



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Evaluación del efecto de agentes
inhibidores en la producción de
poliésteres empleando *Cupriavidus*
Necator

Autor:

Collantes Doyague, María

Tutor 1:

Bolado Rodríguez, Silvia

Tutor 2:

Pérez Fernández, Rebeca

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, Julio 2019.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR



RESUMEN-ABSTRACT

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR



RESUMEN

Este trabajo estudia el efecto de ácido acético y ácido cítrico en el crecimiento de la bacteria *Cupriavidus necator* y en su capacidad de producción de PHB a partir de sustratos azucarados. El crecimiento y acumulación de PHB aumentó con la concentración de glucosa, alcanzándose un máximo de 566 mg/l para una concentración de 20 g/l de glucosa a 24 h. El ácido acético resultó tóxico para el crecimiento en concentraciones mayores de 0,5 g/l, pero se alcanzaron acumulaciones de 3245 mg/L para 15 g/l de glucosa y 0,25 g/l de acético. El ácido cítrico resulta tóxico en concentraciones mayores de 2,5 g/l, con un máximo de PHB de 6357 mg/l para 15 g/l de glucosa y 1 g/l de cítrico.

Cupriavidus necator consumió glucosa, ácido acético y ácido cítrico de hidrolizados de biomasa microalgal crecida en purines y pretratada con molienda y HCl, pero no acumuló PHB.

PALABRAS CLAVE: *Cupriavidus necator*, polihidroxicanoatos, glucosa, ácido acético, ácido cítrico, biomasa microalgal.

ABSTRACT

The work here presented studies the effect of acetic acid and citric acid in the growth of the bacteria *Cupriavidus necator* and its capacity to produce PHB from sugary substracts. The growth and accumulation of PHB increased with a higher glucose concentration, reaching its maximum at 566 mg/l for a concentration of 20 g/l of glucosa for 24 hours. Acetic acid became toxic for the growth from a concentration of 0,5 g/l but accumulations of 3245 mg/l were reached for 15 g/l of glucose and 0,25 g/l of acetic. Citric acid becomes toxic in concentrations higher tan 2,5 g/l, with a PHB maximum of 6357 mg/l for 15 g/l of glucosa and 1 g/l of citric.

Cupriavidus necator consumed glucose, acetic acid and citric acid from hydrolyzates of microalgae biomass grown in slurry and pretreated with bead mil or HCl, but it didn't accumulate PHB.

KEYWORDS: *Cupriavidus necator*, polyhydroxyalkanoates, glucose, acetic acid, citric acid, biomass microalgae.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN-ABSTRACT	3
ÍNDICE	9
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Sacarificación de carbohidratos en biomasa microalgal	19
1.1.1. Tratamientos químicos.....	21
1.1.2. Tratamientos físicos	21
1.1.3. Tratamientos biológicos	22
1.2. PHAs.....	23
1.2.1. Clasificación de PHA.....	24
1.2.2. Biosíntesis de PHB.....	24
1.3. Perspectiva	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MÉTODOS Y MATERIALES	33
3.1. Inóculo	35
3.2. Medios de cultivo	35
3.2.1. Medio 81 para crecimiento celular	35
3.2.2. Medio 81 sin nitrógeno para acumulación de PHAs.....	36
3.2.3. Medio 1 sólido para mantenimiento de la cepa.....	36
3.3. Crecimiento bacteriano	37
3.4. Biomasa	37
3.5. Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con disoluciones modelo..	37
3.5.1. Glucosa.....	37
3.5.2. Ácido acético y glucosa	38
3.5.3. Ácido cítrico y glucosa	38

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

3.5.4.	Ácido acético o ácido cítrico	38
3.6.	Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> usando biomasa microalgal	39
3.6.1.	Experimento 1: Molino de bolas sin buffer+Hidrólisis enzimática	40
3.6.2.	Experimento 2: Molino de bolas con buffer+ Hidrólisis enzimática	40
3.6.3.	Experimento 3: Ácido clorhídrico 2M.....	41
3.6.4.	Experimento 4: Ácido clorhídrico 2M con dilución 1/2.	41
3.6.5.	Experimento 5: Ácido optimizado con ácido clorhídrico 2M.	41
3.6.6.	Experimento 6: Ácido optimizado con dilución 1/2.....	41
3.7.	Métodos analíticos	42
3.7.1.	Recta OD frente a SST	42
3.7.2.	Medición de la concentración de glucosa	42
3.7.3.	Análisis de PHA.....	44
3.7.4.	Análisis de nitrógeno total.	45
3.7.5.	Análisis de concentración de azúcares y ácidos con HPLC	45
4.	RESULTADOS.....	47
4.1.	Glucosa	49
4.1.1.	Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con glucosa a distintos tiempos	49
4.2.	Ácido acético.....	52
4.2.1.	Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con ácido acético con tiempo de crecimiento de 24 horas.....	52
4.2.2.	Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con 7 g/l de glucosa y ácido acético a distintos tiempos.....	52

ÍNDICE

4.2.3. Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con ácido acético y 15 g/l glucosa como fuente de carbono	57
4.3. Ácido cítrico	61
4.3.1. Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con ácido cítrico como fuente de carbono	61
4.3.2. Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con 7 g/l glucosa y ácido cítrico a distintos tiempos	61
4.3.3. Crecimiento de <i>Cupriavidus necator</i> con ácido cítrico y 15 g/l glucosa como fuente de carbono	65
4.4. Biomasa microalgal	69
4.4.1. Experimento 1: Molino de bolas sin buffer	69
4.4.2. Experimento 2: Molino de bolas con buffer	70
4.4.3. Experimento 3: Ácido.....	71
4.4.4. Experimento 4: Ácido dilución 1/2	72
4.4.5. Experimento 5: Ácido optimizado	73
4.4.6. Experimento 6: Ácido optimizado dilución 1/2	74
4.4.7. Comparativa de resultados con biomasa microalgal	76
5. DISCUSIÓN	79
5.1. Glucosa	81
5.2. Ácido acético	82
5.3. Ácido cítrico	82
5.4. Biomasa microalgal	83
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFÍA	89
8. ANEXOS	97
8.1. Anexo I: Calibrado DNS.....	99

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

8.2. Anexo II: Resultados.....	100
8.2.1. Glucosa	100
8.2.2. Ácido acético y 7 g/l glucosa	104
8.2.3. Ácido acético y 15 g/l glucosa.....	108
8.2.4. Ácido cítrico y 7 g/l de glucosa.....	111
8.2.5. Ácido cítrico y 15 g/l de glucosa	114
8.3. Anexo III: Nomenclatura y unidades	117

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX comienza el *boom* expansivo de la industria del petróleo de forma exponencial y miles de productos plásticos, químicos y farmacéuticos se comienzan a desarrollar a partir de combustibles fósiles. Actualmente el 84% del consumo total de energía primaria proviene de la industria de combustibles fósiles, pero las reservas de petróleo y de gas natural se están agotando y sus precios aumentan, así como el crecimiento poblacional y, con ello, la demanda de estos productos (Gomez Millan, 2015).

Sin embargo, este aumento en la demanda supone un crecimiento en la cantidad de residuos plásticos generados, mayormente debido al corto tiempo de vida útil de la mayoría de los productos plásticos. Se estima que un 40% de estos productos tienen un tiempo de vida útil de 1 mes. A pesar de los significantes avances en los últimos años, el 61% del plástico total generado en Europa occidental acaba en vertederos (Achilias et al., 2007). Además, se estima que entre 4,8 y 12,7 millones de toneladas de plástico se acumulan en los océanos (Imagen 1-1), provenientes de fuentes terrestres de 192 países, siendo esta cantidad entre el 1,8%-4,7% de la producción global de plástico en 2010 (Shim et al., 2018). Aunque los plásticos no son biodegradables, sus superficies se deterioran, produciendo numerosos fragmentos de tamaño micro o nanométrico que contaminan las aguas de los océanos (Andrady, 2011).



Imagen 1-1 Contaminación producida por residuos plásticos en zona costera (BBC News, 2017)

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

En paralelo, debido al incremento de la población, aparece un gran aumento en la producción de aguas residuales domésticas. Convencionalmente, se emplea como método de tratamiento para la purificación de las aguas residuales procesos biológicos, como los fangos activos, degradando la materia orgánica en condiciones aeróbicas, procesos físicos, como filtraciones o procesos químicos, como cloración u ozonización. Los productos finales de estos tratamientos, como aguas con nutrientes y compuestos residuales del tratamiento al que son sometidos, se usan frecuentemente para la limpieza o para fertirrigar (Arroyo et al., 2007).

En la actualidad, se están buscando otras alternativas para el tratamiento de estos residuos que permitan una valorización más efectiva de sus componentes con un menor impacto ambiental. Para ello, se ha desarrollado una vía de tratamiento empleando microalgas, una alternativa novedosa basada en la biotecnología sostenible a la que hasta ahora no se ha prestado demasiada atención, pero que cada vez está cobrando más importancia, sobre todo para efluentes como purines, con una elevada concentración de nutrientes (García et al., 2018).

El término algas se refiere a una gran variedad de organismos que contienen clorofila, dando una coloración verdosa al organismo. Las algas se refieren a organismos desde cianobacterias microscópicas a algas gigantes, capaces de convertir la luz solar en energía mediante fotosíntesis (Idris et al., 2018).

Dentro de la clasificación de las algas, las microalgas son organismos unicelulares que pueden ser procariontes, como las cianobacterias, o eucariotes, como las algas verdes (Khan et al., 2018).

La importancia de las microalgas como fuente de energía renovable es el aumento de la producción de biomasa microalgal por unidad de volumen. Alcanzando alta productividad en sistema reales implicaría la existencia de biocombustibles renovables y baratos (Khan et al., 2018).

Las especies de algas más frecuentes encontradas en el tratamiento de aguas residuales son *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*,

INTRODUCCIÓN

Chlamydomonas, *Oscillatoria*, *Microtinium* y *Golenkinia* (Abdel-Raouf et al., 2012).

Uno de los métodos de tratamiento de aguas residuales con algas es el uso de fotobiorreactores como HRAP (*High rate algae pond*) (Imagen 1-2). Los sistemas de HRAP usan agua procedente de plantas de tratamiento de aguas residuales para el crecimiento de microalgas (Toledo-Cervantes et al., 2017).

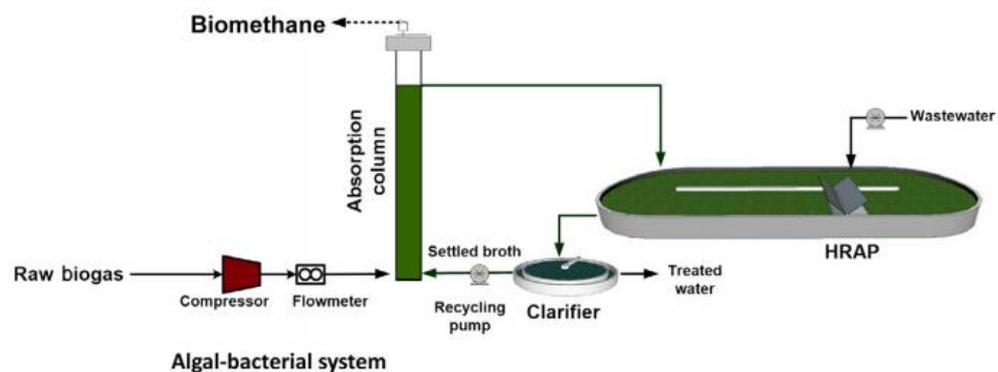


Imagen 1-2 Instalación de HRAP en una planta de tratamiento de aguas residuales

Oswald y Goluke (1960) propusieron el primer consorcio de algas-bacterias en HRAPs para el tratamiento de aguas residuales acoplado a la depuración de biogás. De esta forma el dióxido de carbono formado con el biogás es transferido al HRAP, solucionando así las limitaciones de carbono que se producían con frecuencia en este tipo de sistemas (Toledo-Cervantes et al., 2017).

En estos sistemas, la fotosíntesis de las algas produce el oxígeno necesario para la degradación de materia orgánica de bacterias heterótrofas y los nutrientes y el dióxido de carbono son asimilados por las algas (Fonseca Santiago et al., 2013). La producción de microalgas en consorcio con otros microorganismos puede representar una alternativa para reducir los costes del proceso de obtención de biocombustibles, ya que presenta ventajas competitivas como la menor influencia en fluctuaciones medioambientales y mayor facilidad de cosecha y procesado de la biomasa (Pires et al., 2013).

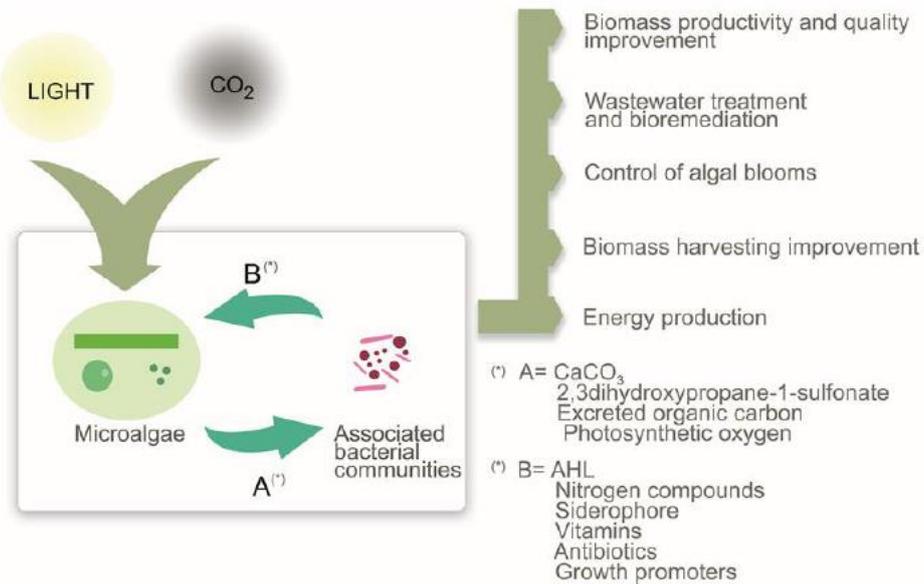


Imagen 1-3 Simbiosis de microalga con bacteria (Fuentes et al., 2016)

Este tipo de estudios se han llevado también a cabo para aguas procedentes del tratamiento de purines. Los resultados obtenidos para un fotobiorreactor trabajando con *Chrorella vulgaris* como especie dominante fueron 94±1% de eliminación de carbono orgánico total, 100% de eliminación del fósforo total y 72±8% del nitrógeno total (García et al., 2017).

El uso de agua fresca para la producción de biomasa microalgal es el principal problema en su obtención. Para conseguir un kilogramo de biomasa se necesitan, aproximadamente, 1,5 litros de agua. Debido a esto, surge la importancia del uso de aguas residuales que permitan la reutilización de nutrientes, disminuyendo así el coste de producción de la biomasa (Fonseca Santiago et al., 2013).

