



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Estudio del potencial de la temperatura en la
mejora de cepas de metanótrofos para la
bioconversión de biogás a biopolímeros**

Autor:

González Rodríguez, Cristina

Tutor:

Muñoz Torre, Raúl

Cotutor:

Bordel Velasco, Sergio

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente
Valladolid, Julio 2019



Universidad de Valladolid

RESUMEN



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESUMEN

El estudio aquí planteado tuvo como objetivo elucidar las mejores condiciones de temperatura para el metanótrofo *Methylocystis Parvus*, para mejorar tanto la adaptación a la temperatura como la acumulación del biopolímero PHA de este microorganismo. Se realizaron experimentos a distintas temperaturas (30,33,35,36,37 °C) utilizando metano como única fuente de carbono y energía. Se caracterizaron las velocidades de crecimiento específicas, los ratios de consumo O_2/CH_4 y las velocidades de producción de CO_2 por unidad de biomasa total. Este estudio permitió determinar que la temperatura óptima de crecimiento del metanótrofo *M. Parvus* es 35 °C. También se caracterizó la acumulación de PHA a dos temperaturas (30 y 35 °C). Como resultado no se obtuvo acumulación de PHA en el experimento a 35 °C y en el experimento de 30 °C se obtuvo una menor acumulación de PHA de la esperada (19.08%), aunque las razones de esta baja fracción aún están por ser esclarecidas.

PALABRAS CLAVE: Biopolímero, Metano, Metanótrofo, PHA, Temperatura.



ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate the best temperature conditions for the methanotroph *Methylocystis Parvus*, to improve both the adaptation to temperature and the accumulation of the PHA biopolymer in this microorganism. Experiments were carried out at different temperatures (30,33,35,36,37 °C) using methane as the sole source of carbon and energy. The specific growth rates, the O₂/CH₄ consumption ratios and the production speeds of CO₂ per unit of total biomass were characterized. This study allowed us to determine what optimum growth temperature of the *M. Parvus* methanotroph is 35 °C. The accumulation of PHA at two temperatures (30 and 35 °C) was also characterized. As a result, no accumulation of PHA was obtained in the experiment at 35 °C and in the experiment at 30 °C, a lower accumulation of PHA than expected was obtained (19.08%), although the reasons for this low fraction are still to be clarified.

KEY WORDS: Biopolymer, Methane, Methanotroph, PHA, Temperature



RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 PROBLEMÁTICA CONTAMINACIÓN DE PLÁSTICOS	9
1.2 BIOPLÁSTICOS.	13
1.3 PROBLEMÁTICA DEL METANO	17
1.4 PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) A PARTIR DE METANO	19
1.5 ADAPTACIÓN DE CEPAS	25
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 MEDIO MINERAL SALINO (NMS)	33
3.2 INÓCULO	34
3.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA BIODEGRADACIÓN DEL METANO.	35
3.4 TRATAMIENTO DE DATOS	36
3.4.1 ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.	36
3.4.2 ESTUDIO DEL RATIO MOLAR DE CONSUMO OXÍGENO-METANO	38
3.4.3 ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE MOLES DE CO ₂ POR UNIDAD DE BIOMASA TOTAL	39
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	40
3.5.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CH ₄ Y CO ₂	40
3.5.2 ANÁLISIS DE PHB	41
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1 EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES A DISTINTAS TEMPERATURAS DURANTE LA FASE DE CRECIMIENTO	45
4.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	49
4.3 RATIO DE CONSUMO MOLAR OXÍGENO-METANO	50
4.4 FASE DE ACUMULACIÓN DE PHBs	51
4.4.1 EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS COMPUESTOS EN LA FASE DE ACUMULACIÓN DE PHBs	51



ÍNDICE



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Universidad de Valladolid

4.4.2	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE MOLES DE CO ₂ POR UNIDAD DE BIOMASA TOTAL.	53
4.4.3	RATIO DE CONSUMO MOLAR DE OXÍGENO-METANO PARA MEDIO SIN NITRÓGENO	54
4.4.4	ACUMULACIÓN DE PHBS	55
5	CONCLUSIONES	59
6	BIBLIOGRAFÍA	63
7	ANEXOS	69
7.1	ANEXO I. CURVAS DE CALIBRACIÓN CROMATÓGRAFO DE GASES	69
7.2	ANEXO II. PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE PHBS	74



INTRODUCCIÓN



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática contaminación de plásticos

Dos de los problemas ambientales globales de mayor relevancia en la actualidad son el cambio climático y la contaminación por plásticos derivados del petróleo. En este sentido, se están llevando a cabo estrategias industriales para eliminar gases de efecto invernadero tóxicos y para el uso de materiales plásticos sin comprometer ni a la economía ni al medio ambiente.(Pérez et al., 2019)

Desde los años 50, la producción de plásticos ha aumentado dramáticamente superando a la de otros materiales. Se estima que entre 4.8 y 12.7 millones de toneladas de residuos plásticos se vierten al océano cada año. Estos plásticos no solo afectan negativamente a los ecosistemas acuáticos, sino que también afectan a las sociedades y sus economías. Se ha estimado que el impacto negativo total en los océanos es de al menos 8\$ mil millones por año (Pérez et al., 2019), (Roadmap, 2018),(Löhr et al., 2017). Si la tendencia actual de un aumento de producción del 5% por año continúa, para el año 2050 se habrán acumulado 33 billones de toneladas adicionales de plástico en todo el mundo.(Rochman et al., 2013)

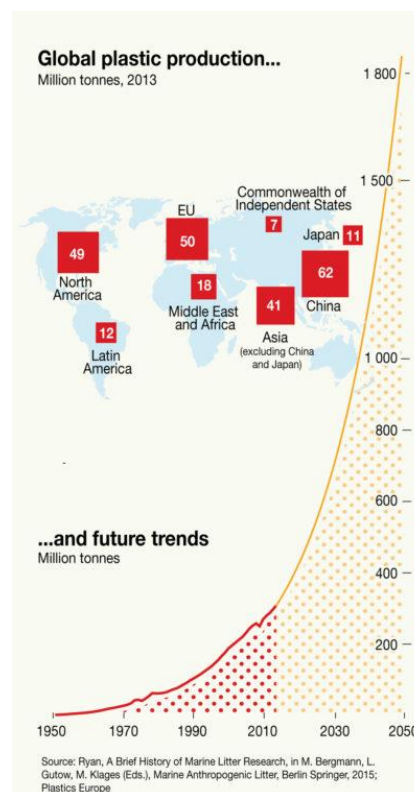


Figura 3.4.1-1 Producción global de plásticos

Por un lado, China sigue siendo el principal productor de plásticos con un 29% del total en 2016, seguido de Europa (19%) y América del Norte (18%). Dada la elevada producción de plástico de China, en Asia se produce el 50% del plástico del mundo en la actualidad. En Europa, la producción de plástico alcanzó los 60 millones de toneladas en 2016. Dentro de Europa, más de dos tercios de la demanda de plásticos se concentra en cinco países: Alemania (24,5%), Italia (14,2%), Francia (9,6%), España (7,7%) y Reino Unido (7,5%). España es el cuarto país de la Unión Europea con mayor demanda de plásticos, donde hasta el 50% de los mismos acabaron en vertederos en 2016. En 2017, la producción global de plástico se estimó en 348 millones de toneladas, y la Unión Europea (UE) contribuyó con alrededor de 64,4 millones de toneladas, un 3,4% más que en 2016. La mayor parte de los plásticos se emplean en la fabricación de envases, es decir, en productos de un solo uso. En concreto en Europa la demanda de plásticos para envases fue del 39.9% en 2016. Posteriormente serán estos envases los objetos de plástico que encontremos con más frecuencia en el medio ambiente, dañando los ecosistemas marinos (Greenpeace, s. f.) (Committee on the Environment, s. f.)

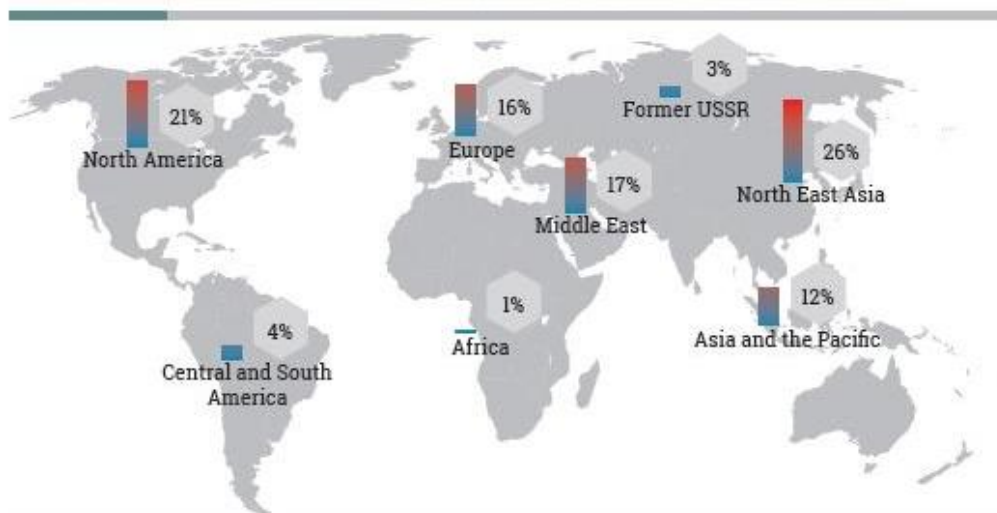


Figura 3.4.1-2 Distribución por región de plásticos de un solo uso (2014) (Roadmap, 2018)

En octubre de 2018, el Parlamento Europeo aprobó una prohibición de los plásticos de un solo uso. Se espera que estas medidas entren en vigor en 2021. (BBC, s. f.) La iniciativa, propuesta por el eurodiputado Frédérique Ries, recibió un apoyo abrumador en el Parlamento Europeo: 571 a 53. El plan prevé la prohibición de artículos de plástico de un solo uso para 2021 donde ya existe una alternativa, por ejemplo, platos de plástico, cubiertos. Los artículos de plástico de un solo uso donde no existen alternativas actualmente deben reducir su consumo en un 25% en los Estados Unidos para 2025.

En Corea del Sur, el 4 de septiembre de 2018, el Ministerio de Medio Ambiente anunció una iniciativa para reducir el desperdicio de las tiendas a 0% para 2027. El gobierno está alentando a las empresas y personas a participar en lo que se denomina "reciclado": la decisión de no usar productos de desperdicio, como pajitas de plástico y vasos de un solo uso. Varias empresas, incluidas las principales cadenas internacionales de café, ya están probando iniciativas para reducir el desperdicio de esta iniciativa.(ABC News, s. f.)

A nivel mundial existe una crisis de contaminación plástica debido al uso masivo de productos plásticos y la mala gestión de la eliminación de residuos. A modo de ejemplo, solamente el 9% de los nueve billones de plásticos se han reciclado, un 12% se ha incinerado y el 79% ha acabado en vertederos o en el medio ambiente (Agencia EFE, s. f.). Los principales objetos de las prohibiciones del uso de plásticos son las bolsas de plástico y la espuma de poliestireno ya que causan graves problemas medioambientales dañando tanto la vida silvestre como el propio ecosistema. Unos ejemplos de ello son el bloqueo de vías fluviales, la proliferación de insectos portadores de enfermedades patógenas en estos desechos. Se pueden ver descritos los diferentes impactos en la Figura 3.4.1-3. También se ha de tener en cuenta el efecto tóxico y cancerígeno de algunos polímeros.(Lessmann et al., 2014)



Figura 3.4.1-3 Impactos de los plásticos de un solo uso (PNUMA, 2016)

Por todo lo anteriormente descrito es importante tener en cuenta ciertas acciones y de este modo minimizar el uso (y por ende la producción) de los plásticos de un solo uso. Algunas de estas acciones se ven recogidas en la Figura 3.4.1-4.



Figura 3.4.1-4 Acciones para minimizar el uso de plásticos de un solo uso(PNUMA, 2016)



1.2 Bioplásticos.

La situación actual en lo relativo a la contaminación por plásticos, ha fomentado una intensa investigación para encontrar y producir plásticos o biopolímeros biodegradables y no tóxicos.

Los bioplásticos son polímeros capaces de descomponerse en CO₂, H₂O y compuestos inorgánicos o biomasa, predominantemente, por la acción enzimática de microorganismos. El mercado para estos materiales ambientalmente respetuosos se está expandiendo rápidamente con una tasa de crecimiento del 10-20% por año. El mercado global para polímeros biodegradables se espera que aumente a una tasa de crecimiento anual promedio de 12.6% a 206 millones de libras para el año 2020 (Kumar y Thakur, 2017).

Para que un polímero se clasifique como bioplástico se deben cumplir los cuatro criterios siguientes:

- Características químicas: al menos el 50% de su composición final debe de ser necesariamente materia orgánica.
- Biodegradación: el polímero desarrollado debe degradarse en un mínimo del 90% de su peso/volumen dentro de los 6 meses en condiciones de compostaje estimulado.
- Ecotoxicidad: los residuos no biodegradables del biopolímero después de la biodegradación durante 6 meses no deben ser una potencial amenaza para el crecimiento de las plantas.
- Desintegración: el polímero de base biológica debe, al menos en un plazo de 2 meses, fragmentarse en componentes microscópicos no detectables (<2mm) en condiciones de compostaje controladas.

Se han propuesto varios sistemas de clasificación basados en diferentes criterios para clasificar estos biopolímeros, ya que pueden derivarse de un gran número de fuentes renovables y es difícil restringirlos en una sola clase. Sin embargo, un sistema de clasificación basado en su origen (Figura 3.4.1-1) divide estos biopolímeros en cuatro categorías principales, de las cuales las tres primeras se derivan de recursos renovables y la última es una mezcla de biopolímeros y poliésteres comerciales. En términos generales, estos biopolímeros pueden subdividirse en dos categorías amplias, agropolímeros (categoría 1) y poliésteres biodegradables (categorías 2-4) o biopoliésteres (Kumar y Thakur, 2017).

