más bajos debido a que por su composición, está conformado principalmente por grasas y moléculas más difíciles de metabolizar.

Como es de esperar, el control de glucosa al 1% muestra un rendimiento más alto (1.83 g/L) que los residuos de glicerol y lactosuero, debido a que en la ruta metabólica la glucosa es convertida directamente

a piruvato y posteriormente a acetil-CoA, sin embargo, en este caso lo que se pretende es utilizar fuentes de carbono que provengan de residuos orgánicos con la finalidad de revalorizarlos.

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se determinó que existen diferencias significativas entre las diferentes fuentes de carbono evaluadas ($P < 0.05$). Además, se aplicó la prueba de Tukey para hacer comparaciones múltiples entre medias entre los diferentes sustratos y se encontró que no existen diferencias significativas entre glicerol 1% y 2%, así mismo no hay diferencias significativas entre lactosuero 1 y 2%, en los demás casos si hay diferencias significativas.

De acuerdo con los productos de metabolismo reportados en la literatura, se espera que el PHA obtenido sea polihidroxibutirato (PHB), para caracterizarlo, se identificó mediante espectrofotometría UV.

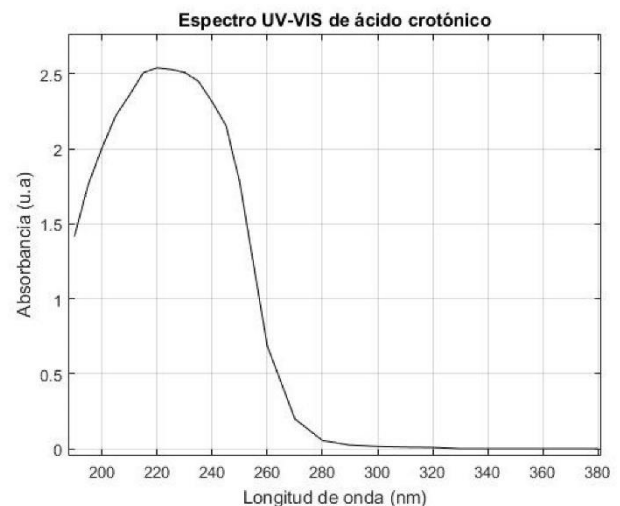


Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis para el ácido crotonico. Fuente: elaboración propia.

En la figura 3 se observa la presencia de un máximo de absorción consistente con el ácido crotonico. Como se mencionó en la metodología, el polihidroxibutirato se oxida hasta ácido crotonico, el cual presenta un pico de absorción alrededor de 235 nm (Rao et al., 2019).

Conclusiones

La presente investigación tuvo como objetivos: 1) evaluar dos diferentes métodos de extracción de PHAs a partir de bacterias de *P. putida* y 2) un comparativo entre diferentes fuentes de carbono (glicerol y lactosueros) con la finalidad de a futuro, revalorizar estos residuos orgánicos. Del primer objetivo se concluye que el método tradicionalmente usado con cloroformo sigue siendo el que genera mayores rendimientos de biopolímero, con la desventaja de la alta toxicidad de dicho solvente. Diversos autores han reportado el uso de compuestos orgánicos alternativos al cloroformo como es el uso de ácido acético como solvente, aunque con rendimientos menores. Se han reportado el uso de metodologías alternativas al cloroformo como es el uso de etilencarbonato y propilencarbonato, donde en conjunto con protocolos de incubación largos y tratamientos térmicos y de pH ha obtenido rendimientos cercanos a los obtenidos con el cloroformo. Otras metodologías alternativas utilizan cloruro de metileno así como metodologías enzimáticas con tripsina, bromelina, alcalasas en combinación con detergentes como el SDS (dodecilsulfato sódico) o uso de nuevas tecnologías como la extracción ultrasónica (Farfán, 2019; Pradhan et al., 2018).

Del segundo objetivo se concluye que el glicerol resulta una mejor fuente de carbono en comparación a los lactosueros, sin embargo, se podría evaluar a futuro el uso de diferentes proporciones entre ambos residuos con la finalidad de aprovechamiento.

Actualmente se están evaluando diferentes fuentes de carbono como glicerol crudo, glicerol residual del proceso de producción de biodiesel y residuos de lactosueros de la región con la finalidad de revalorizar estos residuos. Aun es necesario optimizar parámetros para obtener mayores rendimientos, así mismo se evaluarán otros métodos de digestión alternativos al hipoclorito de sodio como son el SDS y Tritón X-100. En el estado de Querétaro la producción de leche y queso, así como la industria vinícola entre otras, han mostrado un gran auge, sin embargo, los desechos generados requieren de un aprovechamiento por lo

que la producción de biopolímeros a partir de ellos puede ser una alternativa interesante.

Se agradece a CONACYT por el apoyo para la realización de este trabajo mediante el financiamiento del proyecto A1-S-43130 de la convocatoria de Ciencia básica.

Referencias

- Bedade, D. K., Edson, C. B., & Gross, R. A. (2021). Emergent Approaches to Efficient and Sustainable Polyhydroxyalkanoate Production. *Molecules*, 26(11), 3463. <https://doi.org/10.3390/molecules26113463>
- Etxabide, A., Kilmartin, P. A., Guerrero, P., de la Caba, K., Hooks, D., West, M., & Singh, T. (2022). Polyhydroxybutyrate (PHB) produced from red grape pomace: Effect of purification processes on structural, thermal and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 217(July), 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.072>
- Farfán, F. R. (2019). Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3- hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con *B. cepacia*. Andrés. *Tesis de Grado*.
- Kanavaki, I., Drakonaki, A., Geladas, E. D., Spyros, A., Xie, H., & Tsiotis, G. (2021). Polyhydroxyalkanoate (Pha) production in pseudomonas sp. phdv1 strain grown on phenol as carbon sources. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081636>
- Márquez Romero, A. (2020). *Influencia de las condiciones de operación (pH, temperatura, relación C/N/P) en la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de efluentes acidogénicos de biomasa lignocelulósica*. [Universidad de Cádiz, España]. <https://rodin.uca.es/xmlui/handle/10498/23761#.X8OcaIxcCNM.mendeley>
- Pradhan, S., Dikshit, P. K., & Moholkar, V. S. (2018). Production, ultrasonic extraction, and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator*. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(8), 2392–2400. <https://doi.org/10.1002/pat.4351>
- Rao, A., Haque, S., El-Enshasy, H. A., Singh, V., & Mishra, B. N. (2019). RSM–GA based optimization of bacterial PHA production and In Silico modulation of citrate synthase for enhancing PHA production. *Biomolecules*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biom9120872>
- Shah, S., & Kumar, A. (2021). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates from industrial waste using soil bacterial isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 715–726. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00452-z>

Trakunjae, C., Sudesh, K., Neoh, S., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Phornphimon, J., & Vaithanomsat. (2022). Biosynthesis of P (3HB- co -3HHx) Copolymers by a Newly Engineered Strain of *Cupriavidus necator*. *Polymers*, 14(4074).

Wongmoon, C., & Naphorn, S. C. (2022). Optimization for the efficient recovery of poly(3-hydroxybutyrate) using the green solvent 1,3-dioxolane. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(December), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1086636>