El cultivo de microalgas en un sistema de bioingeniería depende principalmente de los siguientes parámetros:

- **Intensidad lumínica:** La luz es la fuente de energía principal para la proliferación de células fototróficas en las microalgas. El acceso de las microalgas a la luz es un factor crítico, ya que bajas intensidades de luz pueden provocar menores tasas de crecimiento de la microalga. Aunque la sensibilidad fotosintética de estas células

INTRODUCCIÓN

aumenta con el aumento de la intensidad lumínica, se alcanza un umbral cuando la fotosensibilidad se satura y aparece una fotoinhibición. A partir de este punto, los rayos de luz pueden provocar un daño irreversible a los receptores de luz de los cloroplastos y disminuir instantáneamente la velocidad de fotosíntesis (Dismukes et al., 2008).

- **Nutrientes:** Diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos, vitaminas o elementos traza son necesarios para obtener una alta producción de biomasa. La mayoría de los sistemas de cultivo de microalgas añaden nitrógeno y fósforo con un ratio de 16N:1P, añadiendo así los nutrientes en exceso para evitar la limitación. Además, se añaden metales traza, incluyendo hierro, níquel, manganeso, selenio, cobalto o zinc como suplementos a los micronutrientes (Molina Grima et al., 2003)
- **Temperatura:** La temperatura es un factor clave en la limitación del crecimiento de biomasa. El crecimiento de las microalgas aumenta exponencialmente con el aumento de temperatura. Debido a la importancia de este parámetro, el crecimiento de microalgas debería ser aclimatado a temperatura ambiente para evitar un sobrecrecimiento de las microalgas (Cherubini, 2010). El rango de temperaturas óptimo es entre 20°C y 35°C (van Harmelen and Oonk, 2006).
- **Ratio de intercambio de gas:** Las microalgas tienen la capacidad de eliminar dióxido de carbono de forma más eficiente que cualquier otro organismo litótrofo (Park and Li, 2012). Durante la fotosíntesis hay una fijación de dióxido de carbono y una liberación de oxígeno. Cuando el flujo de oxígeno alcanza altas concentraciones, la clorofila sufre daños oxidativos, provocando la inhibición de la fotosíntesis y una producción menor de biomasa (Mendes et al., 2003).

1.1. Sacarificación de carbohidratos en biomasa microalgal

Las microalgas están compuestas mayoritariamente por proteínas (6-52%), carbohidratos (7-23%) y lípidos (5-23%) (Tijani et al., 2015), todas ellas

intracelulares, por lo que se requiere una ruptura de la pared celular para poder acceder a ellos.

La pared celular de las microalgas se compone por un 30-37% de carbohidratos y 1-37% de proteínas, siendo aproximadamente el 12-36% de su masa celular (Domozych et al., 2012). El tipo de pared celular determina el tipo de pretratamiento físico, químico, biológico o combinado para su ruptura. Basándose en la complejidad de la estructura de la superficie, se distinguen cuatro tipos de células (Imagen 1-4).

- I. La membrana celular simple, que consiste en una agrupación en forma de bicapa lipídica con proteínas integradas y periféricas.
- II. La membrana celular con material extracelular adicional, presente en cianobacterias y diversos tipos de algas, con una estructura de seis capas.
- III. La membrana celular con material adicional intracelular, cuya capa protectora se compone mayormente por celulosa.
- IV. La membrana celular con material intracelular y extracelular, presente en *Euglenoides* y *Cytophytas* (D'Hondt et al., 2017).

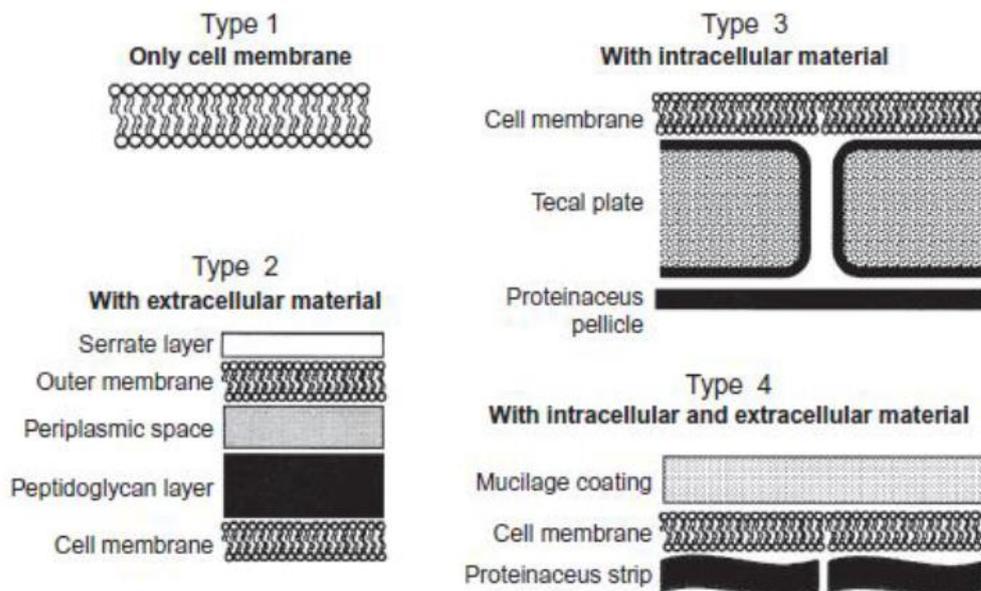


Imagen 1-4 Tipos de membranas celulares en las microalgas (D'Hondt et al., 2017).

INTRODUCCIÓN

Se han probado numerosas técnicas de ruptura de pared celular para encontrar la forma más efectiva de extraer productos intracelulares de las microalgas, dividiendo los tratamientos en tres grandes grupos: químicos, físicos y biológicos.

1.1.1. Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos basan su fundamento en la interacción de una gran variedad de compuestos como antibióticos, detergentes, agentes oxidantes, ácidos o bases con los componentes de la membrana, produciendo así la ruptura de ésta. Los métodos químicos son más selectivos que los métodos mecánicos, ya que normalmente dependen de interacciones específicas con los constituyentes de la pared celular. Uno de los pretratamientos químicos más frecuente es el pretratamiento con ácidos. El ácido sulfúrico y clorhídrico son los más utilizados. Estos pretratamientos, aunque más rápidos, presentan generación de inhibidores, corrosión de equipos o elevado coste de operación, además de una selectividad baja (Günerken et al., 2015).

1.1.2. Tratamientos físicos

Los tratamientos físicos presentan la ventaja de una baja contaminación de producto y poca dependencia en el tipo de alga en la elección del tratamiento comparado con los pretratamientos químicos o biológicos, los cuales requieren equipos más sofisticados y mayor energía, produciendo un calor que puede dañar el producto final. Se clasifican basados en las fuerzas que provocan la ruptura de la pared celular, subdividiéndolos en mecánicos y térmicos.

En los pretratamientos térmicos, las células se rompen usando calor o frío. Los métodos en los que se emplean altas temperaturas ofrecen mejores resultados frente a los tratamientos que emplean frío en la ruptura de la pared celular y son usados frecuentemente en la producción de biogás (D'Hondt et al., 2017).

Dentro de los procesos mecánicos se destaca el molino de bolas, que consiste en un equipo cilíndrico que gira sobre un eje de manera horizontal con bolas, generalmente de cerámica o porcelana, en su interior. Estas bolas

impactan con las células, rompiendo la pared celular y liberando el contenido intracelular (Postma et al., 2017).

1.1.3. Tratamientos biológicos

Por último, en los tratamientos biológicos cabe destacar la hidrólisis enzimática, la cual se aplica en solitario o como pretratamiento complementario a otro tipo de pretratamiento. La hidrólisis se usa no sólo para la ruptura de la pared celular, si no para la sacarización de azúcares complejos en monosacáridos, proteínas en aminoácidos y lípidos en ácidos grasos.

Martín Juárez et al., (2016) estudiaron el efecto de la hidrólisis enzimática utilizando como enzima *Celluclast 1,5L*, en biomasa microalgal obtenida del tratamiento de aguas residuales. Cuando se realiza una hidrólisis enzimática como pretratamiento único se observó que, cuando se realiza una hidrólisis enzimática como único pretratamiento, el azúcar obtenido alcanza valores de hasta un 93,6%, mientras que, con un pretratamiento previo a la hidrólisis (tanto alcalino como con peróxido), el rango obtenido de azúcares es de 63,7-78,8%. Sin embargo, con un pretratamiento previo a la hidrólisis se obtiene mayor cantidad de ácidos orgánicos, por la rápida oxidación de los azúcares, principalmente obteniendo ácido acético, fórmico y butírico.

A la hora de plantear nuestro estudio nos hemos basado en resultados previos (artículo en revisión), donde se estudió las concentraciones de glucosa y VFAs presentes en biomasa microalgal tras varios pretratamientos (molino de bolas, tratamiento con ácido clorhídrico 2M e hidrólisis enzimática). Como se puede ver en la Tabla 1-1, los valores más altos de VFAs fueron de ácido cítrico y ácido acético, por eso nuestro estudio se basará en la evaluación de estos dos ácidos como inhibidores de la producción de poliésteres.

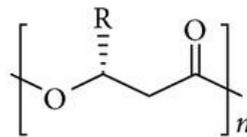
INTRODUCCIÓN

Tabla 1-1 Datos preliminares de biomasa microalgal

	Glucosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Ácido cítrico (g/l)	Ácido láctico (g/l)	Ácido succínico (g/l)	Ácido fórmico (g/l)	Ácido butírico (g/l)	Ácido oxálico (g/l)
Molino de bolas	1,09±	0,24±	0,05±	0,22±	0,05±	0,16±	0,13±	0,03±
	0,14	0,09	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01	0,00
Molino de bolas+Hidrólisis enzimática	3	0,36±	10,5	0,36±	0,55±	0,26±	0,23±	0,32±
		0,11		0,02	0,10	0,02	0,01	0,09
HCl 2M (a)	15	0,68	n.d.	0,41	0,11	0,64	n.d.	1,44
HCl 2M (b)	7	1,01	0,26	0,21±	0,11±	0,64±	n.d.	1,44±
				0,06	0,02	0,16		0,30

1.2. PHAs

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres lineales compuestos por hidroxiácidos grasos (Imagen 1-5) y que representan un tipo complejo de almacenamiento de poliésteres. Poli-β-hidroxibutirato (PHB) es el PHA más conocido (Poli et al., 2011).



Poly(3-hydroxyalkanoates) [PHA]

R group	Poly(3-hydroxyalkanoates)	PHA
—CH ₃	Poly(3-hydroxyvalerate)	PHV
—(CH ₂) ₂ —CH ₃	Poly(3-hydroxyhexanoate)	PHHex
—(CH ₂) ₄ —CH ₃	Poly(3-hydroxyoctanoate)	PHO
—(CH ₂) ₆ —CH ₃	Poly(3-hydroxydecanoate)	PHD
—CH ₂ — 	Poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate)	PHPV

Imagen 1-5 Esquema general de distintos tipos de PHA(Shrivastav et al., 2013)

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

1.2.1. Clasificación de PHA

Los PHA se clasifican en PHA de cadena corta (SCL-PHA), cadena media (MCL-PHA) y cadena larga (LCL-PHA) basándose en la composición monomérica de los polímeros (Imagen 1-6).

Los polímeros de cadena corta consisten en subunidades de ácidos grasos 3-hidroxi que contienen entre 6 y 16 carbonos. PHB es un homopolímero que contiene cuatro subunidades de 3-hidroxi butirato (3HB). Es altamente cristalino y, como consecuencia, quebradizo y rígido. La incorporación de 3-hidroxi valerato (3HV) a polímeros PHB resulta en un poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) o P(3HB/3HV), que es menos rígido que los PHB (Kootstra et al., 2017).

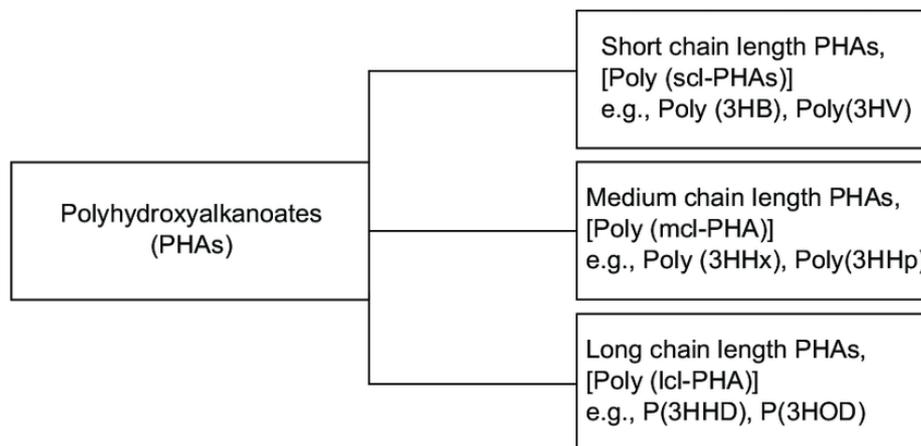


Imagen 1-6 Clasificación de PHAs (Marjadi, D; Dharaiya, 2018)

1.2.2. Biosíntesis de PHB

Existen más de 250 diferentes cepas capaces de producir PHA de forma natural, pero solo unas pocas bacterias son utilizadas en su producción. Entre estas se incluye *Alcaligenes latus*, *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator* y *Pseudomonas oleovorans*, las cuales son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono incluyendo aceites vegetales o residuos para producir PHA. *Cupriavidus necator* es la más ampliamente estudiada y usada. (Ramsay et al., 1990)

La acumulación de PHB ocurre a partir de una limitación de nutrientes en el medio de crecimiento de la bacteria. Esta limitación provoca un efecto de

INTRODUCCIÓN

estrés y, como consecuencia, la acumulación de carbohidratos en forma de PHA. Cuando la bacteria *Chlorella vulgaris* se somete a un estrés mediante la limitación de nitrógeno, se observa que la acumulación de carbohidratos como PHA en la célula aumenta de un 20% a un 43% (De Farias Silva and Sforza, 2016).

Otro tipo de limitación de nutrientes se estudió con la bacteria *Noscot muscorum*, provocando un estrés a la bacteria mediante una limitación de nitrógeno y fósforo, provocando un incremento del 35% en la producción de PHB cuando la limitación realizada fue de dos nutrientes frente a una limitación de nitrógeno (Sharma and Mallick, 2005).

En la mayoría de las bacterias, los PHB se producen mediante una reacción en tres pasos (Imagen 1-7), partiendo del acetil-CoA. En el primer paso, dos moléculas de acetil-CoA se condensan en una reacción catalizada por 3-cetotiolasa. A continuación, el acetoacetyl-CoA generado es estereoselectivamente reducido a (R)-3-hidroxi-butilo-CoA. Finalmente, los monómeros se polimerizan por un PHB-sintetasa, liberando PHB y CoA libre como productos (Bugnicourt et al., 2014).