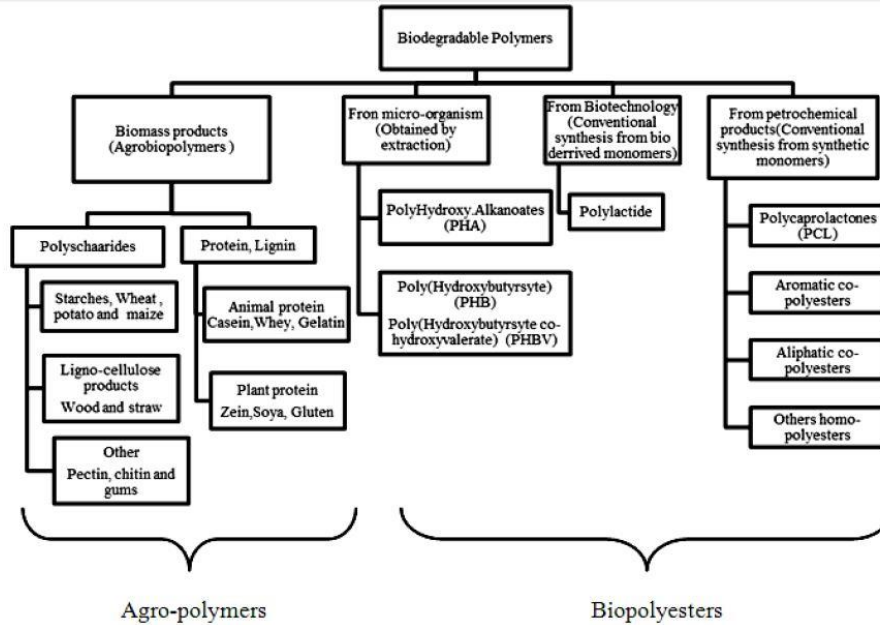


Figura 3.4.1-1 Clasificación de los polímero biodegradables (Kumar y Thakur, 2017)

AGROPOLÍMEROS:

- Bioplásticos basados en polisacáridos: el almidón es un material natural abundante compuesto de dos tipos de polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina. Los biopolímeros desarrollados a partir del almidón tienen muchas ventajas, como una mayor biodegradabilidad, capacidad de renovación y buenas propiedades de barrera al oxígeno, lo que los convierte en la alternativa más adecuada para algunas aplicaciones comerciales con las ventajas anteriores como requisitos principales de un paquete. El almidón nativo se presenta como un heteropolímero en la naturaleza y se usa en diferentes formas para mezclarlo con polímeros convencionales para la producción de biopolímeros. (Kumar y Thakur, 2017)
- Bioplásticos derivados de proteínas: Las propiedades funcionales de estos materiales dependen en gran medida de la heterogeneidad estructural, la sensibilidad térmica y el comportamiento hidrófilo de las moléculas de proteína. Se puede utilizar una gran cantidad de proteínas de origen vegetal y animal como materia prima para desarrollar materiales bioplásticos. El gluten de trigo, un subproducto de la industria del bioetanol, es relativamente económico y está disponible en abundancia. Esta materia prima es de naturaleza termoplástica y se ha utilizado para hacer películas y biocomposites basados en fibra natural y nanocompuestos reforzados con propiedades mecánicas y de barrera mejoradas adecuadas para muchas aplicaciones de envasado de alimentos. Los biopolímeros a base de gluten de trigo reforzados con arcilla y nanocompuestos se han desarrollado con propiedades de barrera al oxígeno mejoradas que son adecuadas para el envasado (Kumar y Thakur, 2017)



Los esfuerzos de la biotecnología y las industrias agrícolas para reemplazar los plásticos convencionales con alternativas derivadas de las plantas tienen tres enfoques: (a) convertir los azúcares de las plantas en plástico, (b) producir plástico dentro de los microorganismos y (c) producir plástico a partir del maíz y otros cultivos.

- Ácido poliláctico (PLA): entre la amplia gama de polímeros biodegradables, el PLA y el poliéster alifático, comúnmente hecho de ácidos hidroxílicos, que incluye el ácido poliglicólico (PGA), que puede modificarse fácilmente mediante polimerización, es el biopolímero más prometedor que tiene la mayor participación de mercado. El ácido poliláctico (PLA) se comporta de manera bastante similar a las poliolefinas y se puede convertir en plástico mediante métodos de procesamiento estándar como el moldeo por inyección y la extrusión. Actualmente, el principal obstáculo en la producción comercial de bioplásticos basados en PLA es el alto precio de la materia prima y la falta de una infraestructura de compostaje en los mercados, que es un requisito previo esencial para el uso comercial de PLA.
- Bioplásticos de origen microbiano. Los microorganismos, tienen el potencial de producir bioplásticos que tienen propiedades comparables con los polímeros convencionales que pueden alterarse aún más al cambiar el medio de crecimiento y las condiciones de crecimiento de las bacterias. Actualmente, los bioplásticos de origen microbiano, son más caros que sus homólogos anteriores. Un gran número de biopolímeros desarrollados han ganado aceptabilidad en el sector de envasado de alimentos y otras aplicaciones industriales. Uno de tales plásticos sintetizados microbiológicamente es el polihidroxicanoato, conocido comúnmente como (PHA), que se sintetiza a partir de diferentes grupos de bacterias usando sustratos renovables baratos y se degrada aeróbicamente y de forma completa a CO₂ y H₂O mediante la acción de los microorganismos.
 - Desarrollo a partir de recursos renovables.

Los polihidroxicanoatos (PHAs), como por ejemplo poli-3-hidroxi-butaratos (PHBs), son biopolímeros biológicos sintetizados bajo condiciones de limitación de nutrientes y exceso de carbono por una larga variedad de microorganismos que los utilizan como recursos de almacenamiento de carbono y/o energía (Castilho et al., 2009). Sus excelentes propiedades mecánicas, similares a las del polipropileno y polietileno, junto con su biodegradabilidad y biocompatibilidad, hacen de los PHAs un potencial sustituto a los plásticos derivados del petróleo (Chen et al., 2015; Strong et al., 2016). Como resultado, los PHAs son actualmente producidos

industrialmente por cerca de treinta corporaciones, Meredian Inc. (con una producción anual de 300 kt) y Bio-On (con una producción anual de aproximadamente 10 kt) siendo los fabricantes líderes en U.S. y Europa, respectivamente (Chen et al., 2015)

La selección de la fuente de carbono determina el rendimiento global de la fermentación bacteriana y el costo del producto final. Existe una gran variedad de fuentes de carbono potencialmente empleables para producir PHAs. En la siguiente tabla se recogen estas, junto con las respectivas cepas capaces de producir PHAs

Tabla 1-1 Fuentes de Carbono para PHAs (Jiang et al., 2016)

Fuente de Carbono	Glucosa	Sacarosa	Xilosa	Glicerol	Metanol	N-Octano	Metano
Cepa	<i>R. eutropha</i>	<i>A. latus</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>M. organophilum</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>Methylotroph spp.</i>
Contenido PHA (%)	73.8	50	60	31.4	52	32.6	51
Tipo PHA	P3HB	P3HB	P3HB	P3HB	P3HB	mcl-PHA	P3HB
Productividad (g · L ⁻¹ · h ⁻¹)	2.42	3.97	-	0.6-1.5	1.8-2.0	0.25	0.031
Rendimiento (g PHA/ g Sustrato)	0.32-0.48	0.4	0.11	0.062	0.19	-	0.55

La glucosa y la fructosa son las materias primas más comunes usadas para la producción comercial de PHAs. Sin embargo, el alto precio de estas fuentes de carbono, que representa el 30-40% de los costes totales de producción, todavía dificulta la comercialización de PHA debido a su precio de mercado no competitivo (4-20 € Kg PHA⁻¹) (Khosravi-Darani et al., 2013). Además, las anteriores fuentes de carbono compiten con la producción de alimentos. En este contexto, la utilización de metano como materia prima para la producción mundial de PHAs reduce considerablemente los costes de producción a la vez que mitiga el cambio climático (García-Pérez et al., 2018).

1.3 Problemática del metano

En los últimos dos siglos, la combustión de combustibles fósiles como el petróleo, el gas natural y el carbón, la deforestación, los cambios en el uso de la tierra y otras actividades antropogénicas han contribuido a un aumento significativo en la concentración atmosférica de gases de efecto invernadero (GEI), como metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) y nitrógeno óxido (N_2O) (Kalia, 2019), (AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014 – IPCC, s. f.).

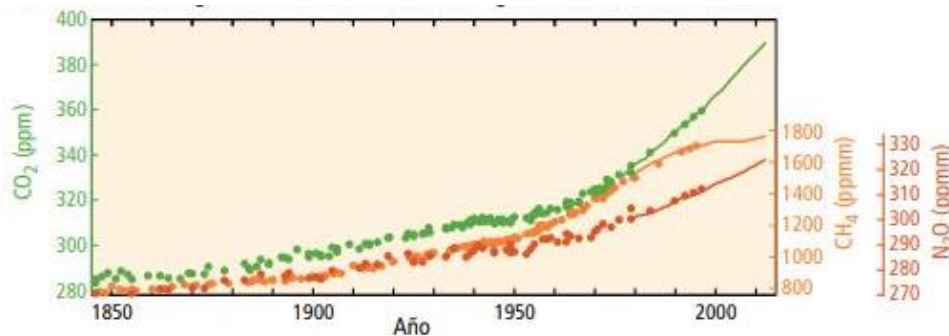


Figura 3.4.1-1 Promedio global de concentraciones de gases de efecto invernadero (AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014 – IPCC, s. f.)

Las emisiones antropogénicas totales de gases de efecto invernadero aumentaron en $2.2\% \text{ año}^{-1}$ en el período 2000–2010 en comparación con las tasas registradas en el período 1970–2000 ($1.3\% \text{ año}^{-1}$). Por lo tanto, a pesar del creciente número de políticas de mitigación del cambio climático implementadas en todo el mundo, las emisiones totales de GEI alcanzaron un máximo de $49 \text{ Gt CO}_2\text{-eq año}^{-1}$ en 2010 (AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014 – IPCC, s. f.). Como resultado de este aumento en las emisiones de GEI, la temperatura promedio de la Tierra ha aumentado gradualmente a tasas nunca reportadas en los últimos 50 años. De hecho, la temperatura global promedio en las áreas de superficie terrestre oceánica tuvo un aumento de $0,94 \text{ °C}$ en 2016.

El metano es el segundo GEI más importante dentro del inventario global de GEI. Contribuye a aproximadamente el 14% de las emisiones anuales mundiales (en un horizonte de 100 años) y su concentración atmosférica ha aumentado en aproximadamente un 160% en los últimos 250 años (AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014 – IPCC, s. f.), (Kalia, 2019).

Sin embargo, los valores más altos de potencial de calentamiento global (GWP) para CH_4 estimados en horizontes de 10 y 20 años (90 y 72, respectivamente) demuestran que compuestos modificadores del clima a corto plazo como el CH_4 podrían tener contribuciones al cambio climático comparables a las del CO_2 para horizontes de corto plazo (AR5 Climate Change 2013: The Physical Science Basis – IPCC, s. f.)

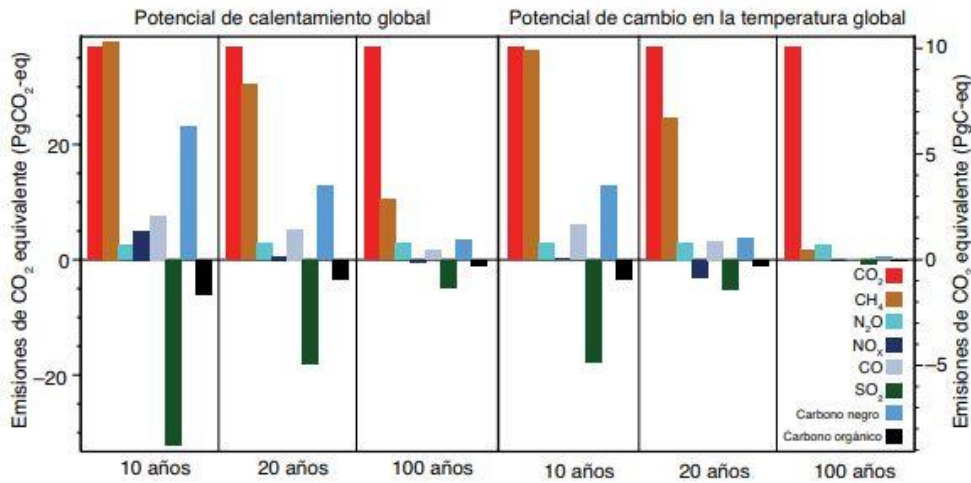


Figura 3.4.1-2 Potencial de calentamiento global y Potencial de cambio en la temperatura global (AR5 Climate Change 2013: The Physical Science Basis – IPCC, s. f.)

Las emisiones antropogénicas de CH₄ en 2015 representaron 464 y 650 Mt CO₂-eq en la UE-28 y EE. UU., respectivamente, con la ganadería (45%), el tratamiento anaerobio de desechos (18%), la extracción de carbón (6%), el manejo de gas natural (5%) y el tratamiento y descarga de aguas residuales (4%) como los principales contribuyentes (Kalia, 2019).

Además, a pesar del potencial de generación de calor y electricidad del biogás (40 - 70% (v/v) CH₄) producido a partir de la digestión anaerobia de lodos en las EDAR, la proporción de biogás utilizada para este fin se ha estimado en menos del 1% en los EE.UU., normalmente este biogás se quema o se ventila a la atmósfera sin ningún tratamiento. Este hecho se ha atribuido a (i) la presencia de compuestos indeseables (por ejemplo, siloxanos, H₂S, halocarburos) dentro del biogás, (ii) los altos costos de inversión necesarios para la recuperación de energía en la planta o (iii) los altos costos asociados a la producción de biometano (1.08 € m⁻³ en el mercado de la UE en comparación con 0.30 - 0.67 € m⁻³ para gas natural) (Muñoz et al., 2013),(Kalia, 2019).

Como consecuencia, las biotecnologías de tratamiento de CH₄ pueden convertirse, una vez que estén diseñadas y operadas adecuadamente, en alternativas de bajo costo y respetuosas con el medio ambiente en comparación con las alternativas físicas/químicas. En particular, las biotecnologías de reducción de CH₄, que se basan en la oxidación catalítica llevada a cabo por bacterias oxidantes de metano (es decir, metanótrofos), están ganando aún más atracción en los últimos 10 años debido a la posibilidad de crear un valor adicional a partir de la mitigación de CH₄ cuando se acoplan a la producción de productos de alto valor añadido u otros procesos



de tratamiento de la contaminación como la desnitrificación. Por lo tanto, la bioconversión de este recurso masivo (se estima que el potencial de producción de CH₄ renovable en el mundo es de 658 Mt de CH₄ (Kristof Verbeeck (UGent), 2019)) por parte de los metanótrofos en instalaciones industriales como las EDAR o en vertederos implicaría no solo el secuestro de emisiones de GEI, sino también los posibles ahorros en los costos de materia prima y el desarrollo de una biorrefinería de GEI sostenible (Kalia, 2019).

1.4 Producción de Polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de metano

La producción de Polihidroxialcanoatos (PHAs) es llevada a cabo con la ayuda de un determinado grupo de microorganismos denominados metanotrófos, capaces de usar el CH₄ como fuente de carbono y energía.

Los metanótrofos generalmente se dividen en tres grupos según sus características fisiológicas y morfológicas (Karthikeyan et al., 2015), (López et al., 2013):

- Tipo I (γ -*Pro bacteria*): como ruta metabólica, para la asimilación de carbono, siguen la ruta monofosfato de ribulosa (RuMP), en la que el formaldehído se condensa con monofosfato de ribulosa para crear un fosfato de hexulosa, que a su vez se convierte en fructosa-6-fosfato. En este grupo los más comunes son *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosarcina* o *Methylococcus*
- Tipo II (α -*Pro bacteria*): utilizan el ciclo de la serina para la asimilación de formaldehído. En este ciclo, el metano se convierte en metanoato, que a su vez se convierte en metilentetrahidrofolato (5,10-CH₂-THF). El metilentetrahidrofolato se condensa con glicina para generar serina. El grupo de bacterias más representativo de género son *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* y *Methylocapsa*.
- Tipo X: es considerado como un subconjunto del tipo I, presenta características comunes con los dos grupos anteriores de metanótrofos, sigue tanto la ruta RuMP como la ruta de la serina.

La oxidación del metano a metanol representa el primer paso del conjunto de reacciones. El formaldehído y el ácido fórmico son intermediarios metabólicos que se forman, y que terminan con la producción de CO₂ (López et al., 2013). Se debe enfatizar que el formaldehído puede convertirse en ácido fórmico o usarse como precursor para la síntesis de nuevo material celular a través de la vía serina en metanótrofos tipo II, ya que la mayoría de los estudios realizados sobre la producción de PHAs se han realizado utilizando este tipo de microorganismos (Kalia, 2019).



La oxidación del metano se puede llevar a cabo por diferentes mecanismos en función del tipo de organismo metanótrofo. En este proceso el metano se oxida inicialmente a metanol, para lo que se consume una molécula de oxígeno. En este paso se requiere un cofactor redox que lleva dos electrones, que se transfieren al segundo átomo de oxígeno para producir una molécula de agua. No existe un acuerdo general sobre la identidad de este factor redox, por ello se han propuesto tres mecanismos alternativos (Kalyuzhnaya et al., 2015).