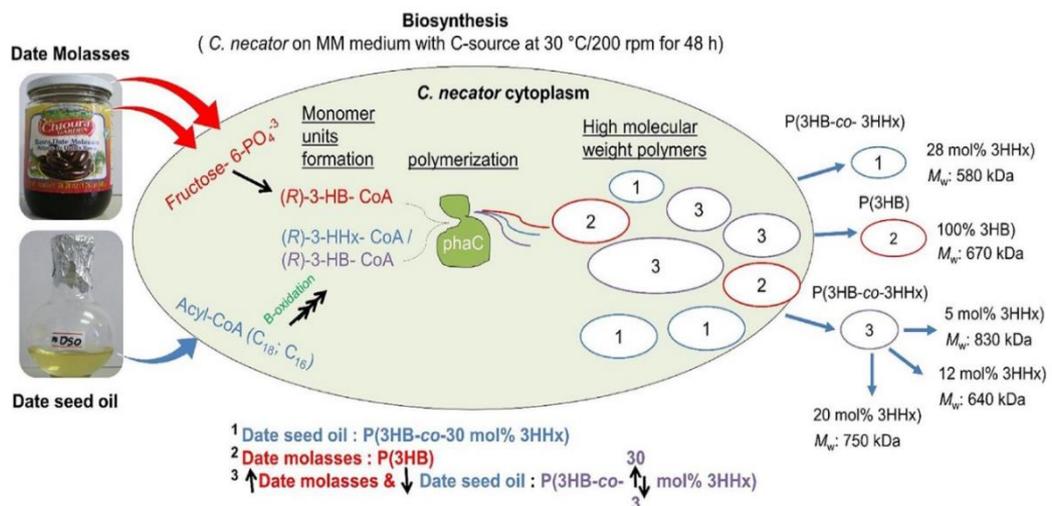


Imagen 1-7 Esquema de la producción de PHA en una célula de *Cupriavidus Necator* (Purama et al., 2018).

Se han buscado formas de producción de PHB alternativas al uso de materias primas puras, como el uso de algas.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

Se ha comprobado la capacidad de la bacteria *Cupriavidus necator* para crecer y acumular PHB usando como fuente de carbono primaria biomasa residual, como el glicerol derivado de la producción de biodiésel a partir de ácidos vegetales refinados, frente al uso de materias primas comerciales, como el glicerol puro. Bajo las mismas condiciones de cultivo, se obtiene que el glicerol residual de la industria provoca mejor productividad en las células que glicerol comercial. Aunque se obtiene la misma tasa de acumulación, el periodo de acumulación del glicerol residual fue casi la mitad que el observado en el glicerol comercial. Debido a que el residual presenta bajas concentraciones de sodio, esto y otros posibles contaminantes se acumulan en el medio durante el crecimiento y, a partir de cierta concentración, inhibe la acumulación o tiene un efecto negativo en las células (Gahlawat and Soni, 2017).

En un estudio realizado por Mozumder et al., (2015) se estudió el efecto del sodio en el crecimiento y acumulación de PHB de *Cupriavidus necator* usando como fuente de carbono glucosa o glicerol residual procedente de la industria del biodiesel con una pureza del 85%, donde se comprobó que un aumento en la concentración de sodio en el medio en el que se encuentra la bacteria provoca una inhibición no lineal en el crecimiento de la bacteria, la cual alcanza su crecimiento máximo a las 45 horas. A partir de la concentración de 8,9 g/l de sodio, el crecimiento de la bacteria permanece constante. Para favorecer la acumulación de PHB se limita el nitrógeno en el medio y se comprueba que la inhibición en la acumulación de PHB sí que presenta un modelo lineal.

Azizi et al., (2017) estudiaron la acumulación de PHB en *Cupriavidus necator* utilizando como fuente de carbono los azúcares incluidos en el alga marrón *Sargassum* sp. previamente sometida a un pretratamiento ácido y una sacarificación enzimática. Usando ácido clorhídrico para el pretratamiento ácido, se obtuvo una concentración de $9,53 \pm 0,21$ g/l de azúcares simples. La posterior sacarificación enzimática aumento la concentración de azúcares hasta valores de $17 \pm 0,1$ g/l. Se demostró que una dilución del hidrolizado del 10% se producía más PHB que el producido con azúcares puros.

Otras materias primas estudiadas en la producción de PHA han sido aceites y grasas residuales de la industria alimentaria (Povolo, 2015). Se estudió la

INTRODUCCIÓN

capacidad de crecimiento de *C. necator* con 24 horas de crecimiento a 30 °C y 150 rpm de agitación, usando 20 g/l de glucosa como fuente de carbono y tiempos de acumulación de 48-72 horas realizando una limitación de nitrógeno en el medio y añadiendo como fuente de carbono diferentes clases de aceites residuales de la industria del biodiesel. Añadiendo un suplemento del 2,5% el volumen de biodiesel como cosustrato, el crecimiento de la bacteria era mayor. También se comprobó un buen crecimiento en grasa animal, por lo que se comprobó que *C. necator* puede crear sus propias lipasas para la formación de PHA.

1.3. Perspectiva

El uso de biomasa microalgal procedente de aguas residuales supone la solución a dos problemas de forma simultánea. Por una parte, el crecimiento de algas mediante el uso de aguas residuales reduce la cantidad de materias primas puras necesarias para el crecimiento tradicional de la biomasa microalgal, aportando dichas aguas todos los nutrientes necesarios para el crecimiento.

Por otra parte, la producción de PHA a nivel industrial supondría una reducción en la producción de polímeros no biodegradables. Además, la producción de biopolímeros a partir de residuos procedentes de diferentes industrias reduciría la necesidad de materias primas para el crecimiento de las bacterias y formación de PHA, fomentando así la economía circular.

La finalidad de este estudio es la evaluación del efecto de algunos de estos inhibidores, como es el caso de VFAs como ácido acético y ácido cítrico presentes en la biomasa algal en elevada proporción para poderse usar como sustrato para el crecimiento de la bacteria y posterior estudio de la producción de PHA.

El crecimiento de *Cupriavidus necator* y la acumulación de PHB se estudia en dos fases, una primera de crecimiento de la bacteria y una segunda fase en la que se limita el nitrógeno del medio para provocar una situación de estrés en la bacteria y, así, favorecer la acumulación de PHA (Imagen 1-8).

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

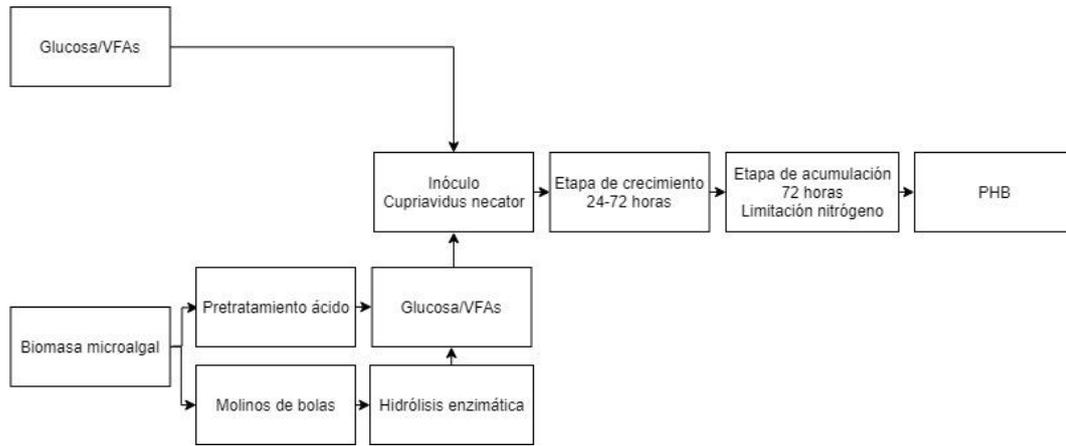


Imagen 1-8 Esquema de producción de PHB

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo es evaluar el crecimiento y acumulación de PHAs en la bacteria *Cupriavidus Necator* utilizando como sustrato hidrolizados de biomasa residual con elevados contenidos de azúcares, analizando el efecto de diferentes inhibidores, como el ácido acético y el ácido cítrico, habitualmente presentes en estos hidrolizados.

- I. Estudiar el crecimiento y producción de PHA de la bacteria en medios modelo trabajando con diferentes concentraciones de glucosa.
- II. Evaluar el efecto de ácidos habitualmente presentes en la biomasa residual a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de la bacteria y la producción de PHA en disoluciones modelo de glucosa.
- III. Evaluar el crecimiento de la bacteria y la producción de PHA en disoluciones de azúcares procedente de una biomasa residual real, como es la biomasa algal crecida en plantas de tratamiento de purines.

3. MÉTODOS Y MATERIALES

3. MÉTODOS Y MATERIALES

3.1. Inóculo

Para la producción de PHAs se utiliza la bacteria *Cupriavidus necator* (cepa DSM 545) que se obtuvo del catálogo de DMSZ. Sus condiciones de crecimiento óptimas son 30 °C a pH neutro y agitación de 150 rpm.

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Medio 81 para crecimiento celular

El medio utilizado para el crecimiento de la bacteria es el recomendado por DSMZ el **medio 81**, siendo un medio mineral para crecimiento quimiolitótrofo.

Las disoluciones usadas para preparar el medio son las siguientes (Tabla 3-1):

Tabla 3-1 Disoluciones para la preparación de medio 81

Disolución	Soluto	Masa/Volumen	Disolvente
Disolución A	KH_2PO_4	2,300 g	Hasta 50 ml de agua destilada
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,900 g	
Disolución B	NH_4Cl	1,000 g	Hasta 915 ml de agua destilada
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,500 g	
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,010 g	
	$\text{NaVO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,005 g	
	Disolución traza SL-6	5 ml	
Disolución C	$(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$	0,050 g	Hasta 20 ml de agua destilada
Disolución D	NaHCO_3	0,0125 g	Hasta 250 ml de agua destilada

Para la preparación de la disolución B se necesita la disolución de traza SL-6 (Tabla 3-2).

Tabla 3-2 Preparación de la disolución traza SL-6

Soluto	Masa	Disolvente
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,10 g	1000 ml de agua destilada
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,03 g	
H ₃ BO ₃	0,30 g	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,20 g	
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 g	
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,02 g	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,03 g	

Las disoluciones se esterilizan en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y, una vez frías, se mezclan las disoluciones A, B y C y se añaden 10 ml de la disolución D previamente filtrada con un filtro de nylon de 0,22 µm, todo en condiciones de esterilidad en la cabina de flujo laminar. El pH final del medio se ajusta a 6,8.

Todos los productos químicos necesarios para la preparación de los medios se compraron en PANREAC (Barcelona, España).

3.2.2. Medio 81 sin nitrógeno para acumulación de PHAs

El medio sin nitrógeno para la acumulación de PHA se prepara como el **medio 81** sin añadir la disolución C y el cloruro de amonio de la disolución B para retirar todo el nitrógeno presente en el medio. El pH final del medio se ajusta a 6,8.

3.2.3. Medio 1 sólido para mantenimiento de la cepa

El medio de mantenimiento de la cepa *Cupriavidus necator* es un medio sólido con agar, se prepara siguiendo las recomendaciones de DMSZ (Tabla 3-3).

Tabla 3-3 Preparación del medio 1

Soluto	Masa	Disolvente
Peptona	5,0 g	Hasta 1000 ml de agua destilada
Extracto de carne	3,0 g	
Agar bacteriológico	15,0 g	

El pH del medio se ajusta a 7. El medio se esteriliza a 121 °C durante 20 minutos.

Todos los productos químicos necesarios para la preparación del **medio 1** se compraron en PANREAC (Barcelona, España).

3.3.Crecimiento bacteriano

Las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria en el **medio 81** (medio líquido) son pH 6,8, temperatura de 30 °C y agitación a 150rpm en un agitador.

Para mantener la bacteria en el **medio 1** (medio sólido) la bacteria crece en placa durante 24 horas a 30 °C en estufa y posteriormente se conserva la placa a 4 °C.

3.4.Biomasa

Como biomasa residual se ha utilizado biomasa microalgal procedente de un fotobiorreactor inclinado en capa fina y alimentado con agua procedente del tratamiento de purines. La composición de esta biomasa es: 19,31% carbohidratos, 51,73% proteínas, 12,41% lípidos y 16,32% sólidos totales. El tipo de microalga mayoritaria resultó *Scenedesmus almeriense*. La biomasa fue proporcionada por la Fundación Cajamar (Almería).

3.5.Crecimiento de *Cupriavidus necator* con disoluciones modelo

3.5.1. Glucosa

Para ver el efecto de la glucosa sobre el crecimiento de *Cupriavidus Necator* y la producción de PHA se ponen cultivos en Erlenmeyer de 250 ml que se inoculan con 5 ml del cultivo de *Cupriavidus* en fase exponencial y 45 ml del **medio 81 con nitrógeno** y diferentes concentraciones de glucosa en un intervalo en el que se encuentren las concentraciones de glucosa obtenidas en estudios previos de pretratamientos de biomasa microalgal (Tabla 1-1): 20 g/l, 15 g/l, 10 g/l, 7 g/l, 5 g/l y 2,5 g/l, además de un blanco, sin glucosa. El experimento se realiza por triplicados durante 24 o 72 horas de crecimiento.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO *CUPRIAVIDUS NECATOR*

Después del tiempo de crecimiento, se toman 2 ml de muestra para medir la densidad óptica y el volumen restante se centrifuga a 4000g y 4°C durante 5 minutos para precipitar la biomasa. Estos pellets se pasan a erlenmeyers de 250 ml con 50 ml del **medio 81 sin nitrógeno** y se añade la glucosa correspondiente para cada concentración. Dichos erlenmeyers se mantienen en las mismas condiciones durante 72 horas.

Pasadas las 72 horas, se toman 2 ml de la muestra para análisis de PHB por triplicado.

3.5.2. *Ácido acético y glucosa*

Para estudiar el efecto que tiene la presencia de ácido acético además de glucosa en el crecimiento de la bacteria, se inoculan erlenmeyers de 250 ml con 5 ml del cultivo de *Cupriavidus necator* con 45ml del **medio 81 con nitrógeno**. Las concentraciones de glucosa estudiadas fueron 7 g/l y 15 g/l y las de ácido acético 0,25 g/l, 0,5 g/l, 0,75 g/l y 1 g/l basándonos en las concentraciones de glucosa y ácido acético obtenidas de estudios previos sobre pretratamientos a biomasa microalgal (Tabla 1-1).

Se procede de la misma forma indicada anteriormente en el **punto 3.5.1** para el cambio de medio y la extracción de la muestra para PHB.

3.5.3. *Ácido cítrico y glucosa*

Se procede como en el **punto 3.5.3**, en este caso las concentraciones de glucosa estudiadas son 7 g/l y 15 g/l y las de ácido cítrico 0,5 g/l, 1 g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 7,5 g/l y 10g/l basándonos, de nuevo, en datos preliminares sobre concentraciones obtenidas tras pretratamientos (Tabla 1-1).

El modo de operación es el indicado en el **punto 3.5.1**.

3.5.4. *Ácido acético o ácido cítrico*

Se estudia el posible efecto sobre el crecimiento de *Cupriavidus necator* usando ácido acético o ácido cítrico como fuente de carbono. Se estudian las concentraciones 0,25 g/l, 0,5 g/l y 0,75 g/l para el ácido acético y 1 g/l y 2,5 g/l para ácido cítrico, concentraciones para las cuales se obtuvo crecimiento

de la bacteria cuando se emplearon dichas concentraciones junto a glucosa como fuente de carbono.

Se toman muestras a las 24 horas de 2 ml para medir su densidad óptica, así como su nitrógeno total. Se va tomando muestras cada 24 horas.

3.6. Crecimiento de *Cupriavidus necator* usando biomasa microalgal

Se hacen diferentes pretratamientos de la biomasa microalgal para producir la ruptura de la pared celular y liberar los azúcares de la célula. Los pretratamientos realizados aparecen resumidos en la

Tabla 3-4. Los pretratamientos seleccionados son aquellos que, basándose en estudios anteriores, presentan concentraciones de glucosa y VFAs adecuadas para el crecimiento de *Cupriavidus necator*. Para cada experimento se ponen 45 ml del pretratamiento y 5 ml de *Cupriavidus*. Los experimentos se hacen por triplicado.

Tabla 3-4 Resumen de experimentos con hidrolizados

Experimento	Medio
1	Molino de bolas sin buffer+Hidrólisis enzimática
2	Molino de bolas con buffer+Hidrólisis enzimática
3	Ácido
4	Ácido con dilución 1/2
5	Ácido optimizado
6	Ácido optimizado con dilución 1/2

El tiempo de crecimiento de *Cupriavidus* fue de 72 horas en un medio con nitrógeno, ya que se observó un mayor crecimiento de la bacteria para mayores tiempos de crecimiento. Posteriormente se estudió la acumulación de PHAs también a 72 horas, 30 °C y 150 rpm (Povolo, 2015), usando el **medio 81 sin nitrógeno**. El procedimiento de cambio de medio y de extracción de muestras para PHA es el mismo que en casos anteriores.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR*3.6.1. Experimento 1: Molino de bolas sin buffer+Hidrólisis enzimática*

En botellas de vidrio de 500 ml se añade una solución de alga al 5% en peso seco y se añade agua hasta los 250 gramos. La solución se pone en el molino de bolas, consistente en un equipo cilíndrico que gira sobre un eje de manera horizontal durante 5 minutos con bolas pequeñas ($d=1,25$ mm). Estas bolas impactan con las células, rompiendo la pared celular y liberando el contenido intracelular. Se mide el pH de salida y se sacan 2 ml para hacer análisis de HPLC y de DNS (Postma et al., 2017).

El pH de la solución se ajusta a 4,8 con HCl 5M.

Posteriormente, se realiza una hidrólisis en erlenmeyers de 100 ml, a los que se añaden 25 gramos de la disolución obtenida del pretratamiento del molino de bolas y 10,2 μ l de enzima Celluclast 1,5L, que divide la celulosa en sus azúcares simples (Enzymes for education, 2018). Los erlenmeyers se ponen en el incubador a 50°C y 300 rpm durante 12 horas (Martín Juárez et al., 2016).

Pasado este tiempo se juntan los erlenmeyers para homogeneizar la solución y se toman muestras para HPLC y DNS y se ajusta el pH a 6,8.

3.6.2. Experimento 2: Molino de bolas con buffer+ Hidrólisis enzimática

En botellas de vidrio de 500 ml se añade una solución de alga al 5% en peso seco y se añade agua hasta los 250 gramos. La solución se pone en el molino de bolas durante 5 minutos con bolas pequeñas ($d=1,25$ mm) y se mide el pH de salida. Se sacan 2 ml para hacer análisis de HPLC y de DNS.

El pH de salida del molino es básico y se ajusta a 4,8 con HCl 5M, pH óptimo de la enzima Celluclast, la cual rompe la celulosa en azúcares simples. A esta suspensión se le añaden 12,5 μ l de Buffer citrato 1M, preparado con 210 gramos de citrato ácido monohidratado en 750 ml de agua ultrapura y al cual se ajusta el pH a 4,5 con hidróxido de sodio, y 10,2 μ l de enzima Celluclast 1,5L (Enzymes for education, 2018). Los erlenmeyers se ponen en el incubador a 50°C y 300 rpm durante 12 horas (Martín Juárez et al., 2016).

MÉTODOS Y MATERIALES

Pasado este tiempo se juntan los erlenmeyers para homogeneizar la solución y se toman muestras para HPLC y DNS y se ajusta el pH a 6,8.

3.6.3. *Experimento 3: Ácido clorhídrico 2M*

Este experimento se corresponde con el pretratamiento de ácido clorhídrico 2M (a), del cual se incluyen las concentraciones de glucosa y VFAs en la Tabla 1-1. En botellas de 500 ml se prepara una solución al 5% en peso seco de alga y se rellena hasta 250 gramos con ácido clorhídrico 2M. Se autoclavan las botellas durante 1 horas a 121 °C. Cuando se enfría la solución, se ajusta el pH a 6,8. Se toman 2 ml para hacer análisis de HPLC y de DNS (Martín Juárez et al., 2018).

3.6.4. *Experimento 4: Ácido clorhídrico 2M con dilución 1/2.*

Se realiza el pretratamiento correspondiente con el experimento 3, realizando una dilución de un medio al líquido obtenido al final del tratamiento con el **medio 81** con nitrógeno, con la finalidad de reducir la concentración de ácidos acético y cítrico presente en la solución final, basándonos en los resultados previos de concentración de glucosa y VFAs tras los pretratamientos (Tabla 1-1)

3.6.5. *Experimento 5: Ácido optimizado con ácido clorhídrico 2M.*

Este experimento se corresponde con el pretratamiento de ácido clorhídrico 2M (b), del cual se incluyen las concentraciones de glucosa y VFAs en la Tabla 1-1. En botellas de 500 ml se prepara una solución de 7,5% en peso seco de alga y se rellena hasta 250 gramos con HCl 2M. Se autoclavan durante 10 minutos a 121 °C y se ajusta el pH a 6,8. Se sacan ml para hacer análisis de HPLC y de DNS.

3.6.6. *Experimento 6: Ácido optimizado con dilución 1/2.*

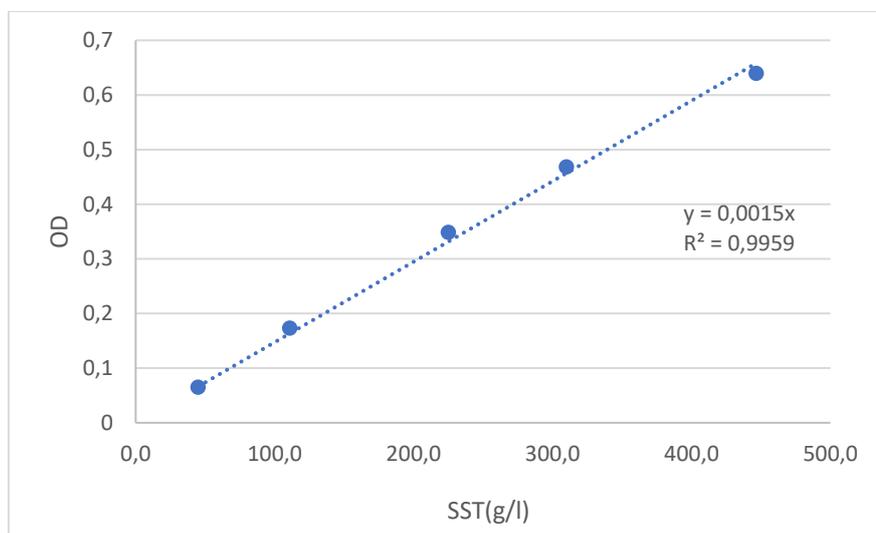
Se realiza el pretratamiento correspondiente con el experimento 5, realizando al líquido obtenido al final del tratamiento una dilución a un medio para reducir la concentraciones de ácidos con el **medio 81** con nitrógeno.

3.7.Métodos analíticos

3.7.1. Recta OD frente a SST

El crecimiento de la biomasa se mide por densidad óptica (OD). Para conocer la concentración en g/l se hace una curva patrón de SST frente a absorbancia.

Para el estudio de los SST en las muestras se realiza previamente una curva patrón de OD frente a SST. Se incuba *Cupriavidus* con una concentración de glucosa de 10 g/l durante 24 horas a 30°C y 150 rpm. Se hace la recta de calibrado con las diluciones de 1/1,5, 1/2, 1/4 y 1/8 y se mide la densidad óptica con una longitud de onda de 650 nm de las diferentes diluciones. Un volumen conocido se filtra sobre filtros previamente pesados. Los filtros se secan en estufa a 105°C durante 1 hora. La diferencia de peso de los filtros nos da la masa de SST. Conocido el volumen filtrado y la masa, se puede conocer la concentración de sólidos para las distintas diluciones. La recta de calibrado representará la OD frente a la concentración de sólidos (Gráfica 1).



Gráfica 1 Recta de calibrado de OD frente a SST

3.7.2. Medición de la concentración de glucosa

El método de DNS (3,5-dinitrosalicílico) es un método colorímetro que depende de la cantidad de glucosa presente en el medio. El DNS se prepara con los reactivos de la Tabla 3-5.

MÉTODOS Y MATERIALES

Tabla 3-5 Preparación de DNS

Soluto	Masa	Disolvente
Dinitrosalicílico	10 g	Hasta 1000 ml de agua destilada
Tartrato Na y K+	300 g	
NaOH	16 g	

Se disuelve la masa de dinitrosalicílico en 200 ml de agua destilada y la masa de tartrato en 500 ml hasta que se disuelvan. Una vez disueltos, se juntan en un matraz aforado de 1 litro y se añaden los 16 gramos de NaOH. Se agita durante un día entero y se enrasa hasta 1 litro.

Para hacer la recta de calibrado se usan tubos de ensayo de 16 ml un blanco y 5 muestras con diferentes concentraciones de glucosa, todas ellas por duplicado. Se preparan añadiendo los siguientes volúmenes de agua, glucosa y DNS (Tabla 3-6).

Tabla 3-6 Volúmenes para preparar la recta de calibrado de la glucosa

	Volumen glucosa(2g/l) (μ l)	Volumen agua (II) (μ l)	Volumen DNS (ml)
Blanco	-	1000	1
1	100	900	1
2	200	800	1
3	400	600	1
4	600	400	1
5	800	200	1

Una vez preparados, se meten en un baño de ebullición durante 5 minutos y, posteriormente, se añaden 8 ml de agua (II) y se lee su absorbancia a 540 nm.

Se obtiene así una recta de calibrado de absorbancia frente a concentración de glucosa.

El calibrado se realiza cada vez que se realiza un análisis de la concentración de glucosa con DNS.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

Para conocer la concentración de glucosa que queda en el medio, se preparan tubos de ensayo de 16 ml y se añade 50 μ l de la muestra, 950 μ l de agua (II) y 1 ml de DNS que se meten en un baño en ebullición durante 5 minutos y se añaden 8 ml de agua. Finalmente, se mide la absorbancia a 540 nm. El experimento se hace por duplicado.

3.7.3. Análisis de PHA

Para cada muestra que se quiera analizar el contenido de PHA, se toman 2 ml que se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante (Frutos et al., 2017). El pellet resultante se lava dos veces con agua ultrapura y se congela a -20°C . Para cada muestra se toman triplicados para el posterior análisis.

El análisis de PHA se realiza añadiendo 1 ml de propanol/HCl 37% (80:20) al pellet con nuestra biomasa y vortear hasta disolver la muestra. Esta disolución se pasa a tubos Hatch. Se añaden 10 μ l de ácido benzoico que se usa como patrón interno y 2 ml de cloroformo. Se vortean los tubos y se dejan 4 horas en un termobloque a 100°C . Para preparar los patrones para la recta de calibrado de PHB/PHV se añade 1 ml de propanol/HCl 37% (80:20), 10 μ l de ácido benzoico y 2 ml del patrón correspondiente en tubos Hatch y, al igual que las muestras, se colocan el termobloque durante 4 horas.

Después de las 4 horas, se dejan enfriar y se añade 1 ml de agua miliQ y se vortea. Se forman así dos fases, una fase orgánica de mayor densidad y la fase acuosa. Se extrae con una pipeta Pasteur la fase orgánica y se filtra con filtros de nylon de $0,22\mu\text{m}$ en viales de 2 ml para cromatografía de gases.

El análisis se realiza en un **GC-7820A** unido a un **MSD-5977E** (Agilent Technologies, Santa Clara, EEUU.), equipado con una columna de **DB-WAX** ($30\text{m} \times 250\mu\text{m} \times 0,25\mu\text{m}$) (Imagen 3-1).

MÉTODOS Y MATERIALES



Imagen 3-1 Equipo de análisis de PHAs

Las temperaturas del detector y del inyector son de 250 °C, mientras que la del horno se mantiene a 40 °C durante 5 minutos y va aumentando 10 °C por minuto hasta los 200 °C, a la que se mantiene durante 2 minutos.

Los resultados obtenidos dan una concentración de miligramos de PHB por cada litro de muestra. El porcentaje de PHB se obtiene de dividir la concentración de PHB entre la concentración de SST.

3.7.4. Análisis de nitrógeno total.

Las muestras que se usan en la medición del nitrógeno total se preparan mediante la filtración con filtros de 0,22 μm de nylon de 5 ml de la muestra.

El análisis se realiza con un TOC-V 5000. La medida se realiza mediante luminiscencia. El nitrógeno reacciona con ozono formando NO_2 excitado que, al volver a su estado no excitado, emite una intensidad lumínica proporcional a su concentración.

3.7.5. Análisis de concentración de azúcares y ácidos con HPLC

Los compuestos que se miden en el HPLC son glucosa y VFAs. Las muestras que medimos son las obtenidas tras 72 horas de crecimiento para las diferentes fuentes de carbono. Las muestras se filtran con filtros de nylon de 0,22 μm y se pasan a viales de HPLC de 2 ml.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

El equipo usado para la cromatografía de líquidos es un **HPLC Waters Alliance e2695**, al que se unen dos detectores, uno de ellos de ultravioleta **2998 PDA** y un detector de índice de refracción **2414 R1**. El detector ultravioleta se utiliza como auxiliar para diferenciar compuestos con respuestas similares en el detector de índice de refracción. En el caso de los ácidos orgánicos, éstos dan respuesta en ambos detectores, pudiéndolos diferenciarlos así de otros compuestos con un índice de refracción parecido pero que no son detectados por la luz ultravioleta.