En el caso del mecanismo “redox arm” se considera que el cofactor redox es ubiquinol-8 (Q_8H_2), que se restaura a su estado inicial reducido con el consumo de NADH en el complejo I de la cadena respiratoria. El mecanismo de “direct coupling” supone que el cofactor involucrado en la oxidación del metano es el citocromo-c, que se reduce durante la oxidación del metanol a formaldehído por la enzima metanol deshidrogenasa (MeDH). Por último, un tercer mecanismo consiste en la reducción de la ubiquinona por el citocromo-c en el llamado mecanismo “ uphill electron transfer” (Bordel et al., 2019b).

La oxidación del metano en metanótrofos de tipo II se lleva a cabo mediante el mecanismo denominado “redox arm”, que parece ser una característica general de este tipo de microorganismos. En cambio, se ha descubierto que los metanótrofos tipo I se basan en el mecanismo “direct coupling” al comparar su relación experimental de consumo de oxígeno y metano con las simulaciones de diferentes mecanismos utilizando Genome Scale Metabolic Models (GSMM) (Bordel et al., 2019a).

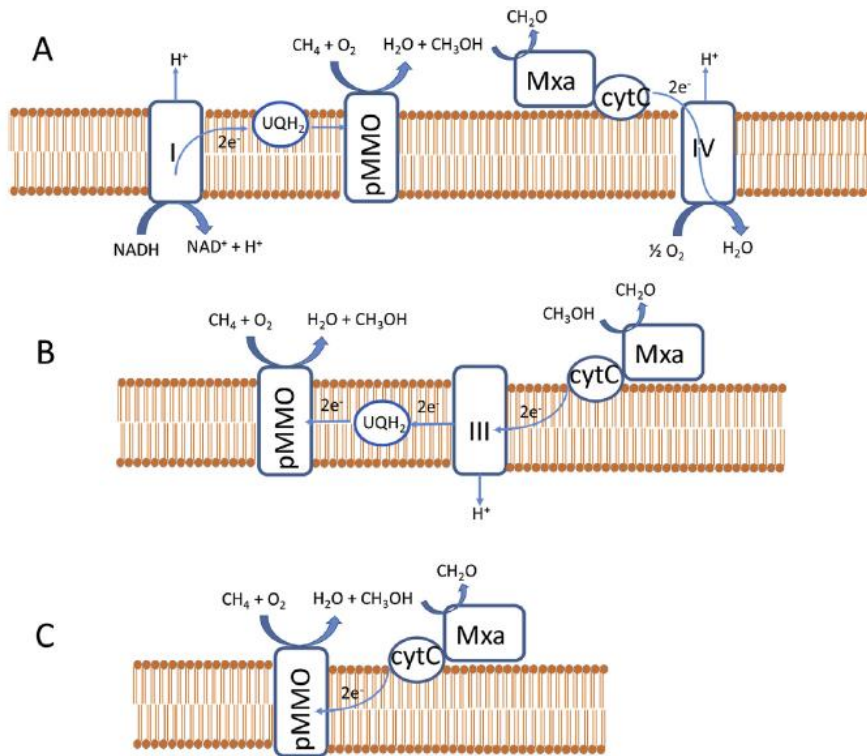


Figura 3.4.1-1 Representación esquemática de los tres posibles mecanismos de oxidación del metano: a) redox arm, b) uphill electron transfer, c) direct coupling. " (Bordel et al., 2019a)

Un factor importante en los estudios realizados es el ratio de consumo de oxígeno en la degradación de metano. Este difiere en función de los mecanismos previamente explicados. En la Figura 3.4.1-2 se pueden observar estas diferencias.

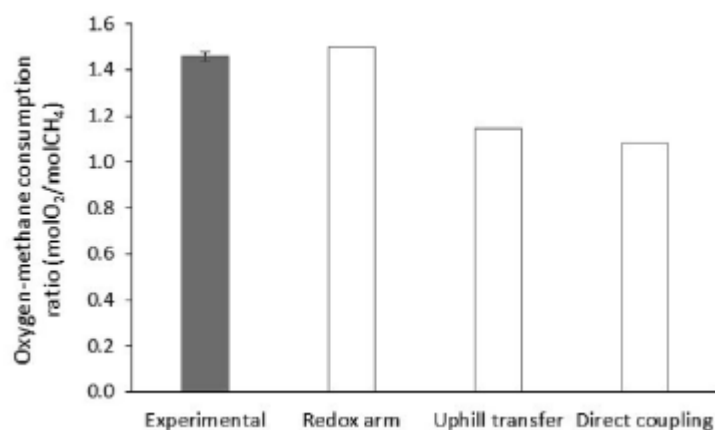


Figura 3.4.1-2 Ratios de consumo de oxígeno-metano experimental y teórico para los mecanismos "redox arm", "uphill electron transfer" y "direct coupling". La barra gris representa las mediciones experimentales con barras de error correspondientes a la desviación estándar de las mediciones. (Bordel et al., 2019a)

La relación molar teórica de consumo de oxígeno-metano del microorganismo estudiado (*Methylocystis parvus*) corresponde con un valor de 1.5 mol O₂/mol CH₄, (Allison J. Pieja et al., 2011).

El poli-3-hidroxi-butirato (PHB), que es sintetizado por *Methylocystis Parvus*, se utiliza en la producción de polímeros biodegradables similar al propileno en términos de propiedades mecánicas. La producción de este biopolímero a escala industrial implica una producción inicial de biomasa en condiciones de nutrientes suficientes, seguida de un paso de acumulación de PHB en condiciones limitantes de nitrógeno (Handrick et al., 2000). El rendimiento del primer paso se regirá por la tasa de crecimiento específica y la tasa de consumo de metano de la cepa seleccionada, mientras que la acumulación de PHB se determinará por la capacidad metabólica de la cepa y se debe llevar a cabo en condiciones operativas para evitar el consumo de PHB por parte de las células. En este punto, debe tenerse en cuenta que muchos organismos utilizan el PHB como una forma de almacenar carbono y poder reductor (Handrick et al., 2000), y se usa como un sustrato interno para la supervivencia celular y proliferación bajo escenarios de limitación de carbono externo y fuente de energía (Bordel et al., 2019b).

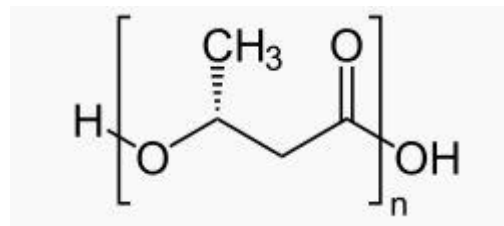


Figura 3.4.1-3 Fórmula del Polihidroxi-butirato

En el proceso de la degradación de PHB, el primer paso es la degradación del poli-3-hidroxi-butirato a L-eritro-3-metilmalil-CoA, que se disocia en glioxilato y propionil-CoA (por la enzima malil-CoA liasa, que también descompone malil-CoA en glioxilato y acetil-CoA en el ciclo de la serina). El glioxilato originado a partir de L-eritro-3-metilmalil-CoA se incorpora al ciclo de la serina, mientras que el propionil-CoA se carboxila en succinil-CoA y, por lo tanto, se incorpora al ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) (Figura 3.4.1-4). Por lo tanto, la degradación de PHB desempeña un papel anaplerótico al suministrar glioxilato al ciclo de serina y succinil-CoA al ciclo de TCA, lo que permite utilizar intermediarios de ambos ciclos (como la serina del ciclo de la serina o α -cetoglutarato del ciclo de TCA) como precursores anabólicos para hacer crecer biomasa. En ausencia de suministro externo de intermediarios metabólicos, el ciclo de la serina solo podría producir acetil-CoA y el ciclo de TCA consumiría

este acetil-CoA que conduce a la producción de NADH, lo que resultaría en la producción de energía, pero no en el crecimiento celular. Para lo cual son necesarios precursores. Por lo tanto, el suministro de intermediarios metabólicos al ciclo de la serina y/o el ciclo de TCA es necesario para el crecimiento celular.

Durante el crecimiento en metano como única fuente de carbono y energía, esta función anaplerótica se desempeña principalmente por la actividad de la glicina sintasa, que carboxila el 5-10-metilentetrahidrofolato de metileno (con un consumo concomitante de NADH y amonio) para producir glicina. Esta glicina se incorpora al ciclo de la serina, lo que permite la extracción de la serina con fines biosintéticos.

En este punto, se debe enfatizar que la enzima Malil-CoA liasa cataliza tanto la lisis de malil-CoA en el ciclo de la serina como la lisis de L-eritro-3-metilmalil-CoA, cuya tasa es igual a la tasa de degradación de PHB. (Bordel et al., 2019b)

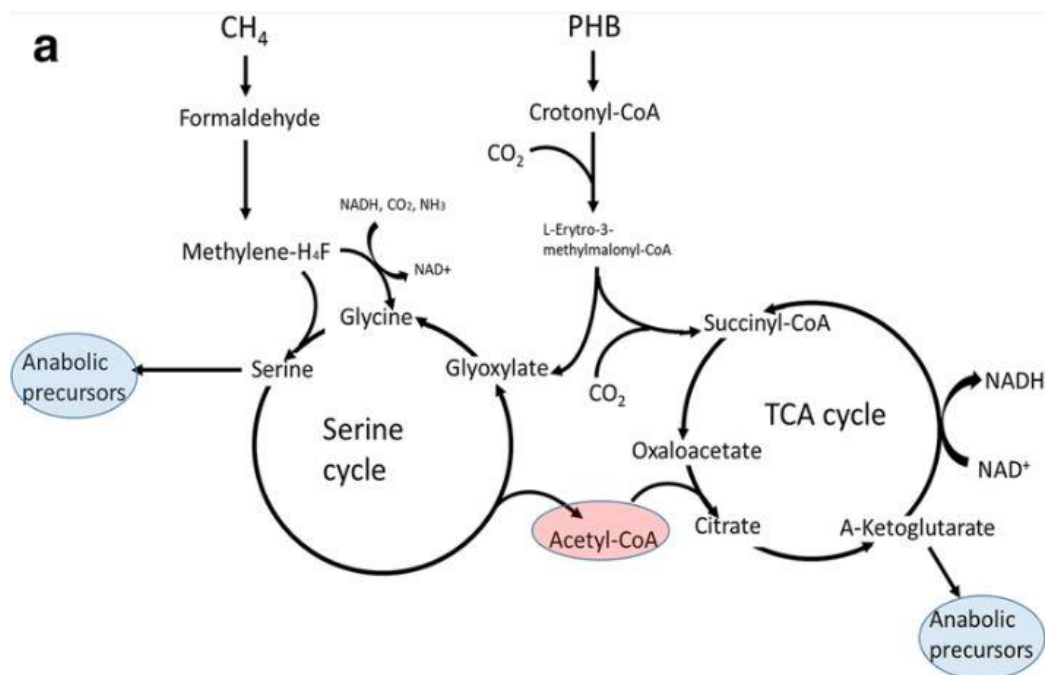


Figura 3.4.1-4 Representación esquemática de los procesos metabólicos activos durante la biodegradación de PHB y el co-consumo de metano (Bordel et al., 2019b)

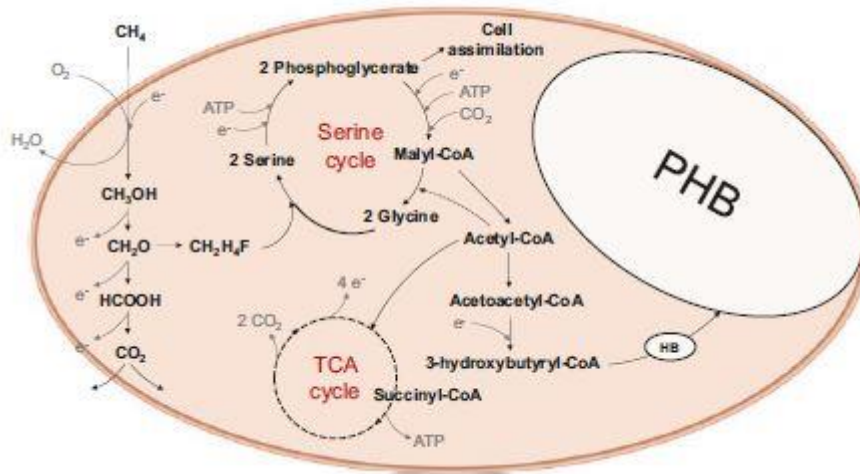


Figura 3.4.1-5 Ruta para la producción de PHB en metanótrofos Tipo II (Kalia, 2019)

Se ha demostrado que dentro del género metanótrofos α -proteobacterianos el microorganismo *Methylocystis parvus* se caracteriza por una tasa de crecimiento específica más alta que otras especies del género *Methylocystis* (como *Methylocystis hirsuta* o *Methylocystis* sp.SC2) y que, en condiciones limitantes de nitrógeno, es capaz de acumular poli-3-hidroxibutirato (PHB) hasta el 50% de su biomasa seca (García-Pérez et al., 2018) (Allison J Pieja et al., 2011). Cuando se dispone de fuentes de metano y nitrógeno consume simultáneamente PHB y metano, al tiempo que reduce significativamente su tiempo de división celular, lo que proporciona una ventaja competitiva a las células con PHB almacenado.(Allison J Pieja et al., 2011)

Tabla 1-2 Tasas de crecimiento específica en función del microorganismo

Microorganismo	<i>Methylocystis parvus</i>	<i>Methylocystis sp.SC2</i>	<i>Methylocystis hirsuta</i>
Tasa de crecimiento específica (h ⁻¹)	0.107 (Allison J Pieja et al., 2011)	0.074 (Baani y Liesack, 2008)	0.048 (Bordel et al., 2019a)



1.5 Adaptación de cepas

La fermentación microbiana de materias primas derivadas de biomasa representa una solución atractiva para la producción de combustibles líquidos sostenibles para el transporte u otros compuestos precursores en industria química (Caspeta et al., 2014b). La producción de etanol o biocombustibles avanzados se beneficia enormemente de las fermentaciones a altas temperaturas (≥ 40 °C), porque reduce los costes de enfriamiento y ayuda a prevenir la contaminación (Caspeta et al., 2014b; Eggleston, 2012). La alta temperatura de operación también permite una hidrólisis más eficiente de la materia prima, lo que conduce a mejores productividades en la sacarificación y fermentación simultáneas (Abdel-Banat et al., 2010; Caspeta et al., 2014a).

Un estudio realizado por el departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente de la universidad de Valladolid confirmó el papel clave que desempeña la temperatura de enriquecimiento en la producción de PHA microbiano a partir del CH_4 (Myshkina et al., 2008). En este estudio, el enriquecimiento del cultivo a altas temperaturas (30 y 37 °C) dio como resultado una acumulación superior de PHA en comparación con la biomasa enriquecida a 25 °C.