El contenido de carbohidratos en las muestras es determinado por **HPLC-RI** usando un procedimiento **NREL (National Renewable Energy Laboratory – EEUU)** modificado (Hames, 2008). La muestra líquida es analizada por una columna **Bio-Rad HPX- 87X** de exclusión de iones instalada en el módulo de separación **Waters e2695**. Una fase móvil de ácido sulfúrico 0,025M es eluida con un caudal de 0,6 ml/min y a 50 °C.

4. RESULTADOS

4.RESULTADOS

En el apartado de resultados, las tablas correspondientes a los datos representados en las gráficas se incluyen en el anexo II (apartado 8).

4.1. Glucosa

4.1.1. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con glucosa a distintos tiempos

Se estudia el crecimiento de *Cupriavidus* con diferentes concentraciones de glucosa (2,5 g/l, 5 g/l, 7 g/l, 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l) y durante dos tiempos diferentes de crecimiento (24 y 72 horas). Para 24 horas, apenas aumenta la concentración de SST con la glucosa, alcanzando el valor máximo de $19,39 \cdot 10^{-2} \pm 1,11 \cdot 10^{-2}$ g/l con 10 g/l de glucosa. Sin embargo, para un tiempo de 72 horas se observa un importante crecimiento a medida que aumenta la concentración de glucosa, alcanzando una concentración de $5,66 \pm 0,31$ g/l a una concentración de 20 g/l de glucosa. (Tabla 8-2 y Figura 4-1).

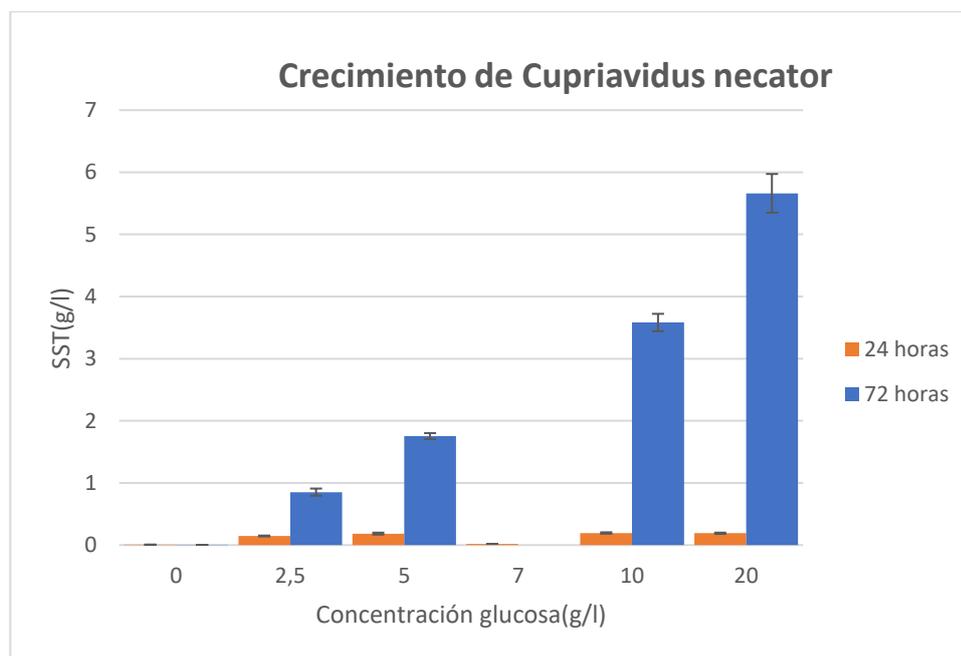


Figura 4-1 Comparación crecimiento con glucosa a 24 y 72 horas

4.1.1.1. Consumo de nitrógeno y glucosa con glucosa con fuente de carbono en 72 horas

Para periodos de crecimiento de 72 horas de *Cupriavidus*, se mide la glucosa y nitrógeno residuales del medio tras las 72 horas de crecimiento. La

concentración de nitrógeno inicial del medio es de **193,42 mg/l**. El consumo de nitrógeno aumenta directamente con la concentración de glucosa, sin llegar a consumirlo completamente. El porcentaje de consumo más alto de nitrógeno se alcanza para 20 g/l de glucosa con un valor de $93,89 \pm 0,91\%$ (Tabla 8-3 y Figura 4-2).

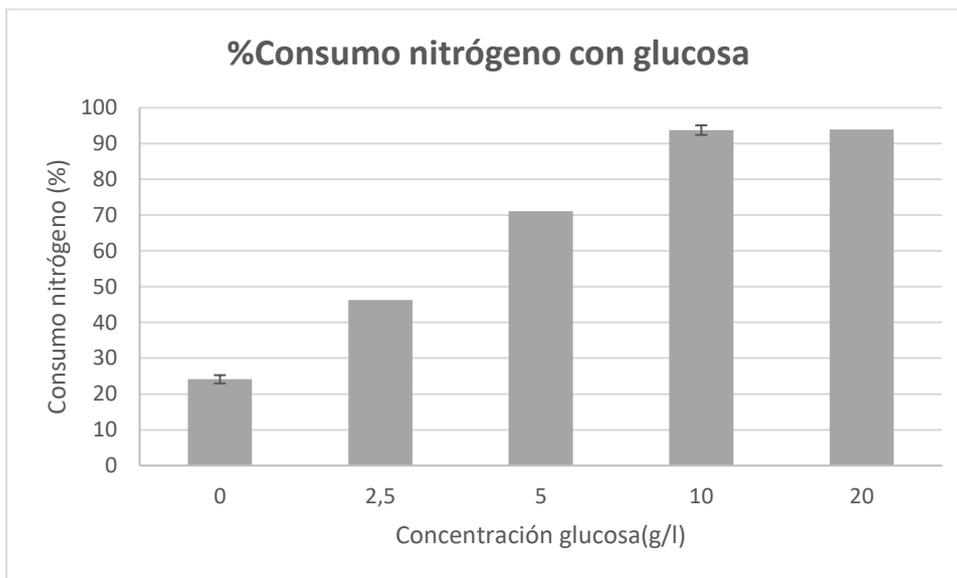


Figura 4-2 Consumo de nitrógeno y glucosa con glucosa como fuente de carbono

Por otra parte, la glucosa del medio se mide usando el método de DNS para obtener un resultado rápido sobre la glucosa residual. La glucosa se consume completamente, hasta una concentración inicial de glucosa de 10 g/l, a partir de la cual comienza a aparecer una cantidad muy baja de glucosa residual, obteniendo el valor máximo de $2,76 \cdot 10^{-2} \pm 6,31 \cdot 10^{-3}$ g/l para la concentración inicial de 20 g/l de glucosa (Tabla 8-4).

4.1.1.2. Acumulación de PHB con glucosa como fuente de carbono

El medio de crecimiento se sustituyó por un medio con idénticas concentraciones de glucosa que los iniciales, pero sin nitrógeno en todos los experimentos, tanto de crecimiento a 24 horas como a 72 h. Tras un periodo de acumulación de 72 horas en un medio sin nitrógeno para las diferentes concentraciones de glucosa, se miden los PHB.

Para los experimentos con 24 horas de crecimiento, la mayor concentración de PHB se obtiene para 20 g/l de glucosa con un valor de $566,45 \pm 54,16$ mg

RESULTADOS

PHB/l , mientras que para los experimentos con tiempos de 72 horas es de $214,11 \pm 6,53$ mg/l para la misma concentración de glucosa (Tabla 8-5 y Figura 4-3).

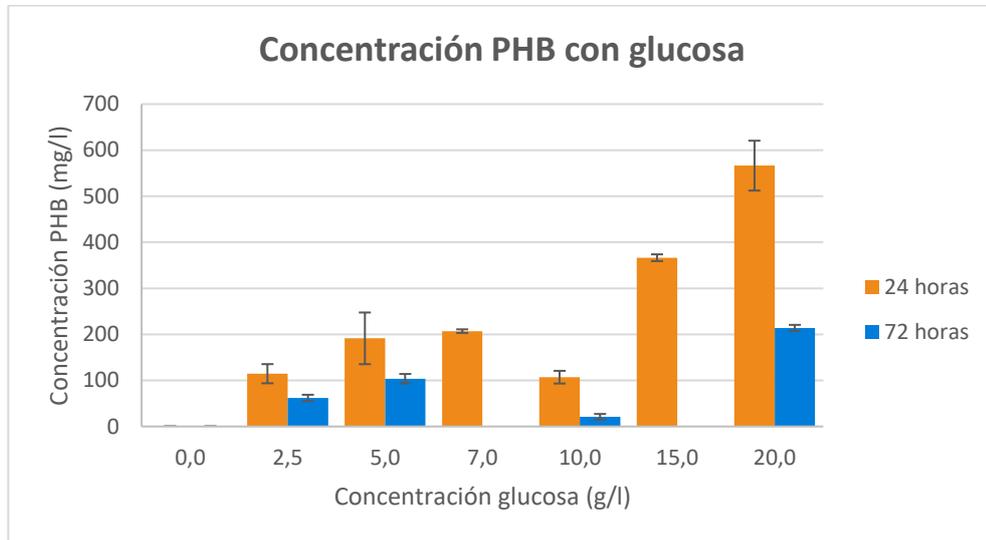


Figura 4-3 Concentración e de acumulación de PHB con glucosa como fuente de carbono. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

Por otra parte, en términos de porcentaje de acumulación de PHB en la biomasa (g de PHB/100 g de biomasa), el máximo porcentaje de PHB se obtiene, tanto para 24 como para 72 horas, para una concentración de glucosa de 20 g/l con valores de $65,98 \pm 4,69\%$ y $2,97 \pm 0,14\%$ respectivamente (Tabla 8-6 y Figura 4-4).

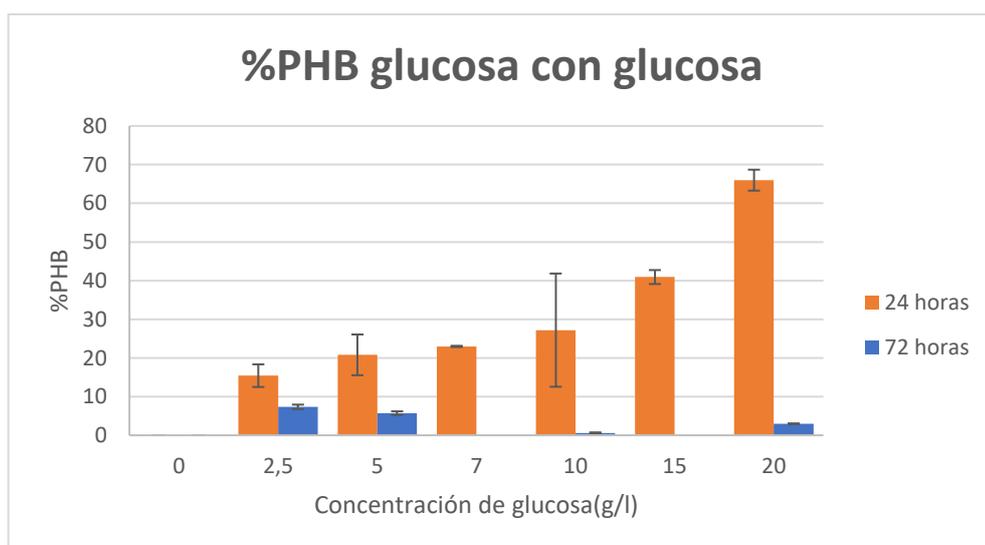


Figura 4-4 Comparación %PHB con glucosa como fuerte de carbono. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

4.2. Ácido acético

4.2.1. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con ácido acético con tiempo de crecimiento de 24 horas

En este experimento se estudia el crecimiento de *Cupriavidus* con diferentes concentraciones de ácido acético (0 g/l, 0,25 g/l, 0,5 g/l y 0,75 g/l) para tiempos de crecimiento de 24 horas. La concentración más alta de SST es $18,38 \cdot 10^{-2} \pm 3,10 \cdot 10^{-3}$ g/l para una concentración de ácido acético de 0,5 g/l, a partir de la cual el ácido acético es tóxico para el crecimiento de la bacteria (Tabla 4-1).

Tabla 4-1 Crecimiento con ácido acético como fuente de carbono

Concentración ácido acético (g/l)	Concentración SST 24 horas (g/l)	Media Concentración 24 horas (g/l)
0	0,00	$0,00 \pm 0,00$
0,25	0,11	$0,11 \pm 3,94 \cdot 10^{-3}$
	0,11	
	0,10	
0,5	0,18	$18,38 \cdot 10^{-2} \pm 3,10 \cdot 10^{-3}$
	0,18	
	0,19	
0,75	0,00	$0,00 \pm 0,00$
	0,00	
	0,00	

4.2.2. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con 7 g/l de glucosa y ácido acético a distintos tiempos

Se estudia el crecimiento de *Cupriavidus* con diferentes concentraciones de ácido acético (0,25 g/l, 0,5 g/l, 0,75 g/l y 1 g/l) con una concentración de glucosa de 7 g/l y distintos tiempos de crecimiento (24 y 72 horas). Para tiempo de crecimiento de 24 horas, el valor máximo se alcanza para una concentración de ácido acético de 0,5 g/l con un valor de $2,13 \pm 0,01$ g/l de SST, a partir de dicha concentración de ácido acético, éste resulta tóxico para el crecimiento

RESULTADOS

de la bacteria. Para 72 horas, al igual que para 24 horas, el valor máximo de SST es de $2,44 \pm 0,01$ g/l para 0,5 g/l de ácido acético (Tabla 8-7 y Figura 4-5).

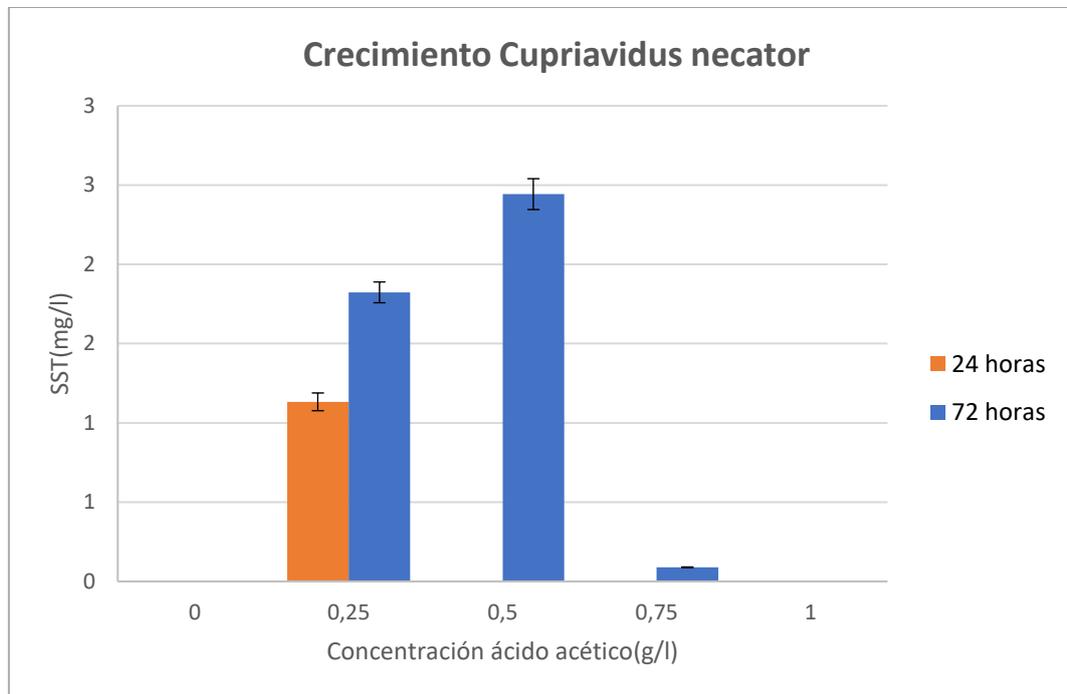


Figura 4-5 Comparación de crecimiento con 7g/l de glucosa y ácido acético a 24 y 72 horas

4.2.2.1. Consumo de nitrógeno y glucosa con 7 g/l de glucosa y ácido acético como fuente de carbono

Partiendo de un nitrógeno total inicial en el medio en este experimento de **179,88 mg/l**, se estudia el consumo de nitrógeno para una concentración de 7 g/l de glucosa y diferentes concentraciones de ácido acético, el consumo de nitrógeno aumenta hasta una concentración de 0,25 g/l, a partir de la cual comienza a disminuir. El mayor consumo se da para una concentración de 0,25 g/l de ácido acético, coincidiendo con el mayor crecimiento de la bacteria, con un consumo de $76,27 \pm 5,36$ % (Tabla 8-8 y Figura 4-6).

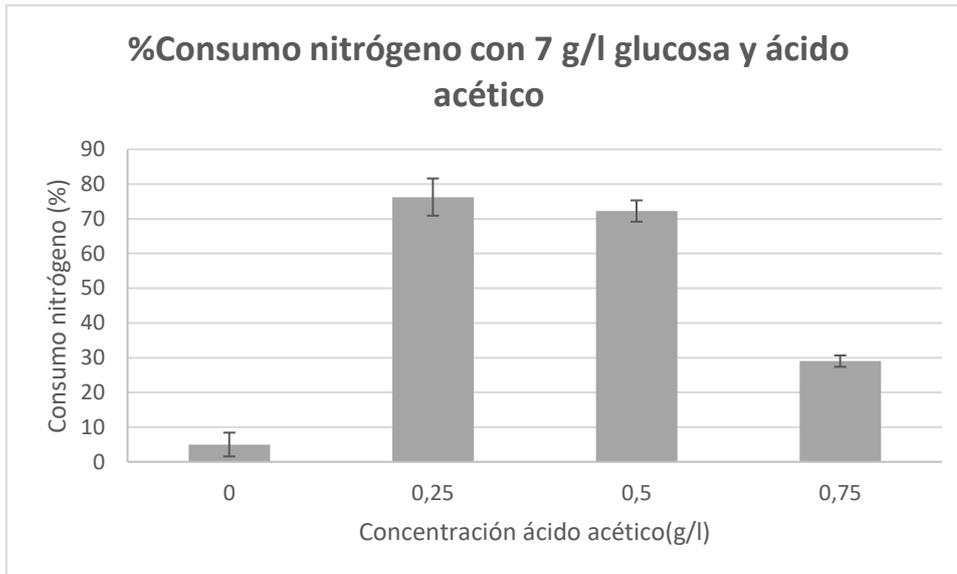


Figura 4-6 Consumo de nitrógeno con 7 g/l glucosa y ácido acético como fuente de carbono

4.2.2.2. Concentración de glucosa y ácidos acético y cítrico tras 72 h de crecimiento

Las muestras con un tiempo de 72 horas de crecimiento se analizaron en el HPLC para conocer el consumo de glucosa y de ácido acético de *Cupriavidus*. La concentración de glucosa inicial en las muestras es de 7g/l y para las concentraciones de 0,25 g/l y 0,5 g/l de ácido se consume toda la glucosa, sin embargo, a partir de 0,75 g/l de ácido, no se consume completamente la glucosa, aumentando la concentración de glucosa residual hasta un valor de $4,48 \pm 0,17$ g/l.

En el caso del ácido acético, para 0,25 g/l y 0,5 g/l, se consume por completo, pero para concentración inicial de 0,75 g/l de ácido acético no se consume, siendo la concentración de ácido acético residual de $0,49 \pm 0,01$ g/l.

Finalmente, la concentración de ácido cítrico, que está presente en el medio de crecimiento debido al uso de citrato en su preparación, permanece constante y no se consume (Tabla 8-9 y Figura 4-7).

RESULTADOS

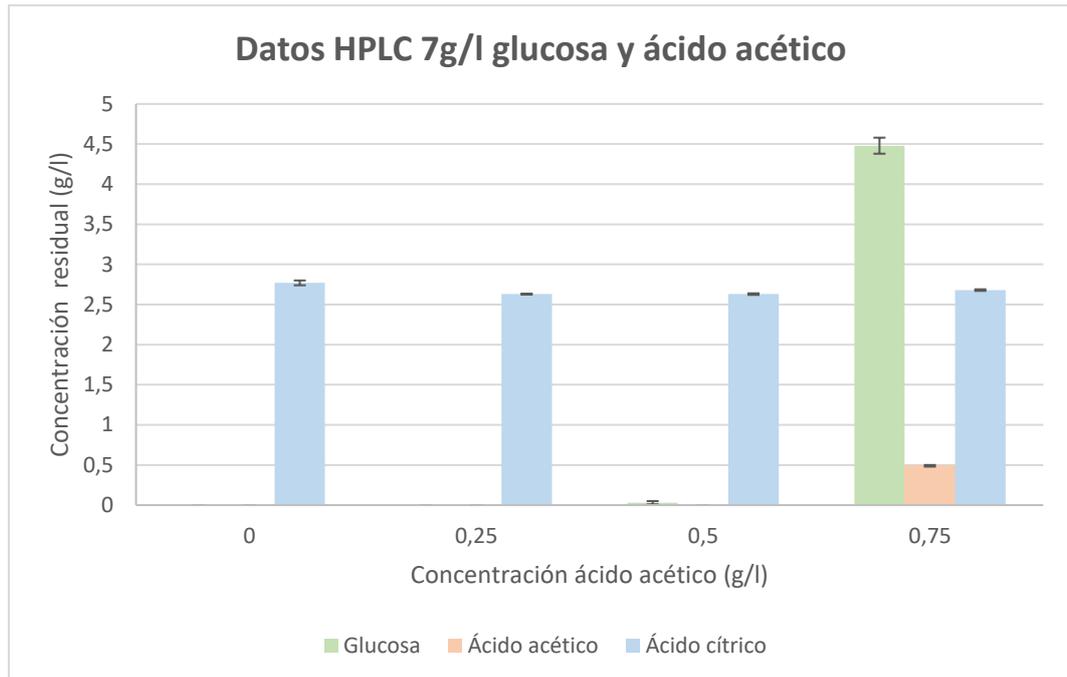


Figura 4-7 Glucosa y ácido acético residual en 7 g/l glucosa y ácido acético tras 72 horas de crecimiento

4.2.2.3. Acumulación de PHB con ácido acético y 7 g/l glucosa como fuente de carbono

Una vez cambiado el medio, a disoluciones con idéntica concentración de glucosa y acético que las iniciales, pero sin nitrógeno, se mide la acumulación de PHB a 72 h. La concentración más alta para los experimentos con tiempo de crecimiento de 24 horas se obtiene para una concentración de ácido acético de 0,25 g/l con un valor de $2468,98 \pm 150,46$ mg/l PHB, mientras que para los experimentos con 72 horas de crecimiento, la concentración de PHB más alta es de $82,76 \pm 4,55$ mg/l nuevamente para una concentración de ácido acético de 0,25 g/l (Tabla 8-10 y Figura 4-8).

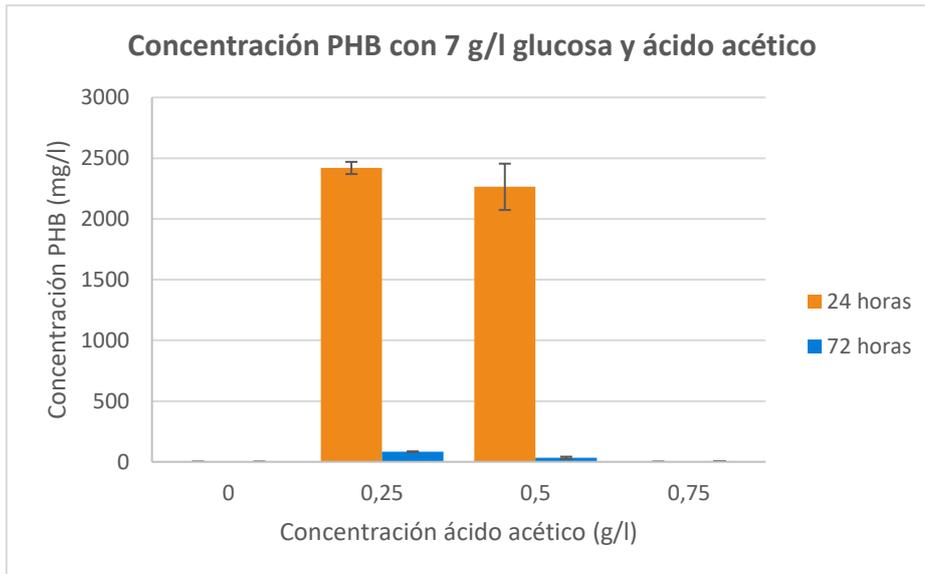


Figura 4-8 Concentración de PHB en 7g/l de glucosa y ácido acético. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

El efecto combinado de la concentración de sólidos en suspensión y la acumulación de PHB en la biomasa, hace que estos resultados sean ligeramente diferentes en términos de porcentaje de PHB en la biomasa. En porcentajes, para los experimentos el tiempo de 24 horas de crecimiento, el porcentaje más alto se da para una concentración de ácido acético de 0,5 g/l con un valor de $33,93 \pm 3,6 \%$, mientras que, para 72 horas, el porcentaje más alto es de $15,58 \pm 0,07\%$ para un valor de 0,75 g/l de concentración de ácido acético (Tabla 16 y Figura 9).

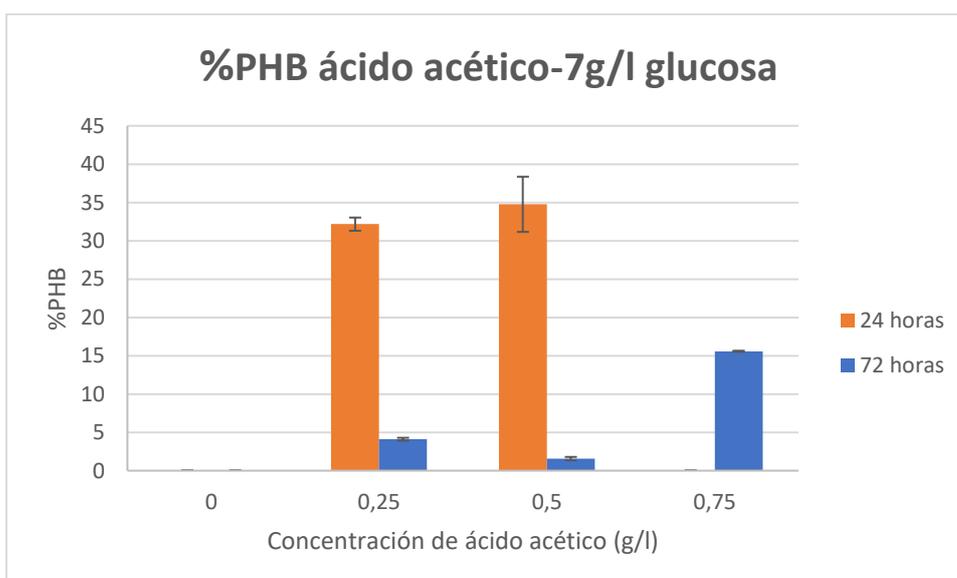


Figura 4-9 Comparación de %PHB con ácido acético y 7g/l de glucosa a 24 y 72 horas.

RESULTADOS

4.2.3. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con ácido acético y 15 g/l glucosa como fuente de carbono

En este apartado se estudia el crecimiento de *Cupriavidus* con 15 g/l de glucosa, para diferentes concentraciones de ácido acético (0,25 g/l, 0,5 g/l, 0,75 g/l y 1 g/l) y distintos tiempos de crecimiento (24 y 72 horas).

Para 24 horas, el crecimiento máximo ocurre, nuevamente, para una concentración de 0,25 g/l de ácido acético con una concentración de SST de $1,44 \pm 2,21 \cdot 10^{-2}$ g/l, a partir de este punto, la concentración de ácido acético es tóxica para el crecimiento de *Cupriavidus*.

Por otra parte, para 72 horas de crecimiento, el valor más alto del crecimiento es de $8,52 \pm 22,55 \cdot 10^{-2}$ g/l SST para una concentración de ácido acético de 0,25 g/l (Tabla 8-12 y Figura 4-10).

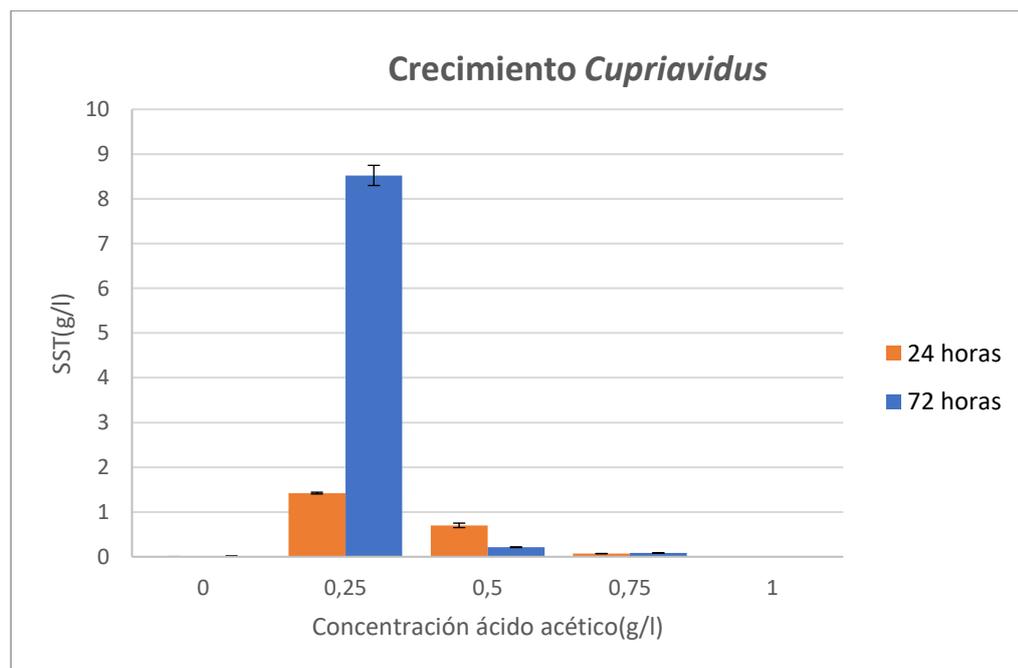


Figura 4-10 Comparación de crecimiento con 15g/l de glucosa y ácido acético a 24 y 72 horas.