El hecho de que los resultados obtenidos para el contenido de PHA de las comunidades microbianas enriquecidas a diferentes temperaturas se debió simplemente a la temperatura existente durante la fase de acumulación se descartó al realizar experimentos de acumulación de PHA a 25, 30 y 37 °C con biomasa enriquecida de *Sphagnum* en 25 °C. No se observó ningún aumento en la acumulación de PHA a 30 y 37 °C, lo que confirmó que el enriquecimiento del cultivo a temperaturas más altas juega un papel clave en la selección de acumuladores de PHA más eficientes. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a esta mayor acumulación de PHA en comunidades enriquecidas a temperaturas más altas siguen siendo desconocidos. En este contexto, se ha especulado que la temperatura actúa como un estrés ambiental análogo al agotamiento del nitrógeno y desencadena la acumulación de PHA. Sin embargo, solo se observaron niveles traza de PHA a 30 o 37 °C en cultivos llevados a cabo en condiciones de nitrógeno suficientes y no hubo una influencia directa de la temperatura en la acumulación de PHA en condiciones de limitación de nitrógeno durante la fase de acumulación. En este punto, se puede especular que algunos mecanismos moleculares implicados en la resistencia al choque térmico también podrían permitir que los metanótrofos acumulen contenidos más altos de PHA. (Pérez et al., 2019)



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



OBJETIVOS



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



2. OBJETIVOS

La investigación planteada tiene como objetivo principal encontrar la temperatura óptima de cultivo para el microorganismo *Methylocystis Parvus* y de este modo maximizar la acumulación de polihidroxi butirato (PHB) utilizando como fuente de carbono una emisión con un 30% de metano. Los objetivos específicos son los siguientes:

- I. Estudio del crecimiento secuencial a distintas temperaturas (30,33,35,36,37 °C) con el fin de buscar una adaptación de la cepa *M. Parvus*.
- II. Estudio de la acumulación de PHB a dos temperaturas distintas: 30 °C y 35 °C.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



MATERIALES Y MÉTODOS



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medio mineral salino (NMS)

El medio mineral salino de nitrato (NMS) que se utilizó fue un medio modificado de Whittenbury et al. 1970 (Whittenbury et al., 2009) preparado de acuerdo con los procedimientos de DSMZ. Las disoluciones utilizadas en la preparación del medio mineral son las siguientes:

Tabla 3-1 Disoluciones para el medio NMS

	Masa	Soluto	Disolvente
Disolución 1	10 g	KNO ₃	Se enrasa a 1L con agua clase II
	10.788g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	
	2g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	
Disolución 2	0.38 g	Fe-EDTA	Se enrasa a 100 mL con agua clase II
Disolución 3	0.087g	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Se enrasa a 100 mL con agua clase II
Disolución 4	27.663 mg	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	Se enrasa a 100 mL con agua clase II
	100 mg	CuSO ₄ · 5H ₂ O	
	50 mg	FeSO ₄ · 7H ₂ O	
	40 mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	
	1.5 mg	H ₃ BO ₃	
	2.7285 mg	CoCl ₂	
	2 mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O	
1mg	Ni · 6H ₂ O		
Disolución 5	6.5 g	KH ₂ PO ₄	Se enrasa a 250 mL con agua clase II y se ajusta el pH a 6.8
	20.706g	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	

Las disoluciones arriba descritas corresponden con los siguientes nombres:

- Disolución 1: 10 x NMS
- Disolución 2: Fe-EDTA 3.8% w/v
- Disolución 3: Molibdato de sodio 0.1% w/v
- Disolución 4: Disolución elementos traza, TES
- Disolución 5: PO³⁻₄ Buffer



El procedimiento para la preparación del medio mineral de 1L (1xNMS) es el siguiente:

- 1) Se disuelven 100 mL de la disolución 1 y se enrasa a 1L con agua clase II
- 2) Se añaden 0.5 mL de disolución 3, 0.1 mL de disolución 2 y 1 mL de disolución 4.
- 3) Se autoclava la mezcla y la disolución 5 en botellas separadas a 121 °C y durante 20-30 minutos.
- 4) Una vez que las disoluciones anteriores están frías, se añade en campana de flujo laminar 10 mL de disolución 5 a la mezcla preparada previamente.

Para la preparación del medio sin nitrógeno, utilizado para estimular la producción de PHB, se sigue el mismo procedimiento que para el medio con nitrógeno, pero en este caso en la disolución 1 no se añade el nitrato de potasio (KNO_3).

Todos productos químicos necesarios para la preparación del NMS se compraron en PANREAC (Barcelona, España), mientras que los gases utilizados como el CH_4 ($\geq 99.995\%$) y el O_2 ($\geq 99.0\%$) se compraron a Abelló Linde S.A. (Barcelona, España).

3.2 Inóculo

Para la preparación de los microorganismos capaces de consumir/degradar metano en diferentes condiciones de temperatura se utilizó una cepa de *Methylocystis Parvus* donada por Biopolis S.L (Valencia, España)

El cultivo bacteriano se realizó en botellas estériles de 120 mL con 20 mL de medio 1x NMS, 2mL de inóculo (10%) y un agitador magnético. Estas botellas se cerraron con un septum de butilo y tapas de aluminio. Una vez que se inoculó en un ambiente estéril se intercambié el aire del espacio de cabezas por oxígeno puro en condiciones estériles (usando filtros de 0.2 micras estériles). Cuando la atmósfera de las botellas es sólo oxígeno se extrajeron 30 mL de atmósfera con una jeringa de gas y se introdujeron 30 mL de metano (CH_4 4.5 Linde, pureza de 99.995%) en condiciones estériles hasta alcanzar una concentración de metano de 30% (Figura 3.4.1-2). Estas botellas, junto con unas pesas que evitan su flotación, se introdujeron en un baño de agua que presentaba agitación magnética (360 rpm) y se encontraba a la temperatura de estudio deseada.

Se hizo un estudio a cinco temperaturas distintas (30°C, 33°C, 35°C, 36°C, 37°C). Para las temperaturas de 30°C se hicieron duplicados, y para el resto de las temperaturas triplicados. Para todas las botellas se realizó el seguimiento de la composición del espacio de cabezas a lo largo de los días.

En todos casos se monitorizó periódicamente las concentraciones de CO_2 , de O_2 , y de CH_4 , hasta el consumo completo del metano.



Figura 3.4.1-1 Material utilizado

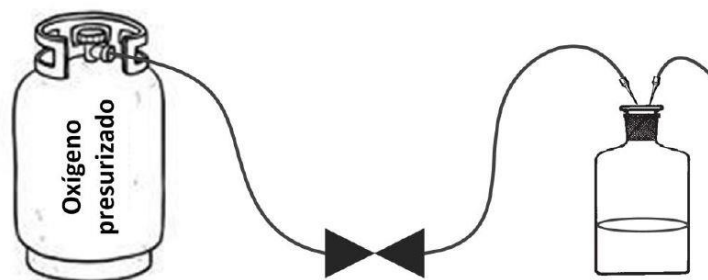


Figura 3.4.1-2 Esquema desplazamiento del espacio de cabezas

3.3 Estudio de la influencia de la temperatura en la biodegradación del metano.

El estudio de la influencia de la temperatura en la degradación del metano se llevó a cabo en dos medios distintos. El primer medio contenía nitrógeno en forma de nitrato de potasio, y el segundo medio no contenía nitrógeno.

En el caso del medio con nitrógeno (NMS), se utilizaron cuatro botellas de vidrio estériles de 120 mL con 20 mL de NMS cerradas con un septum de butilo y con una tapa de aluminio (Figura 3.4.1-1). Fueron inoculadas con 2 mL del inóculo del ciclo de selección anterior (10%). El aire del espacio de cabezas de las botellas fue reemplazado por oxígeno durante 5 minutos en condiciones estériles, y posteriormente, se extrajeron 30 mL de aire con una jeringa de gases y se inyectaron 30 mL de metano (pureza >99.995%).

Universidad de Valladolid

De este modo se consiguió una atmósfera con 70 % v/v de O_2 y 30 % v/v de CH_4 (Figura 3.4.1-2). El crecimiento se llevó a cabo con agitación magnética a 360 rpm y en baños termostáticos. En este caso las temperaturas de los baños fueron de 30 °C en primer lugar y de 35° C en el segundo caso. El experimento se llevó a cabo hasta que el metano ha sido consumido en su totalidad o cuando la concentración de metano del espacio de cabezas se mantuvo constante.

Una vez que el metano fue consumido, se abrieron las botellas en campana y el contenido se traspasó a un falcón estéril para su posterior centrifugación. La centrifugación se llevó a cabo a 10000 rpm durante 7 minutos. Tras ello, el sobrenadante se retiró y el precipitado se resuspendió en 20 mL de medio sin nitrógeno. Se cerraron las botellas de nuevo con septum de butilo y tapas de aluminio, y se intercambió el espacio de cabezas por oxígeno puro. Una vez hecho esto, al igual que en el caso anterior, se sacaron 30 mL de oxígeno y se inyectaron 30 mL de metano para obtener así una atmósfera de 70 % v/v de O_2 y 30 % v/v de CH_4 . Se monitoreó su consumo de metano y oxígeno y la producción de CO_2 mediante GC-TCD hasta el momento en el cual el metano se consumió completamente o cuando la relación molar de concentraciones de CH_4 - CO_2 se volvió constante. Posteriormente se analizó la concentración de PHB.

3.4 Tratamiento de datos

3.4.1 Estudio de la velocidad de crecimiento.

El empleo de modelos matemáticos del crecimiento celular permite describir el aumento de población en un determinado cultivo microbiano y obtener los parámetros característicos de crecimiento.

La representación gráfica del crecimiento celular de un cultivo bacteriano corresponde con la siguiente figura:

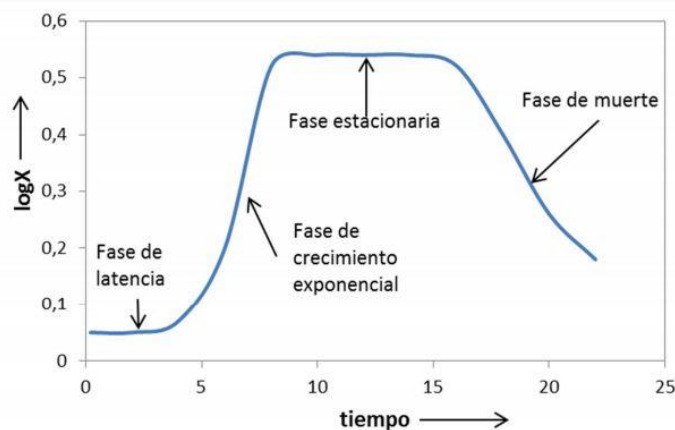


Figura 3.4.1-1 Fases del crecimiento celular



La primera fase, también denominada fase de latencia, es la que tiene lugar inmediatamente después de la inoculación. En esta fase no hay iniciación de replicación de ADN ni crecimiento de nuevas células, solamente se produce la adaptación al nuevo medio de cultivo. En general, interesa minimizar este periodo.

En la segunda fase, o fase de crecimiento exponencial, las células se reproducen a una velocidad que es la máxima para las condiciones existentes, debido a que no existe limitación de nutrientes. Esta fase define la velocidad de crecimiento (μ).

La siguiente fase es la fase estacionaria, la cual se alcanza cuando se agota un nutriente, y debido a esto se detiene el crecimiento.

Y por último la fase de muerte o decaimiento. En esta fase tiene lugar la muerte y lisis masiva (exponencial). Esto se debe al agotamiento de reservas de energía.

En este trabajo la fase de estudio fue la fase de crecimiento exponencial, ya que se busca determinar las velocidades de crecimiento a distintas temperaturas.

Para ello el modelo matemático que se utilizó es la ecuación diferencial de crecimiento celular:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ecuación 3-1}$$

Siendo X: concentración celular (mg/L); μ : la velocidad específica de crecimiento; t: el tiempo de crecimiento.

Integrando la (Ecuación 3-1) se obtuvo:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Siendo X_0 : la concentración inicial de microorganismos y μ constante.

El CO_2 producido por unidad de biomasa producida, $Y_{\frac{\text{CO}_2}{X}}$, fue el parámetro utilizado para la descripción del crecimiento de *M. Parvus*.

$$\frac{d[\text{CO}_2]}{dt} = Y_{\frac{\text{CO}_2}{X}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Ecuación 3-3}$$

Sustituyendo Ecuación 3-1 y Ecuación 3-2:

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = Y_{CO_2} \cdot \mu \cdot X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Ecuación 3-4}$$

Integrando la Ecuación 3-4 entre los valores de concentración de dióxido de carbono y tiempo (valores iniciales y finales) se obtuvo:

$$\int_{[CO_2]_0}^{[CO_2]} d[CO_2] = \int_0^t Y_{CO_2} \cdot \mu \cdot X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} dt \quad \text{Ecuación 3-5}$$

$$\Delta[CO_2] = \frac{Y_{CO_2} \cdot \mu}{\mu} \cdot X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} = Y_{CO_2} \cdot X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Ecuación 3-6}$$

Y por último tomando logaritmos neperianos:

$$\ln \Delta[CO_2] = \ln Y_{CO_2} \cdot X_0 + \mu \cdot t \rightarrow \ln y = n + m \cdot t \quad \text{Ecuación 3-7}$$

Por lo tanto, la representación en el eje Y del incremento de CO₂, y en el eje X del tiempo de experimento permitió obtener la pendiente de la recta durante la fase de crecimiento exponencial, que se correspondió con la velocidad de crecimiento (μ).

3.4.2 Estudio del ratio molar de consumo oxígeno-metano

Un factor importante a tener en cuenta en el estudio de la adaptación de *M. Parvus* a varias temperaturas y en el estudio del efecto de la temperatura en la acumulación de PHB, es el ratio de consumo de oxígeno-metano.

Para ello en primer lugar se determinaron las concentraciones de oxígeno y metano a partir de las áreas obtenidas por el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de conductividad térmica. En este paso se utilizaron las pendientes de la Tabla 7-3.

$$\left[x \left(\frac{g}{m^3} \right) \right] = \text{Área}_x \cdot \frac{1}{\text{Valor pendiente}_x} \quad \text{Ecuación 3-8}$$

Siendo [x] la concentración del compuesto que se quería determinar, y x el compuesto en cuestión.



Después obtener esas concentraciones en g/m^3 y a partir del peso molecular de cada compuesto se obtuvo la concentración en unidades mol/m^3 aplicando la siguiente ecuación:

$$\left[x \left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right) \right] = \frac{\left[x \left(\frac{\text{g}}{\text{m}^3} \right) \right]}{\text{Peso molecular}_x} \quad \text{Ecuación 3-9}$$

Siendo el peso molecular del metano y del oxígeno 16.042 y 31.998 (g/mol), respectivamente.

Una vez se determinaron las concentraciones de metano y oxígeno en mol/m^3 se representaron la concentración de oxígeno en el eje Y frente a la concentración de metano en eje X y la pendiente de la recta obtenida correspondería con el ratio de consumo para una determinada temperatura y concentración inicial de metano.

3.4.3 Estudio de la velocidad de producción de moles de CO_2 por unidad de biomasa total

Para determinar la influencia de la temperatura en la velocidad de producción de moles de CO_2 por unidad de biomasa total se siguieron los siguientes pasos.

En primer lugar, se tuvo que determinar la concentración de CO_2 por unidad de tiempo. Este valor (θ) se obtuvo a partir de la pendiente correspondiente de la representación de los primeros puntos de concentración de CO_2 (mol/m^3) (eje Y) frente al tiempo (eje X).

Posteriormente, fue necesario obtener la biomasa total en peso seco. En este caso, para cada experimento se partió de la concentración inicial de metano (mol/m^3). El volumen del espacio de cabezas (98 mL) fue el mismo para todos los experimentos, al igual que el rendimiento de biomasa /metano utilizado. Para *M. parvus* el rendimiento de biomasa total en peso seco /mol de metano correspondió con valor ($7.2 \pm 0.4 \text{ g-peso seco/mol CH}_4$) obtenido de la literatura (Bordel et al., 2019b). Por lo tanto, aplicando la siguiente ecuación se obtuvo la biomasa total:

$$\begin{aligned} \text{Biomasa total (g peso seco)} &= \\ &= [\text{CH}_4]_0 \left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right) \cdot 98 \text{ mL} \cdot \left(7.2 \frac{\text{g-peso seco}}{\text{molCH}_4} \right) \end{aligned} \quad \text{Ecuación 3-10}$$

Con los datos anteriormente descritos ya fue posible el cálculo de la velocidad de producción de moles de CO₂ por unidad de biomasa total, para ello se aplicó la siguiente ecuación:

$$v \left(\frac{g-CO_2}{h \cdot g - peso\ seco} \right) = \frac{\theta \left(\frac{mol}{m^3 \cdot h} \right) \cdot V}{10^6 \cdot biomasa\ total\ (g - peso\ seco)} \quad \text{Ecuación 3-11}$$

Siendo v la velocidad de producción de CO₂ por unidad de tiempo y unidad de biomasa total, y V el volumen total de las botellas que usadas en los experimentos (120 mL).