4.2.3.1 Consumo de nitrógeno con 15 g/l de glucosa y ácido acético como fuente de carbono en experimentos a 72 horas

Se parte de un nitrógeno total inicial en el medio en este experimento de **177,46 mg/l**. Para una concentración de 15 g/l de glucosa y diferentes concentraciones de ácido acético, el consumo de nitrógeno en los

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

experimentos de crecimiento a 72 horas aumenta hasta una concentración de 0,25 g/l, a partir de la cual comienza a disminuir. El consumo más alto de nitrógeno se da para una concentración de 0,25 g/l de ácido acético con un valor de $88,42 \pm 0,96\%$ (Tabla 8-13 y Figura 4-11).

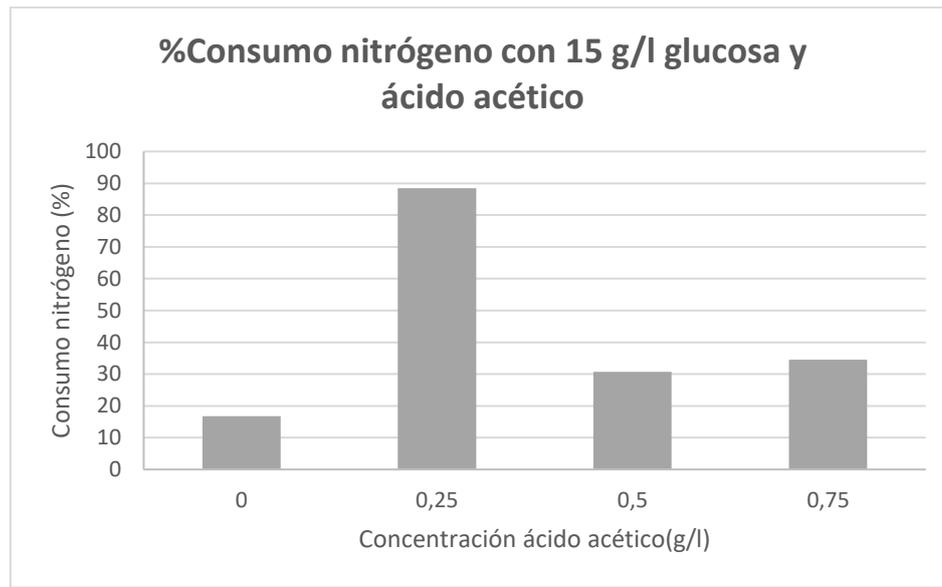


Figura 4-11 Consumo de nitrógeno con 15 g/l glucosa y ácido acético como fuente de carbono

4.2.3.2. Concentración de glucosa y ácidos acético y cítrico tras 72 horas de crecimiento

Se parte de una concentración de glucosa de 15 g/l. La glucosa no se consume completamente en ningún caso y la concentración residual de glucosa aumenta con la concentración de ácido acético hasta alcanzar el valor más alto para una concentración de 0,75 g/l de ácido acético con un valor de $12,76 \pm 0,23$ g/l de glucosa.

Por otra parte, la concentración de ácido acético es 0 g/l para todas las concentraciones excepto para 0,75 g/l de ácido acético, donde la concentración de ácido acético residual es de $0,58 \pm 0,02$ g/l.

Finalmente, la concentración de ácido cítrico aumenta, alcanzando su valor más alto para una concentración de ácido acético de 0,5 g/l con un valor de $7,34 \pm 0,50$ g/l de ácido cítrico. Esto se puede deber a una desviación en el

RESULTADOS

metabolismo de *Cupriavidus*, provocando que el ciclo de Krebs no llegue a completarse e interrumpirse tras la formación de citrato, justificando así la aparición de ácido cítrico (Tabla 8-14 y Figura 4-12).

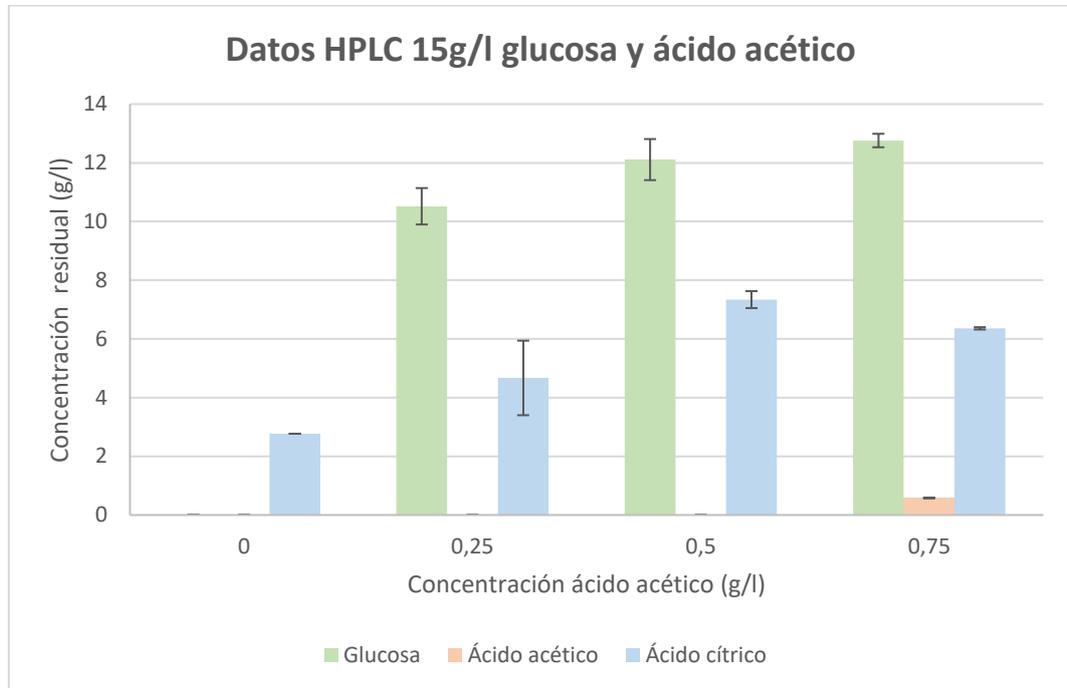


Figura 4-12 Glucosa y ácido acético residual con 15 g/l glucosa y ácido acético

4.2.3.2. Acumulación de PHB con ácido acético y 15 g/l glucosa como fuente de carbono

Al medir la acumulación de PHB para el tiempo de crecimiento de 24 horas con 15 g/l de glucosa, se observa que la concentración más alta de PHB se obtiene para una concentración de ácido acético de 0,25 g/l con un valor de $3244,932 \pm 341,21$ mg/l PHB, mientras que, para 72 horas, se obtiene una concentración de $31,84 \pm 21,94$ mg/l de PHB para 0,25 g/l de ácido acético (Tabla 8-15 y Figura 4-13).

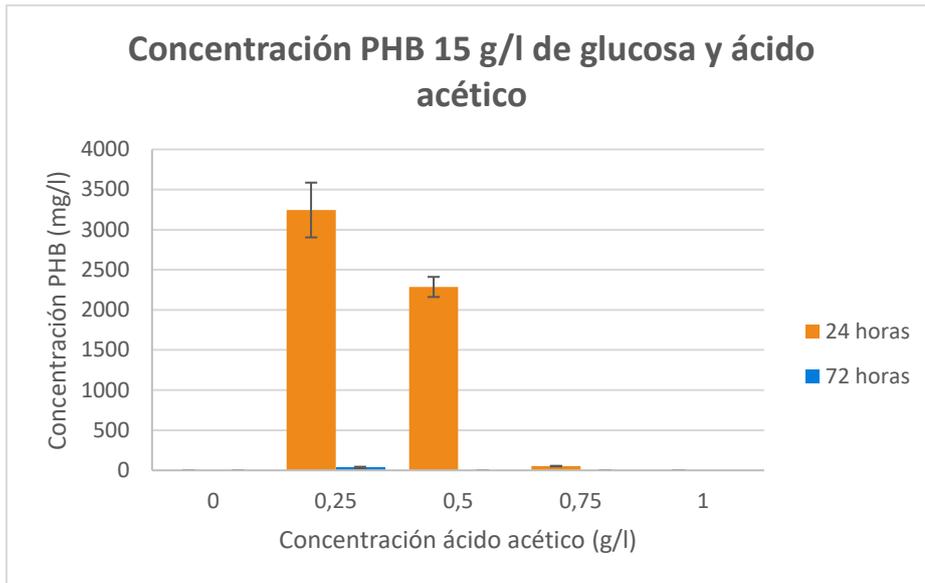


Figura 4-13 Concentración de PHB con 15 g/l de glucosa y ácido acético. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

En porcentajes de PHB, la concentración de ácido acético en la que se obtiene mayor porcentaje de PHB es, al igual que la concentración, de 0,25 g/l de ácido acético, con valores de $74,91 \pm 2,59\%$ en 24 horas y de $0,83 \pm 0,49\%$ para 72 horas (Tabla 8-16 y Figura 4-14). Los porcentajes obtenidos para tiempos de 24 horas son mayores que en el caso de 7 g/l, mientras que, en 72 horas, se obtiene un valor máximo más alto con 7 g/l de glucosa.

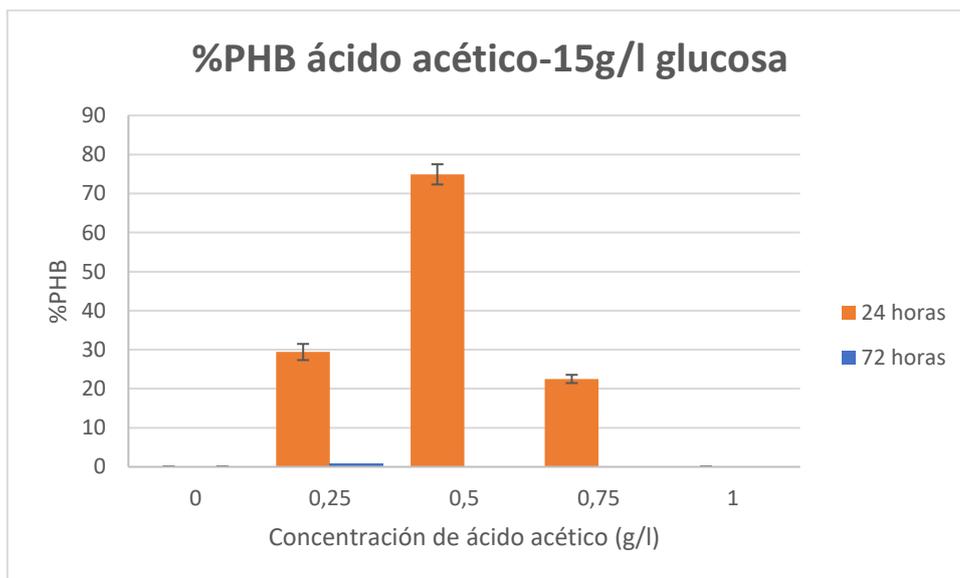


Figura 4-14 Comparación de %PHB con ácido acético y 15 g/l de glucosa para 24 y 72 horas. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

4.3. Ácido cítrico

4.3.1. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con ácido cítrico como fuente de carbono

En este apartado, se estudia el crecimiento de *Cupriavidus* usando como fuente de carbono ácido cítrico, añadido a mayores del presente en el medio de crecimiento, a diferentes concentraciones (0 g/l, 1 g/l y 2,5 g/l) durante 24 horas de crecimiento. El crecimiento más alto se obtiene para una concentración de 1 g/l de ácido cítrico con un valor de $360,46 \pm 63,21$ mg/l de SST, a partir del cual disminuye (Tabla 4-2).

Tabla 4-2 Crecimiento con ácido cítrico como fuente de carbono

Concentración ácido cítrico (g/l)	Concentración SST 24 horas (mg/l)	Media Concentración 24 horas (mg/l)
0	0,00	0,00±0
1	398,02	360,46±63,21
	395,97	
	287,59	
2,5	9,33	10,42±1,45
	12,18	
	10,06	

4.3.2. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con 7 g/l glucosa y ácido cítrico a distintos tiempos

En este experimento se añaden 7 g/l de glucosa como fuente de carbono, además de la adición de ácido cítrico a distintas concentraciones (0,5 g/l, 1g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 7,5 g/l y 10 g/l), a mayores del presente en el medio, y se estudia el crecimiento para distintos tiempos (24 y 72 horas). Para ambos tiempos de crecimiento se obtiene que el valor máximo de SST se da para una concentración de 1g/l de ácido cítrico, con un valor de $32,08 \cdot 10^{-2} \pm 4,88 \cdot 10^{-3}$ g/l para 24 Horas y de $4,41 \pm 0,19$ g/l para 72 horas (Tabla 8-17 y Figura 4-15).