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Determinación de las concentraciones de CH₄ y CO₂

Las concentraciones de CH₄ y CO₂ se determinaron inyectando la fase gas del espacio cabezas de la botella con una jeringa de 100 µL en un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC equipado con un detector de conductividad térmica (Bruker, Palo Alto, USA) que cuenta con dos columnas: CP-Molsieve 5A (15 m x 0.53 mm x 50 µm) y otra CP-PoraBOND Q (25 m x 0.53 mm x 10 µm). Las temperaturas del horno, el inyector y el detector fueron 45°C, 150 °C y 200 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 13.7 mL min⁻¹. (Pérez et al., 2019) (Figura 3.5.1-1).

Los resultados proporcionados por el GC-TCD en forma de área se correlacionaron con las concentraciones de CO₂ y CH₄ mediante rectas de calibrado obtenidas anteriormente con patrones externos.

Los datos obtenidos en los experimentos se utilizaron para el estudio de la velocidad de crecimiento del microorganismo *Methylocystis Parvus*.



Figura 3.5.1-1 Cromatógrafo de gases con detecto de conductividad térmica Bruker 430 GC



Figura 3.5.1-2 Jeringa de 100 µL

3.5.2 Análisis de PHB

El análisis de PHBs se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el Anexo II. Protocolo de análisis de PHBs.

Después de la extracción e hidrólisis, los hidroxibutiratos se midieron usando un GC- Agilent 7820 A acoplado con un 5977E MSD (Agilent technologies, Santa Clara, USA) y equipado con una columna DB-wax (30 m x 250 µm x 0.25 µm) (Figura 3.5.2-1). Las temperaturas del detector y del inyector se mantuvieron constantes a 250°C y la temperatura del horno se incrementó progresivamente desde 40°C hasta 200°C a 10°C por minuto y se mantuvo a 200 °C durante 2 minutos, antes de incrementar de nuevo la temperatura a 5 °C por minuto hasta alcanzar los 240 °C. (Bordel et al., 2019a)

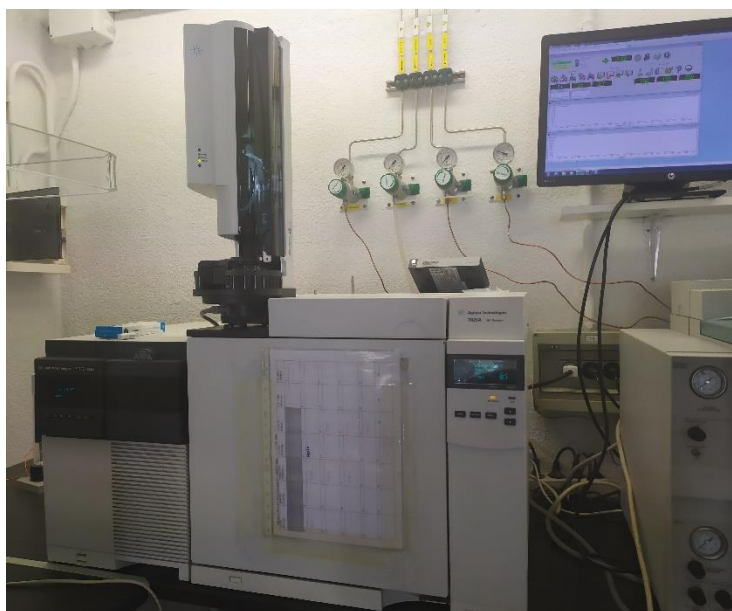


Figura 3.5.2-1 Cromatógrafo de gases GC- Agilent 7820 A acoplado con un 5977E MSD



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Universidad de Valladolid



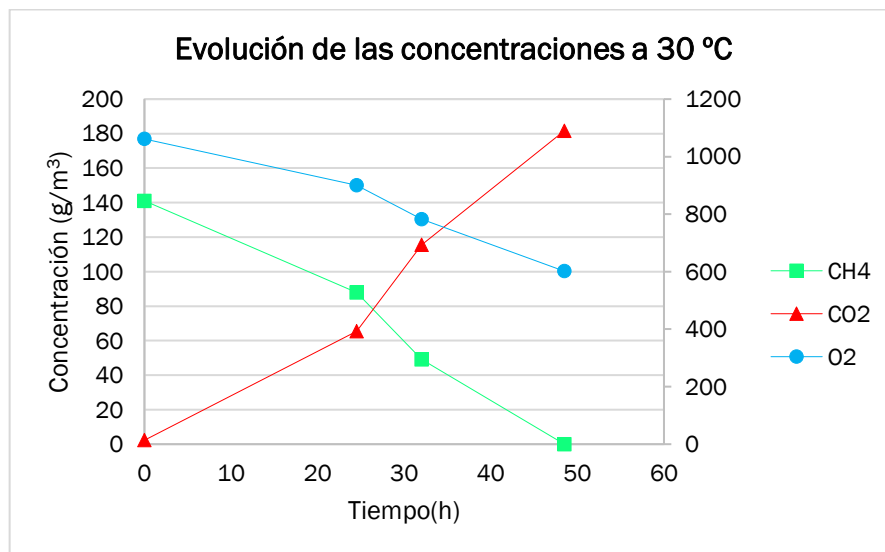
ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

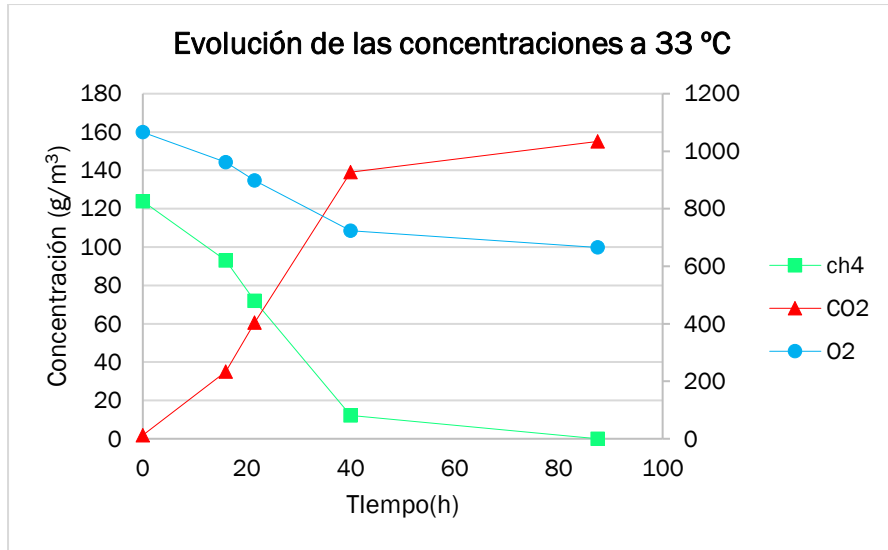
4.1 Evolución de las concentraciones a distintas temperaturas durante la fase de crecimiento

El seguimiento continuo de las botellas se realizó con la ayuda del GC-TCD Bruker 430 GC y de este modo se obtuvo la evolución de las concentraciones de los distintos compuestos que formaban la atmósfera del espacio de cabezas de cada botella. La composición de esta atmósfera, en todos los casos, constaba de dióxido de carbono, oxígeno, metano y nitrógeno. Solo eran de interés los tres primeros compuestos, ya que el nitrógeno al ser un gas inerte no intervino en el proceso de degradación anaerobia de metano.

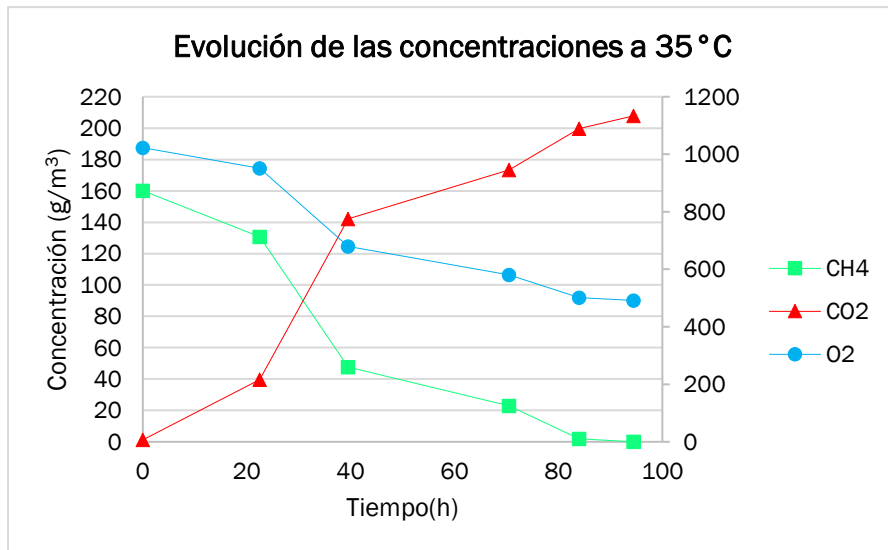
En las gráficas siguientes, se observa la evolución a lo largo del tiempo de los tres compuestos de interés para las temperaturas de 30,33,35,36 (f (35)), 36 (f (36)) y 37°C. Estas gráficas fueron realizadas a partir de experimentos en los que se usó un medio mineral rico en nitrógeno y hasta que consumió por completo todo el metano del espacio de cabezas. En todos los casos, estas gráficas son las más representativas de cada uno de experimentos (realizados en quintuplicado).



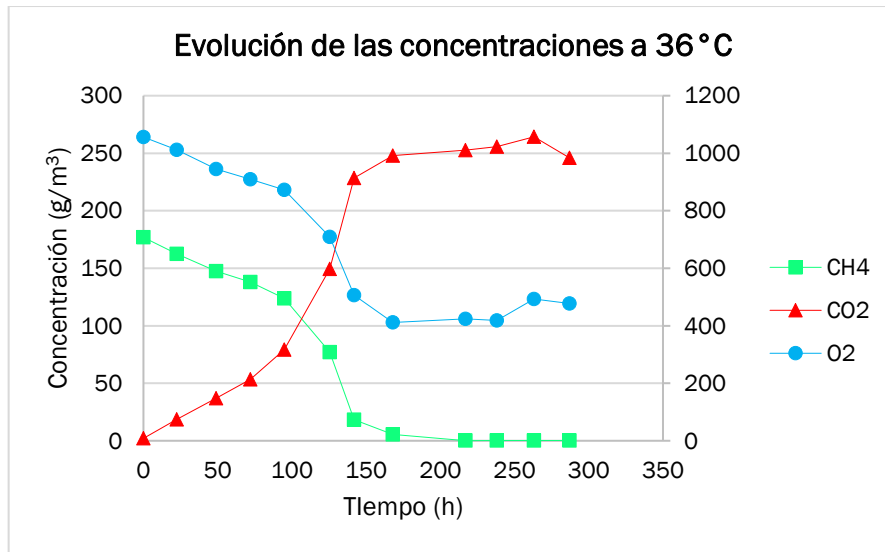
Gráfica 3.5.2-1 Evolución de las concentraciones a 30 °C.



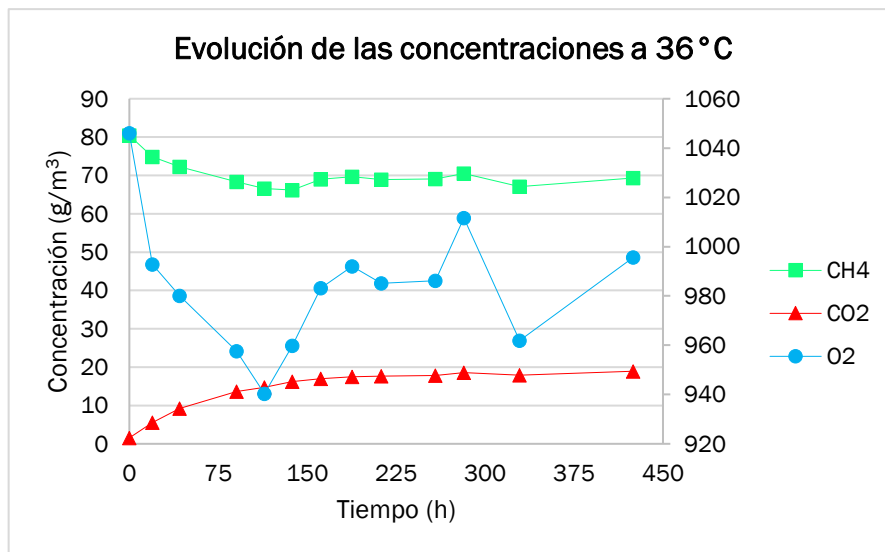
Gráfica 3.5.2-2 Evolución de las concentraciones a 33 °C.



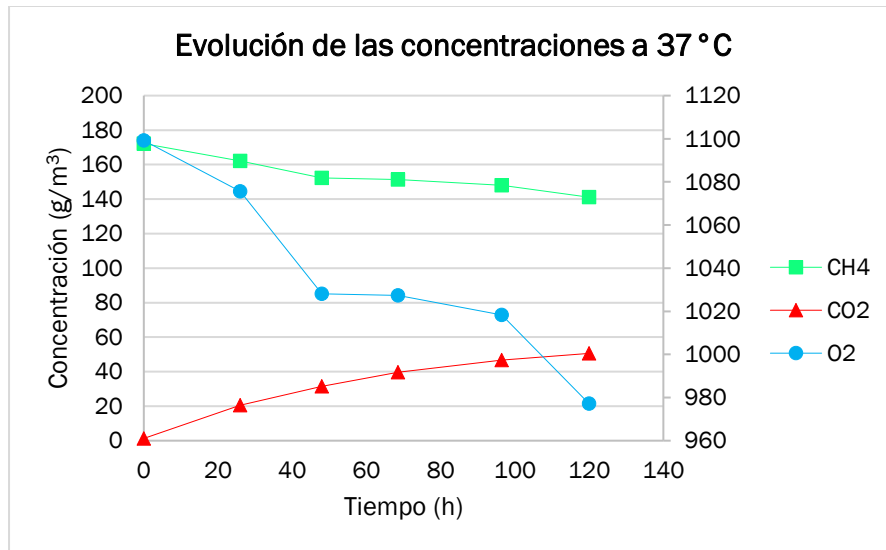
Gráfica 3.5.2-3 Evolución de las concentraciones a 35 °C.



Gráfica 3.5.2-4 Evolución de las concentraciones de a 36 °C a partir de un inóculo crecido a 35 °C.



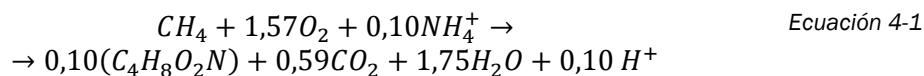
Gráfica 3.5.2-5 Evolución de las concentraciones de a 36 °C a partir de un inóculo crecido a 36 °C.



Gráfica 3.5.2-6 Evolución de las concentraciones a 37 °C

En todos los experimentos se observa que existe un consumo de oxígeno y metano simultáneo, mientras que se produce CO₂. Esto ocurre porque el microorganismo utilizado (*Methylocystis parvus*), es un metanótrofo que utiliza el metano como única fuente de carbono y de energía y en el proceso consume oxígeno y produce CO₂ y biomasa (López et al., 2013). El CO₂ proviene de las reacciones de producción de energía a partir de la oxidación de metano.

La estequiometría del crecimiento metanotrófico para el microorganismo de estudio (*M. Parvus*) se puede expresar en función de las demandas de oxígeno y nitrógeno para la vía de serina a partir de la siguiente ecuación (Kalia, 2019):



En los experimentos a 36 °C y 37 °C, como se observan en las Gráfica 3.5.2-5 y 3.5.2-6, respectivamente, el consumo de metano fue muy lento o inexistente. Por ello se podría determinar que el límite de crecimiento de este microorganismo se encuentra a 36 °C.

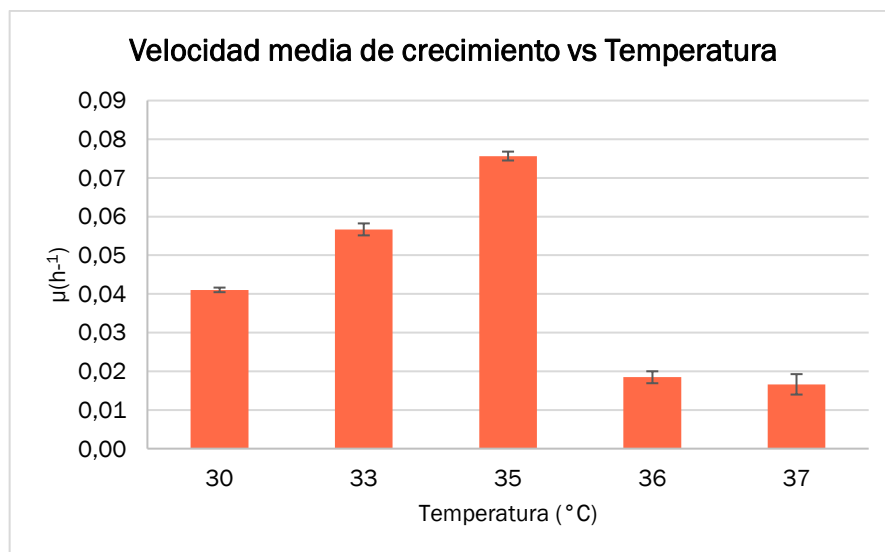
En los demás experimentos el metano se consumió en su totalidad. El experimento que se realizó a 35 °C tenía una concentración inicial mayor que el experimento de 33 °C, en cambio, ambos experimentos requirieron el mismo tiempo para que consumiera todo el metano. Esto se tradujo en una mayor velocidad de crecimiento para el experimento de 35 °C.

Por otro lado, observando la evolución de la concentración de CO₂ en el tiempo, se pudo determinar que para los experimentos de 33 °C y 35 °C el microorganismo alcanzó la fase estacionaria en tiempos similares (40 h), mientras que para el experimento a 30 °C este tiempo ascendió a 50 h. Esto también se pudo traducir en mayores velocidades de crecimiento para los experimentos de 33 y 35 °C que para el de 30 °C.

4.2 Influencia de la temperatura en la velocidad de crecimiento

En este trabajo se estudió la influencia de la temperatura en la velocidad de crecimiento, utilizando unas concentraciones iniciales de metano similares en todos los experimentos.

Para este estudio del efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento se realizaron experimentos en los que se utilizó un medio rico en nitrógeno. En la siguiente gráfica se recogen los valores medios de las velocidades de crecimiento experimentales.



Gráfica 3.5.2-1 Comparativa de las velocidades de crecimiento a distintas temperaturas en un medio rico en nitrógeno

Los experimentos que se realizaron con el microorganismo *M. Parvus* a distintas temperaturas siguieron el mismo comportamiento que la mayoría de los microorganismos. Este comportamiento viene descrito en (Huang et al., 2011), en el cual se explica que los microorganismos tienen un punto óptimo de temperatura y a partir de ese valor su velocidad de crecimiento decae drásticamente. En este caso el punto óptimo de operación fue a 35 °C, puesto que fue el punto de máxima de velocidad ($0,0757 \pm 0,0011 \text{ h}^{-1}$) en comparación con los valores de las velocidades de crecimiento de $0,0410 \pm 0,0006 \text{ h}^{-1}$ y

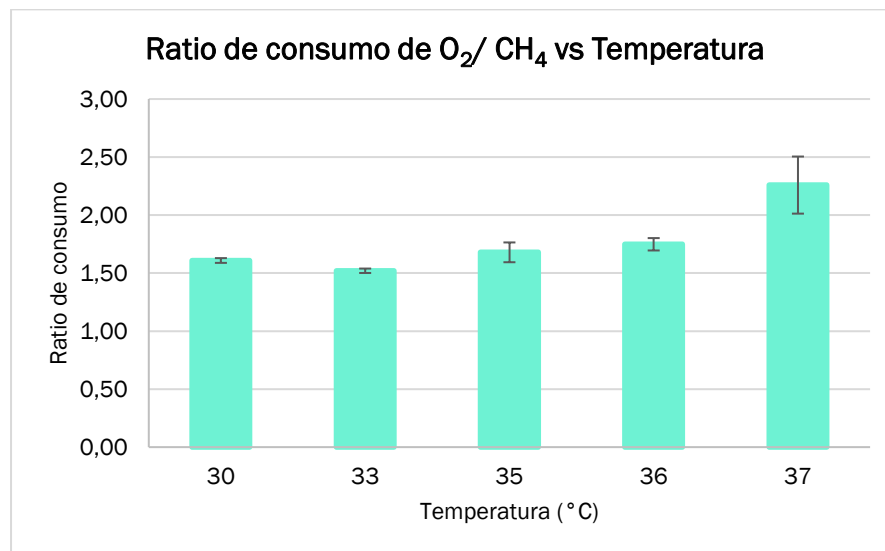
Universidad de Valladolid

$0,0567 \pm 0,0015 \text{ h}^{-1}$, que se obtuvieron a 30 y 33 °C, respectivamente. A partir de su punto óptimo la velocidad de crecimiento decae drásticamente en los experimentos a 36 y 37 °C, donde se registraron velocidades de crecimiento considerablemente menores ($0,0185 \pm 0,0015 \text{ h}^{-1}$ y $0,0199 \pm 0,0063 \text{ h}^{-1}$, respectivamente).

Tanto para los experimentos realizados para este trabajo como los de (Pérez et al., 2019), en los que se utilizó cultivos mixtos de metanótrofos, para una temperatura de 30 °C se obtuvieron velocidades de crecimiento muy similares. En el caso de (Pérez et al., 2019) se obtuvo un valor de $0.04 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ para un cultivo de metanótrofos enriquecidos a partir de *Sphagnum* y lodo, y en nuestros experimentos se obtuvo una velocidad de $0,0410 \pm 0,0006 \text{ h}^{-1}$.

4.3 Ratio de consumo molar oxígeno-metano

En los experimentos llevados a cabo a distintas temperaturas, usando un medio con nitrógeno, se realizó un estudio del ratio molar de consumo de oxígeno-metano además del estudio de la velocidad de crecimiento. Como resultado al estudio del ratio molar se obtuvo la siguiente gráfica.



Gráfica 3.5.2-1 Comparativa del ratio de consumo molar de oxígeno-metano para distintas temperaturas



Estos resultados mostraron que solamente existe una diferencia significativa en la relación molar de consumo para la temperatura de 37 °C. En los demás casos, los valores obtenidos fueron ligeramente mayores a los predichos, teóricamente y experimentalmente, por otros autores, como en el caso de (Bordel et al., 2019b) cuyo modelo predijo, mediante el mecanismo “redox arm” que el ratio de consumo para *Methylocystis parvus* era 1.5 mol O₂/mol CH₄. Este mismo valor fue predicho también por (Allison J. Pieja et al., 2011).

Los ratios que se obtuvieron en este trabajo para *M. Parvus* fueron bastante similares a los obtenidos para *Methylocystis hirsuta* (otro metanótrofo Tipo II) por (Bordel et al., 2019a), ya que para este metanótrofo se obtuvo un valor experimental de 1.52 ± 0.012 mol O₂/mol CH₄.

Para el caso concreto de 37 °C, el resultado que se obtuvo (2.258 ± 0.246) se puede explicar porque una mayor cantidad de metano fue dedicada a obtener la energía necesaria para que las células logren sobrevivir en condiciones de estrés térmico

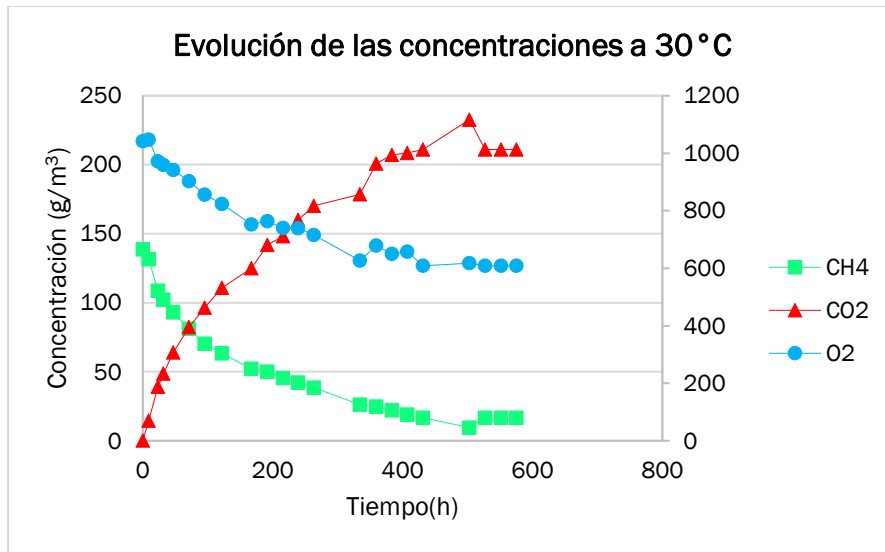
4.4 Fase de acumulación de PHBs

4.4.1 Evolución de las concentraciones de los compuestos en la fase de acumulación de PHBs

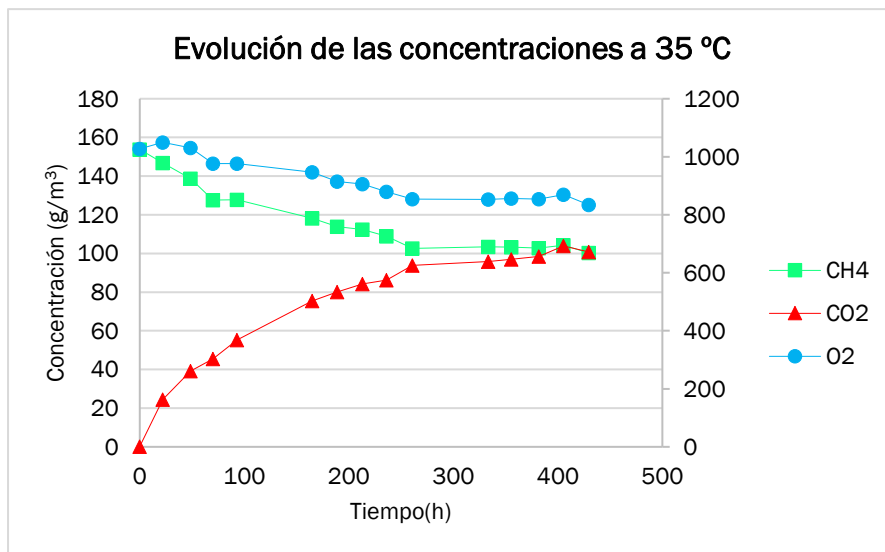
El seguimiento del metabolismo de *M. Parvus* se realizó mediante el cromatógrafo de gases Bruker 430 GC, midiendo las concentraciones de dióxido de carbono, oxígeno, metano y nitrógeno que componían la atmósfera del espacio de cabezas de cada botella.

En este caso se realizaron dos experimentos, uno a 30 °C y otro a 35 °C. En estos experimentos con un medio sin nitrógeno las células no pueden sintetizar proteínas, pero como sí tienen fuente de carbono, construyen una reserva de energía en forma de PHB. Por ello, en estos experimentos se determinó el efecto de la temperatura en la acumulación de PHB.

Los resultados que se obtuvieron se recogen en las siguientes gráficas.



Gráfica 4.4.1-1 Evolución de las concentraciones a 30 °C durante la fase de acumulación de PHBs.



Gráfica 4.4.1-2 Evolución de las concentraciones a 35 °C durante la fase de acumulación de PHBs.

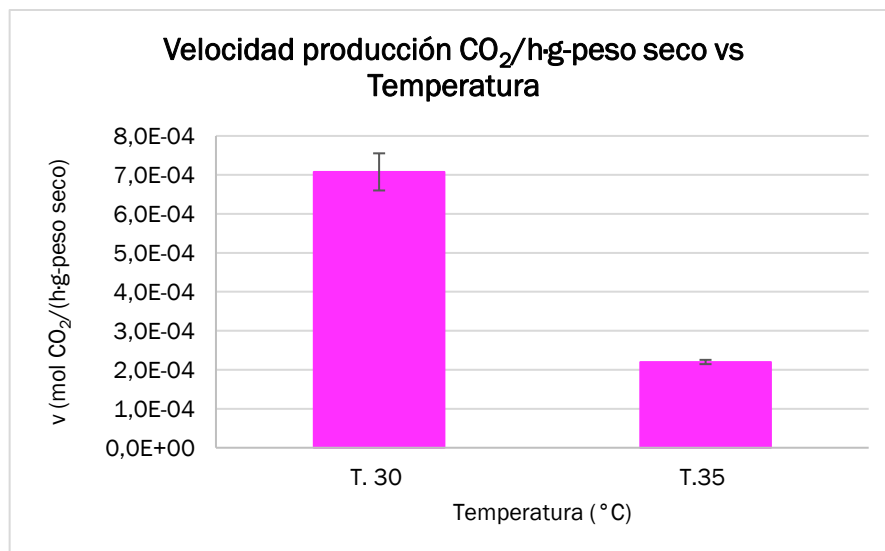
En estos dos experimentos se observó el coste de oxígeno y metano que supone la acumulación de PHBs.

En el primer caso, el microorganismo fue capaz de oxidar todo el metano (Gráfica 4.4.1-1). En cambio, para el experimento a 35 °C no se produjo un consumo completo del metano, ya que llegó un momento en el que las células se saturaron y por eso dejaron de consumir el metano.

Por otro lado, tanto el consumo de oxígeno como la producción de CO₂ en el experimento a 30 °C fueron considerablemente mayores en comparación con el experimento a 35 °C.

4.4.2 Influencia de la temperatura en la velocidad de producción de moles de CO₂ por unidad de biomasa total.

A continuación, se estudió el efecto de la temperatura en velocidad de producción de moles de CO₂ por unidad de biomasa total como consecuencia de la acumulación de PHBs. Para ello se realizaron dos experimentos a dos temperaturas distintas (30 y 35 °C) utilizando, en ambos, medio sin nitrógeno. En la siguiente gráfica se recogen los valores medios de las velocidades de producción de moles de CO₂ por unidad de biomasa total.



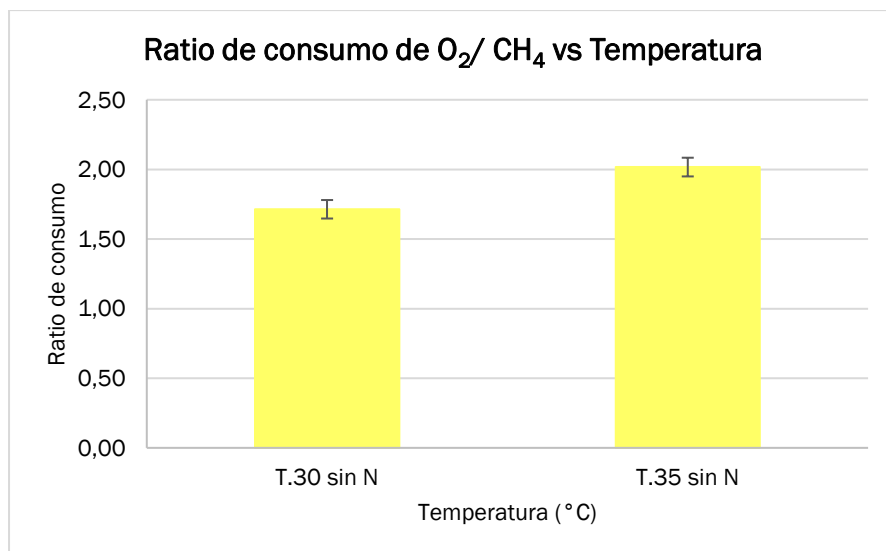
Gráfica 4.4.2-1 Comparativa de las velocidades de producción de moles de CO₂ por unidad de biomasa total a dos temperaturas (30 y 35 °C).

En la gráfica superior se pudo observar que existe una diferencia significativa en la velocidad de producción de moles de CO_2 por unidad de biomasa total, lo que indica una mayor producción específica de energía durante la oxidación enzimática de metano a $30\text{ }^\circ\text{C}$. Esto se tradujo en una acumulación más rápida de los PHBs en el experimento que se llevó a cabo a $30\text{ }^\circ\text{C}$ en comparación con el experimento a $35\text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.3 Ratio de consumo molar de oxígeno-metano para medio sin nitrógeno

En este caso, para determinar el ratio de consumo molar de oxígeno-metano se obtuvieron los resultados a partir de los experimentos realizados a dos temperaturas distintas (30 y $35\text{ }^\circ\text{C}$) y usando un medio sin nitrógeno.

Los resultados obtenidos se agrupan en la siguiente gráfica:



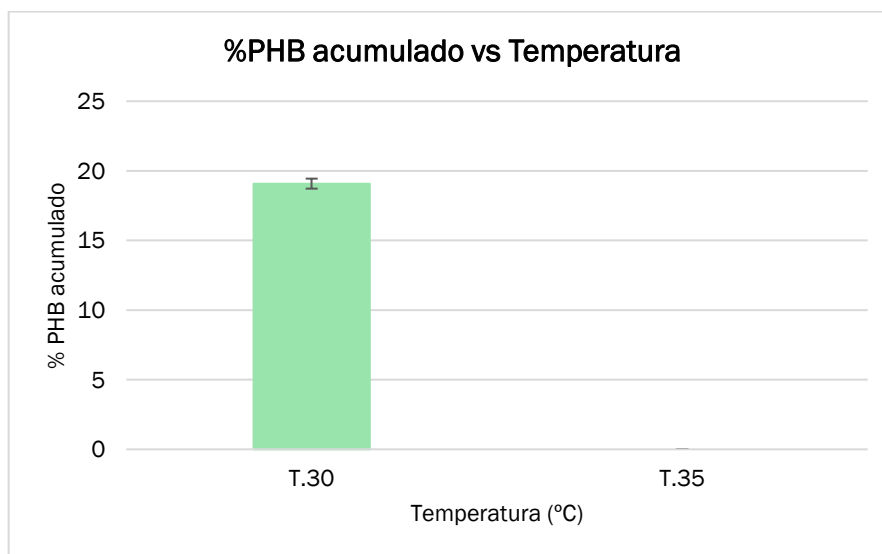
Gráfica 4.4.3-1 Comparativa de la ratio de consumo molar de oxígeno-metano para dos temperaturas distintas y medio sin nitrógeno

Al igual que ocurría para los experimentos sin nitrógeno, el valor experimental que se obtuvo para el caso de $30\text{ }^\circ\text{C}$ fue similar, tanto a los predichos teóricamente como los obtenidos experimentalmente por (Bordel et al., 2019a). En cambio, para el experimento a $35\text{ }^\circ\text{C}$ el ratio de consumo molar tenía un valor mayor (2.017 ± 0.067). Esto se puede explicar debido a que se produjo un mayor consumo energético causado por el estrés por exposición a alta temperatura.

4.4.4 Acumulación de PHBs

Para determinar la influencia de la temperatura en la acumulación de PHB, se llevaron a cabo dos experimentos a dos temperaturas distintas (30 y 35 °C). La primera fase del experimento correspondió con la utilización de un medio rico en nitrógeno. La biomasa se separó por centrifugación y se resuspendió en un medio sin nitrógeno.

Los valores obtenidos a las dos temperaturas de estudio se recogen en la siguiente gráfica.



Gráfica 4.4.4-1 Comparativa del porcentaje de acumulación de PHBs en función de la temperatura (30 y 35 °C)

Para el caso concreto a 30 °C, el porcentaje que se obtuvo de acumulación de PHB es de 19,08 % \pm 0,36, mucho más pequeño que los valores que hay en literatura para *M. Parvus*. Las razones de esta baja fracción de PHB acumulado están por eluciar. Por ejemplo, en el caso de (Allison J. Pieja et al., 2011) se obtuvo que *M. Parvus* es capaz de acumular PHBs hasta el 50 % de su biomasa seca.

A pesar de que la temperatura óptima de *M. parvus* con nitrógeno eran 35 °C, después de hacer experimento a esa misma temperatura usando un medio sin nitrógeno, no se produjo ninguna acumulación de PHBs. Los motivos por los que ocurrió esto tampoco pudieron ser esclarecidos.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



CONCLUSIONES



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



5 CONCLUSIONES

En este estudio del potencial de la temperatura en la mejora de cepas del metanótrofo *M. Parvus* se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La temperatura es un factor condicionante a la hora de operar e influye significativamente en la reacción de oxidación de metano. Tras realizar el experimento a 37 °C y observar que la velocidad de crecimiento decayó bruscamente, no se siguió aumentando la temperatura, sino que se intentó adaptar las cepas a 36 °C.
- Se puede concluir que el punto óptimo de operación de *M. Parvus* corresponde con una temperatura de 35 °C, puesto que en este punto se obtuvo el mayor valor de velocidad de crecimiento.
- La relación molar experimental de consumo de oxígeno-metano del microorganismo estudiado *M. Parvus* se aproxima considerablemente al valor teórico predicho y a los valores experimentales obtenidos por otros autores.
- La acumulación de PHBs a 30 °C es significativamente menor a los obtenidos a otros autores, aunque no se ha podido determinar la causa de este resultado.
- A pesar de que la temperatura óptima de crecimiento con nitrógeno del microorganismo eran 35 °C, al realizar otros experimentos a esa misma temperatura, pero usando un medio sin nitrógeno, la producción de CO₂ fue más lenta y no se produjo ninguna acumulación PHBs, Esto podría deberse a que alguna de las enzimas involucradas en la síntesis de PHBs y que no intervienen en el crecimiento celular, se desnaturaliza a 35°C. Aunque esta hipótesis debería ser esclarecida en el futuro.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



BIBLIOGRAFÍA



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



6 BIBLIOGRAFÍA

ABC News. South Korea pushes to reduce disposable items, with Starbucks reducing plastic straws and cup use - ABC News s.f. <https://abcnews.go.com/International/south-korea-pushes-reduce-disposable-items-starbucks-reducing/story?id=57890177> (accedido 5 de junio de 2019).

Abdel-Banat BMA, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:861-7. doi:10.1007/s00253-009-2248-5.

Agencia EFE. La ONU advierte de que sólo el 9 % del plástico usado en el mundo se recicla | Sociedad | Agencia EFE s.f. <https://www.efe.com/efe/espana/sociedad/la-onu-advierte-de-que-solo-el-9-del-plastico-usado-en-mundo-se-recicla/10004-3638488> (accedido 8 de julio de 2019).

AR5 Climate Change 2013: The Physical Science Basis – IPCC. s.f. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/> (accedido 6 de junio de 2019).

AR5 Synthesis Report: Climate Change 2014 – IPCC. s.f. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/> (accedido 6 de junio de 2019).

Baani M, Liesack W. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:10203-8. doi:10.1073/pnas.0702643105.

BBC. Single-use plastics ban approved by European Parliament - BBC News s.f. <https://www.bbc.com/news/world-europe-45965605> (accedido 5 de junio de 2019).

Bordel S, Rodríguez Y, Hakobyan A, Rodríguez E, Lebrero R, Muñoz R. Genome scale metabolic modeling reveals the metabolic potential of three Type II methanotrophs of the genus *Methylocystis*. *Metab Eng* 2019a;54:191-9. doi:10.1016/j.ymben.2019.04.001.

Bordel S, Rojas A, Muñoz R. Reconstruction of a Genome Scale Metabolic Model of the polyhydroxybutyrate producing methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Microb Cell Fact* 2019b;18:104. doi:10.1186/s12934-019-1154-5.

Caspeta L, Caro-Bermúdez MA, Ponce-Noyola T, Martínez A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energy* 2014a;113:277-86. doi:10.1016/j.apenergy.2013.07.036.

Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Baskov S, Hallström BM, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science* (80-) 2014b;346:75-8. doi:10.1126/science.1258137.



Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour Technol* 2009;100:5996-6009. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.088.

Chen GQ, Hajnal I, Wu H, Lv L, Ye J. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnol* 2015;33:565-74. doi:10.1016/j.tibtech.2015.07.007.

Committee on the Environment. REPORT on the proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on the reduction of the impact of certain plastic products on the environment s. f. http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-8-2018-0317_EN.html?redirect (accedido 5 de junio de 2019).

Eggleston G. Sustainability of the Sugar and Sugar - Ethanol Industries 2012:2012. doi:10.1002/cssc.201200066.

Frutos OD, Barriguín G, Lebrero R, Muñoz R. Assessing the influence of the carbon source on the abatement of industrial N₂O emissions coupled with the synthesis of added-value bioproducts. *Sci Total Environ* 2017;598:765-71. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.161.

García-Pérez T, López JC, Passos F, Lebrero R, Revah S, Muñoz R. Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor. *Chem Eng J* 2018;334:691-7. doi:10.1016/j.cej.2017.10.106.

Greenpeace. Datos sobre la producción de plásticos - ES | Greenpeace España s. f. <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/datos-sobre-la-produccion-de-plasticos/> (accedido 5 de junio de 2019).

Handrick R, Reinhardt S, Jendrossek D. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* 2000;182:5916-8. doi:10.1128/JB.182.20.5916-5918.2000.

Huang L, Hwang A, Phillips J. Effect of Temperature on Microbial Growth Rate-Mathematical Analysis: The Arrhenius and Eyring-Polanyi Connections. *J Food Sci* 2011;76:553-60. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02377.x.

Jiang G, Hill DJ, Kowalczyk M, Johnston B, Adamus G, Irorere V, et al. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *Int J Mol Sci* 2016;17. doi:10.3390/ijms17071157.

Kalia VC. Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates. 2019. doi:10.1007/978-981-13-3759-8.

Kalyuzhnaya MG, Puri AW, Lidstrom ME. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metab Eng* 2015;29:142-52. doi:10.1016/j.ymben.2015.03.010.



Karthikeyan OP, Chidambarampadmavathy K, Cirés S, Heimann K. Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2015;45:1579-610. doi:10.1080/10643389.2014.966422.

Khosravi-Darani K, Mokhtari ZB, Amai T, Tanaka K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:1407-24. doi:10.1007/s00253-012-4649-0.

Kristof Verbeeck (UGent). Electrifying biotechnology for the production of CO₂-based chemicals 2019. <http://hdl.handle.net/1854/LU-8619865> (accedido 8 de julio de 2019).

Kumar S, Thakur K. Bioplastics - classification, production and their potential food applications. *J Hill Agric* 2017;8:118. doi:10.5958/2230-7338.2017.00024.6.

Lessmann J, Muñoz J, Bonaccorso E. Maximizing species conservation in continental Ecuador: A case of systematic conservation planning for biodiverse regions. *Ecol Evol* 2014;4:2410-22. doi:10.1002/ece3.1102.

Löhr A, Savelli H, Beunen R, Kalz M, Ragas A, Van Belleghem F. Solutions for global marine litter pollution. *Curr Opin Environ Sustain* 2017;28:90-9. doi:10.1016/j.cosust.2017.08.009.

López JC, Quijano G, Souza TSO, Estrada JM, Lebrero R, Muñoz R. Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:2277-303. doi:10.1007/s00253-013-4734-z.

Muñoz R, Souza TSO, Glittmann L, Pérez R, Quijano G. Biological anoxic treatment of O₂-free VOC emissions from the petrochemical industry: A proof of concept study. *J Hazard Mater* 2013;260:442-50. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.05.051.

Myshkina VL, Nikolaeva DA, Makhina TK, Bonartsev AP, Bonartseva GA. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Appl Biochem Microbiol* 2008;44:482-6. doi:10.1134/s0003683808050050.

Pérez R, Cantera S, Bordel S, García-Encina PA, Muñoz R. The effect of temperature during culture enrichment on methanotrophic polyhydroxyalkanoate production. *Int Biodeterior Biodegrad* 2019;140:144-51. doi:10.1016/j.ibiod.2019.04.004.

Pieja Allison J., Sundstrom ER, Criddle CS. Poly-3-Hydroxybutyrate Metabolism in the Type II Methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6012-9. doi:10.1128/aem.00509-11.

Pieja Allison J, Sundstrom ER, Criddle CS. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6012-9. doi:10.1128/AEM.00509-11.



BIBLIOGRAFÍA



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Universidad de Valladolid

PNUMA. Prohibición de plásticos de un solo uso 2016:6.

Roadmap A. Infographic PLASTICS. 2018.

Rochman CM, Hoh E, Hentschel BT, Kaye S. Classify plastic waste as hazardous. *Nature* 2013;494:169-71. doi:10.1021/es303700s.

Strong P, Laycock B, Mahamud S, Jensen P, Lant P, Tyson G, et al. The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane. *Microorganisms* 2016;4:11. doi:10.3390/microorganisms4010011.

Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson JF. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *J Gen Microbiol* 2009;61:205-18. doi:10.1099/00221287-61-2-205.



Universidad de Valladolid

BIBLIOGRAFÍA



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

ANEXOS



Universidad de Valladolid

BIBLIOGRAFÍA



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



7 ANEXOS

7.1 Anexo I. Curvas de calibración cromatógrafo de gases

Para llevar a cabo las curvas de calibración en el cromatógrafo de gases Bruker 430 -GC equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) se utilizaron los siguientes patrones:

- Biogás con composición 49.5% CH₄, 30% CO₂, 0.5% H₂S.
- Biogás con composición 70% CH₄, 30% CO₂.
- Aire.
- CH₄ 4.5 Linde (Pureza 99,995%).
- 10% del biogás 70% CH₄, 90% He.
- 100% O₂.
- 10% O₂ y 90% He.
- 100% CO₂.

Todas las muestras excepto las que contienen helio y el aire se obtenían directamente de las botellas patrón llenándose bolsas Tedlar de 2L antes de hacer las inyecciones.

La muestra de aire se obtuvo directamente del ambiente y para las otras muestras con helio se utilizaron bulbos de 250 mL que contenían previamente helio. Este gas se reemplazó, con la ayuda de una jeringa de gas, con 25 mL (10%) de biogás u O₂.

Una vez preparadas las muestras se procedió a la inyección de estas, realizando tres inyecciones de cada una de ellas y se registraron las áreas obtenidas de cada una de ellas. La Tabla 7-1 muestra los valores de áreas para los patrones analizados.

Tabla 7-1 Áreas de los patrones utilizados para la calibración del cromatógrafo

	ÁREAS					
		CH ₄	CO ₂	O ₂	H ₂ S	N ₂
Biogás 49.5% CH ₄ , 30% CO ₂ , 0.5% H ₂ S	1	260676	385333	1577	2390	6126
	2	261878	384746	1788	2732	6886
	3	262999	386793	1620	2997	6248
Biogás 70% CH ₄ 30% CO ₂	1	375581	240229	584	0	1836
	2	370911	237944	653	0	2197
	3	370940	237473	541	0	1882
Aire	1	173	1134	130850	0	500549
	2	36	682	132081	0	504626
	3	0	528	131125	0	500986
CH ₄ 4.5 linde	1	533551	626	884	0	2776
	2	536123	634	819	0	2784
	3	539355	666	861	0	3058
10% del biogás 70% + 90% He	1	31849	22544	4441	0	16120
	2	32059	21490	4452	0	15800
	3	31638	20443	4435	0	16062
O ₂ 100%	1	258	946	585769	0	3121
	2	31	279	583620	0	3143
	3	0	170	577242	0	3210
10 % O ₂ + 90% He	1	0	288	55395	0	11900
	2	0	170	55181	0	11437
	3	0	205	54794	0	12050
CO ₂ 100%	1	217	779980	2770	0	7466
	2	177	780429	2052	0	7238
	3	193	789045	2065	0	7451

A continuación, para el cálculo de las concentraciones en g/m³ de cada una de ellas fue necesario obtener una correlación teórica considerando un factor de corrección por presión (Fp). Esta se obtuvo a partir de la presión de la zona en la que se encuentra, en este caso fue Valladolid (710 mmHg) y de la presión estándar.

$$Fp = \frac{\text{Presión Valladolid}}{\text{Presión estándar}} = \frac{710 \text{ mmHg}}{760 \text{ mmHg}} = 0,93 \quad \text{Ecuación 7-1}$$

Para obtener la concentración se partió de la ecuación de los gases ideales (PV=nRT) y haciendo las oportunas transformaciones se obtuvo que la concentración sigue la siguiente ecuación:

$$[\text{conc}] \left(\frac{\text{g}}{\text{m}^3} \right) = \frac{[\text{conc}] \%v/v \cdot Fp \cdot P_{\text{molecular}}}{R \left(\frac{\text{atm} \cdot \text{l}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right) \cdot T(K)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 7-2}$$

Siendo los valores de las constantes:

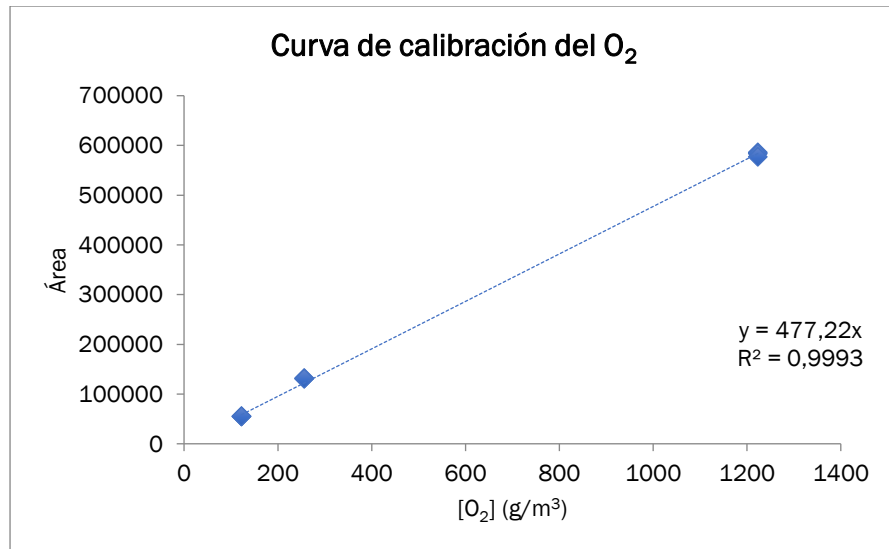
- Fp: 0.93
- Temperatura (T): 25 °C = 298K
- R: 0.082 atm·L/mol·K
- Peso molecular: 16.04 g/mol CH₄; 44.01 g/mol CO₂; 31.998 g/mol O₂; 34.1 g/mol H₂S.

El resultado de las concentraciones fue el siguiente:

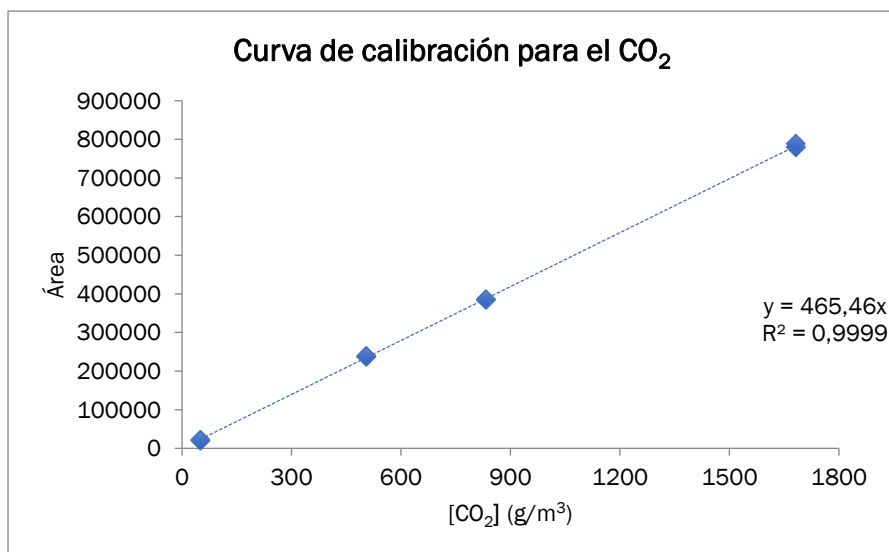
Tabla 7-2 Concentración de los patrones para la calibración del cromatógrafo.

		CONCENTRACIÓN (g/m ³)			
		CH ₄	CO ₂	O ₂	H ₂ S
Biogás 49.5% CH ₄ , 30% CO ₂ , 0.5% H ₂ S	1	306,6	832,9	0,0	6,5
	2	306,6	832,9	0,0	6,5
	3	306,6	832,9	0,0	6,5
Biogás 70% CH ₄ 30% CO ₂	1	429,3	504,8	0,0	0,0
	2	429,3	504,8	0,0	0,0
	3	429,3	504,8	0,0	0,0
Aire	1	0,0	11,7	256,2	0,0
	2	0,0	11,7	256,2	0,0
	3	0,0	11,7	256,2	0,0
CH ₄ 4.5 linde	1	613,2	0,0	0,0	0,0
	2	613,2	0,0	0,0	0,0
	3	613,2	0,0	0,0	0,0
10% del biogás 70% + 90% He	1	42,9	50,5	0,0	0,0
	2	42,9	50,5	0,0	0,0
	3	42,9	50,5	0,0	0,0
O ₂ 100%	1	0,0	0,0	1223,3	0,0
	2	0,0	0,0	1223,3	0,0
	3	0,0	0,0	1223,3	0,0
10 % O ₂ + 90% He	1	0,0	0,0	122,3	0,0
	2	0,0	0,0	122,3	0,0
	3	0,0	0,0	122,3	0,0
CO ₂ 100%	1	0,0	1682,5	0,0	0,0
	2	0,0	1682,5	0,0	0,0
	3	0,0	1682,5	0,0	0,0

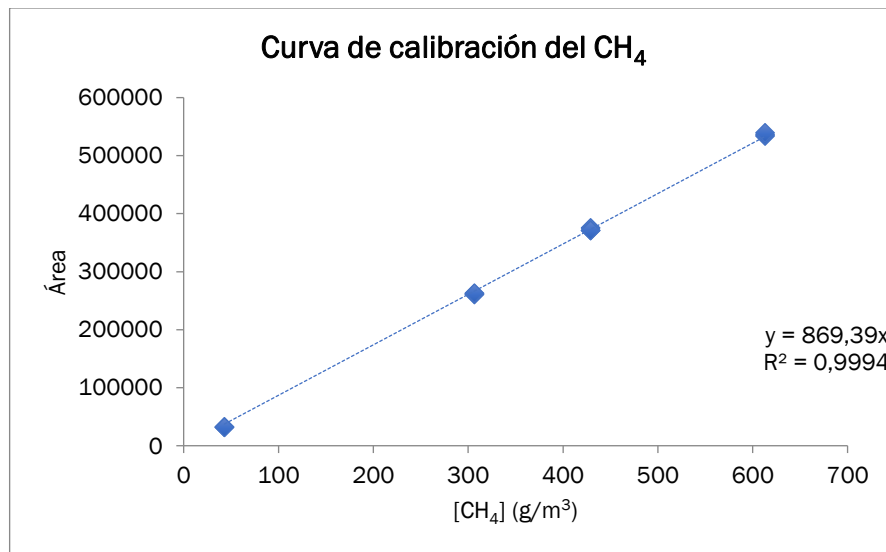
Una vez obtenidas las concentraciones se representó gráficamente el área frente a la concentración y la pendiente obtenida de la recta fue el valor que se utilizará para calcular las concentraciones a partir de las áreas en los experimentos llevados a cabo. El resultado fue el siguiente:



Gráfica 7.1 Curva de calibración para el oxígeno



Gráfica 7.2 Curva de calibración para el dióxido de carbono



Gráfica 7.3 Curva de calibración para el metano

Por último, el resumen de los valores de las pendientes usadas en las rectas de calibración fue:

Tabla 7-3 Valores de las pendientes

	Pendiente
CH ₄	869.39
CO ₂	465.46
O ₂	477.22

7.2 Anexo II. Protocolo de análisis de PHBs

Para llevar a cabo el análisis de PHBs se siguió el protocolo descrito por (Frutos et al., 2017):

PASO 1: TOMA DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

Para la toma de muestra se deben seguir los siguientes pasos:

- Coger 3 mL de muestra
- Dividir la muestra en dos Eppendorf (2 x 1.5 mL)
- Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante y quedarse sólo con el pellet.
- Continuar con la preparación de muestras o congelarlas a 4 °C hasta que se realice la preparación.

PASO 2: PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y PATRONES

Preparar las siguientes disoluciones:

- Disolución 1: propanol ácido. Preparar una disolución de 1-propanol: HCl en la proporción 80:20 utilizando HCl al 37 % (w/v).
- Disolución 2: patrón interno (ácido benzoico). Preparar una disolución de 40g/L de benzoico en 1-propanol (1 g en 25 mL).
- Patrones de co-polímero PHB-PHV (88%PHB-12%PHV). Las muestras deben intentar quedar en la medida de lo posible en el centro de la curva, y al menos 3 patrones serán utilizados en cada análisis. De manera general hay preparados tres patrones en cloroformo (500 ppm, 250 mg/L, 100 mg/L y 10 mg/L). Se recomienda hacer los patrones todos desde la solución madre, no hacer patrones seriados.

Todas estas disoluciones si se conservan deben refrigerarse a 4°C.

1) Preparación de muestras para la digestión:

- Añadir a los pellets que están en los eppendorf 1 mL de disolución 1 (propanol ácido) por muestra.
- Agitar en un vortex hasta completa disolución, aproximadamente 30 segundos. Importante, la biomasa no puede quedar en forma de agregados o flóculos, de lo contrario podría dificultarse la extracción posterior en el digestor.
- Pipetear estas disoluciones a los tubos HATCH del digestor, procurando coger la biomasa que pudiera quedar adherida en las paredes para no subestimar la acumulación.
- Añadir 10 µL de disolución 2 (patrón interno) a cada tubo 2 mL de cloroformo a cada tubo



- Tapar y colocar en el termo-reactor.

2) Preparación de patrones para la digestión

- Pipetear 1 mL de disolución 1 (propanol ácido) a cada tubo HATCH.
- Pipetear 2 mL de cada patrón al tubo HATCH correspondiente.
- Añadir 10 µL de disolución 2 (patrón interno) a cada tubo.
- Tapar y colocar en el digestor.

3) Etapas de digestión

Digerir durante 4 horas a 100°C. Reducir el tiempo de digestión puede llevar a la no extracción de los componentes, principalmente en muestras con alta concentración de biomasa.

4) Etapas post-digestión

Pasadas las 4 horas de digestión seguir los siguientes pasos:

- Dejar enfriar los tubos HATCH a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos).
- Añadir 1 mL de agua Milli-Q en cada tubo y vortear.
- Dejar reposar hasta que se separen dos fases (5-10 min).
- Coger la fase orgánica de cada tubo (la inferior) con pipeta Pasteur y filtrar (con filtros de 0.22 µm)
- Pasar la fase orgánica filtrada a los viales del GCMS.
- Medir las muestras en el GCMS (Figura 3.5.2-1).

PASO 3: ANÁLISIS DE DATOS

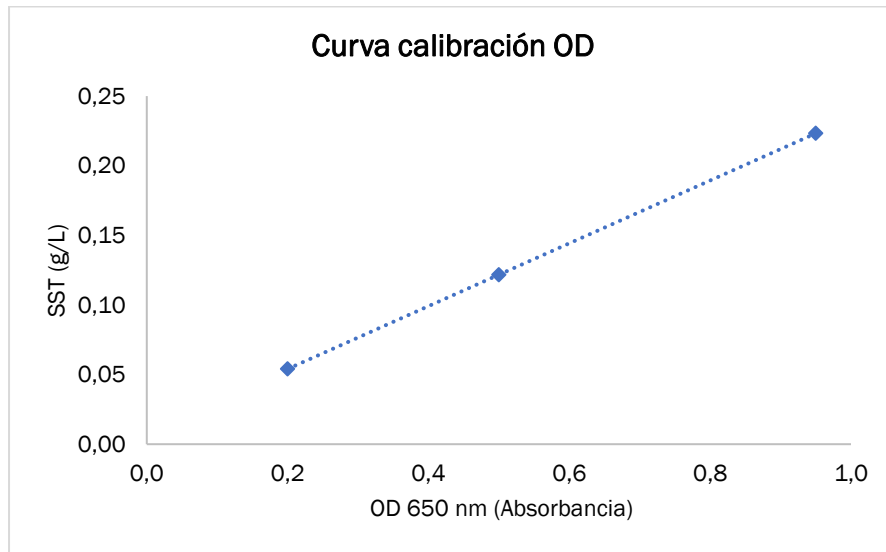
Los resultados obtenidos, a partir del análisis del GCMS, se analizaron con el programa *MassHunter*. Posteriormente se midió la densidad óptica (OD) de cada muestra.

A partir de los datos de la concentración en ppm de PHB en la muestra se obtuvo la masa de PHB con la siguiente ecuación:

$$Masa\ PHB\ (g) = \frac{[PHB\ (\frac{mg}{l})] \cdot 2ml}{10^6} \quad \text{Ecuación 7-3}$$

Siendo [PHB]: concentración de polihidroxiutiratos en mg/L; y los 2ml corresponden con los 2 mL de cloroformo utilizados y donde se han disuelto los PHBs

Y a partir de los datos obtenidos de densidad óptica de cada muestra y con la ecuación obtenida de la calibración para 650nm se obtuvo la masa de sólidos suspendidos totales (SST):



Gráfica 4.4.4-1 Curva de calibración de densidad óptica

La recta de calibración de la densidad óptica fue la siguiente:

$$y = 0.2256 \cdot x + 0.0089 \quad \text{Ecuación 7-4}$$

$$\left[SST \left(\frac{g}{L} \right) \right] = 0.2256 \cdot OD + 0.0089 \quad \text{Ecuación 7-5}$$

La masa de SST se obtuvo a partir de la Ecuación 7-6

$$Masa\ SST\ (g) = \frac{\left[SST \left(\frac{g}{L} \right) \right] \cdot 1.5\ ml}{10^3} \quad \text{Ecuación 7-6}$$

El valor de 1.5 ml corresponde con la cantidad recogida de muestra en cada eppendorf.

Una vez obtenidas las masas de PHBs y de SST, para determinar el porcentaje de PHBs en masa en las muestras solamente hay que aplicar la Ecuación 7-7:

$$\% \frac{W}{SST} PHB = \frac{masa\ PHB\ (g)}{masa\ SST\ (g)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 7-7}$$