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

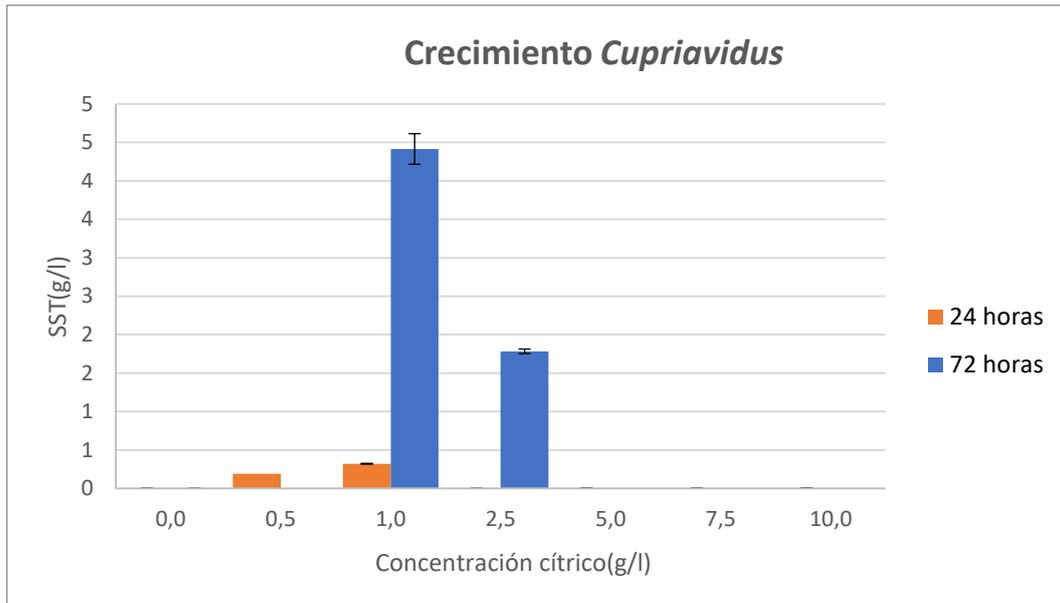


Figura 4-15 Comparación de crecimiento con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico añadido sobre el presente en el medio a 24 y 72 horas

4.3.2.1. Consumo de nitrógeno con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

Se parte de un nitrógeno inicial en el medio de **179,88 mg/l**. Para una concentración de 7 g/l de glucosa y diferentes concentraciones de ácido cítrico, para 72 horas de crecimiento se observa consumo de nitrógeno hasta una concentración de 1 g/l (consumiendo $81,86 \pm 2,67\%$), a partir de dicha concentración el consumo comienza a disminuir (Tabla 8-18 y Figura 4-16).

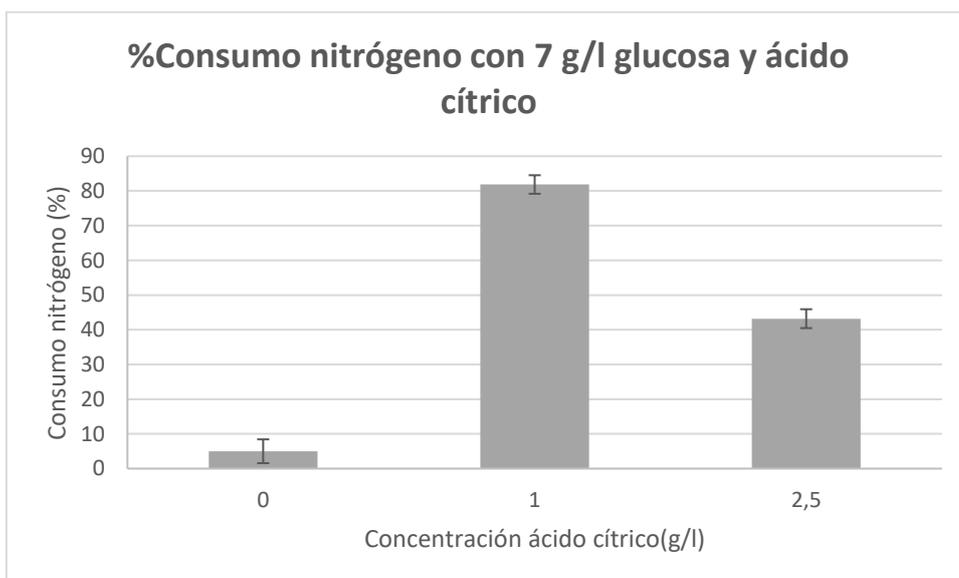


Figura 4-16 Consumo de nitrógeno con 7 g/l glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

RESULTADOS

4.3.2.2. Concentración de glucosa y ácidos acético y cítrico tras 72 horas de crecimiento

Partiendo de una concentración de glucosa de 7 g/l, se observa que, al final de los experimentos de crecimiento a 72 horas, en las muestras disminuye el consumo de glucosa alcanzado el máximo consumo para una concentración de 2,5 g/l de ácido cítrico con un valor de $4,62 \pm 2,27$ g/l (consumo del 66% de glucosa).

El ácido cítrico se consume, siendo el ácido cítrico residual el correspondiente con el del medio ($2,77 \pm 0,02$ g/l) (Tabla 8-19 y Figura 4-17).

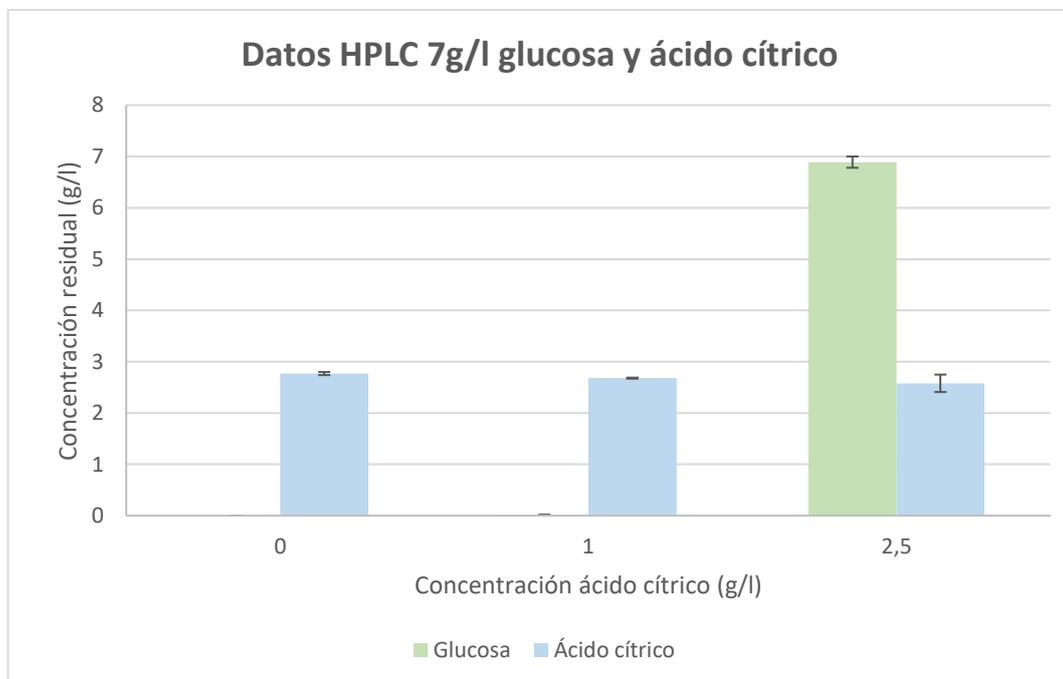


Figura 4-17 Concentración residual glucosa y ácido cítrico para 7 g/l glucosa y ácido cítrico tras 72 horas de crecimiento

4.3.2.3. Acumulación de PHB con ácido cítrico y 7 g/l glucosa como fuente de carbono

Tras cambiar los medios por otros con concentraciones de glucosa y cítrico idénticas que las iniciales, pero sin nitrógeno, y dejar acumular PHB durante 72 horas, se observa que la concentración máxima de PHB se alcanza, para una concentración de 1 g/l de ácido cítrico tanto a 24 como a 72 horas de

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

crecimiento, con unos valores respectivos de $2352,54 \pm 136,01$ mg/l y $74,10 \pm 11,96$ mg/l de PHB (Tabla 8-20 y Figura 4-18).

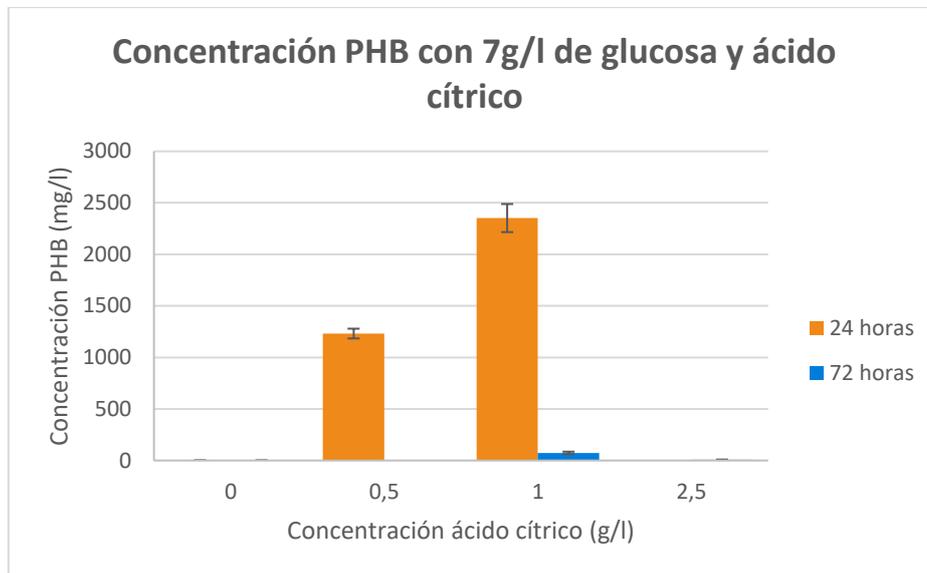


Figura 4-18 Concentración de PHB con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

Los porcentajes de PHB obtenidos, al igual que las concentraciones, alcanzan los valores máximos para una concentración de ácido cítrico de 1g/l con valores de $41,27 \pm 2,57\%$ para 24 horas y de $2,11 \pm 0,27\%$ para 72 horas (Tabla 8-21 y Figura 4-19).

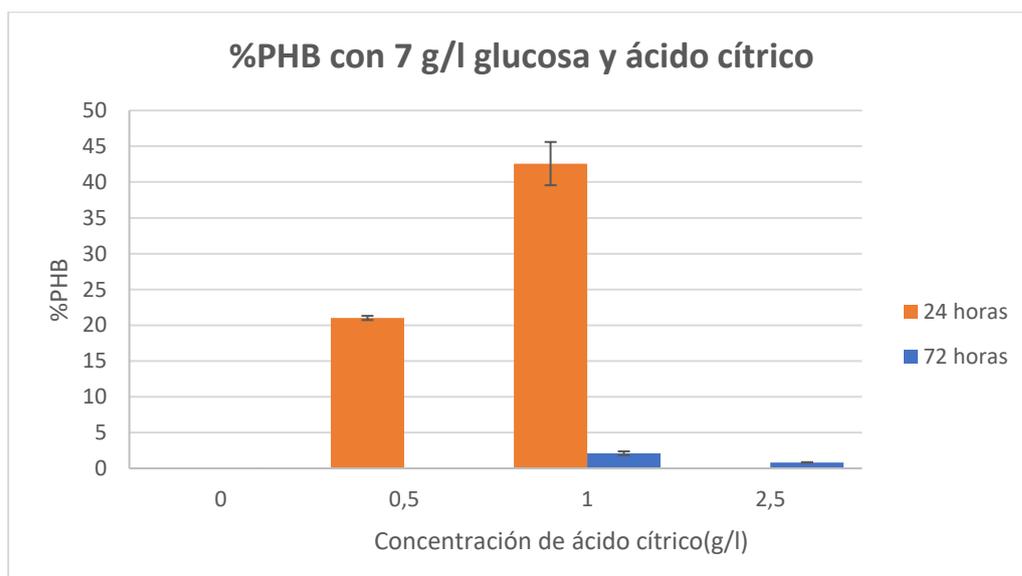


Figura 4-19 Comparación de %PHB con ácido cítrico y 7 g/l de glucosa. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h

RESULTADOS

4.3.3. Crecimiento de *Cupriavidus necator* con ácido cítrico y 15 g/l glucosa como fuente de carbono

Al medio de crecimiento se añaden 15 g/l de glucosa y diferentes concentraciones de ácido cítrico (0,5 g/l, 1g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 7,5 g/l y 10 g/l), añadido a mayores del ácido cítrico presente en el medio, con distintos tiempos de crecimiento (24 y 72 horas).

Para ambos tiempos de crecimiento se obtiene que el valor máximo de crecimiento de *Cupriavidus* se da para una concentración de 1g/l de ácido cítrico, con un valor de $2,82 \pm 0,12$ g/l para 24 horas y de $5,49 \pm 0,43$ g/l para 72 horas (Tabla 8-22 y Figura 4-20).

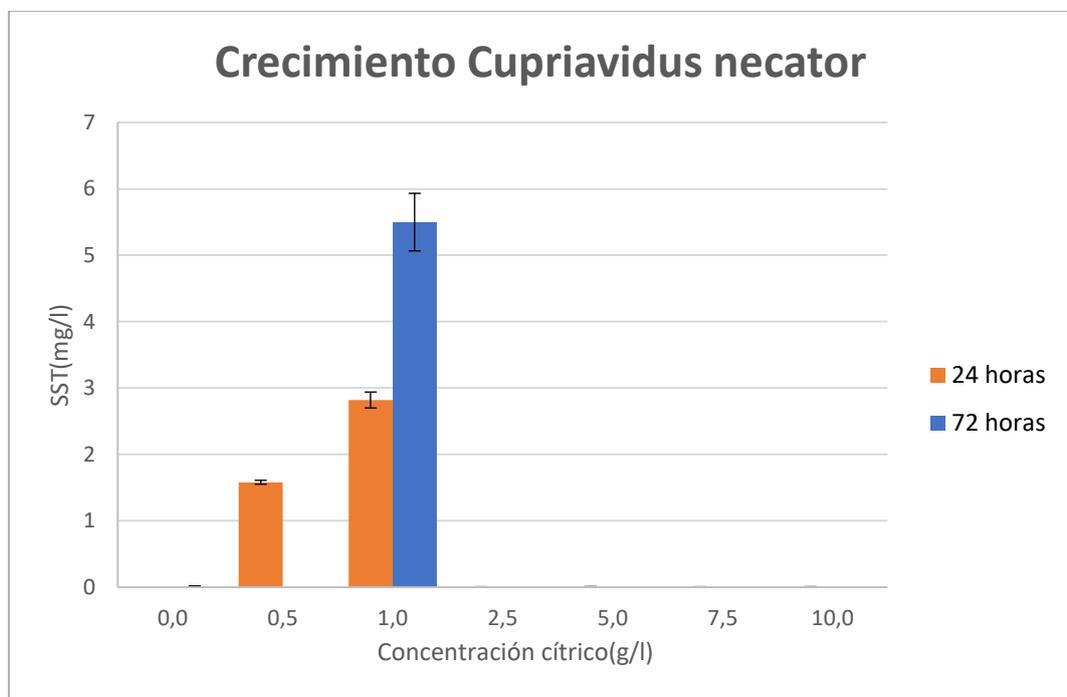


Figura 4-20 Comparación de crecimiento con 15 g/l de glucosa y ácido cítrico a 24 y 72 horas

4.3.3.1. Consumo de nitrógeno y glucosa con 15 g/l de glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

Partiendo de un nitrógeno total en el medio de **177,46 mg/l**. Tras el periodo de crecimiento de 72 horas, el consumo de nitrógeno, se observa que consumo de nitrógeno aumenta para una concentración de cítrico añadido de 1 g/l (llegando a $87,31 \pm 2,23\%$), a partir de la cual el consumo disminuye (Tabla 8-23 y Figura 4-21).

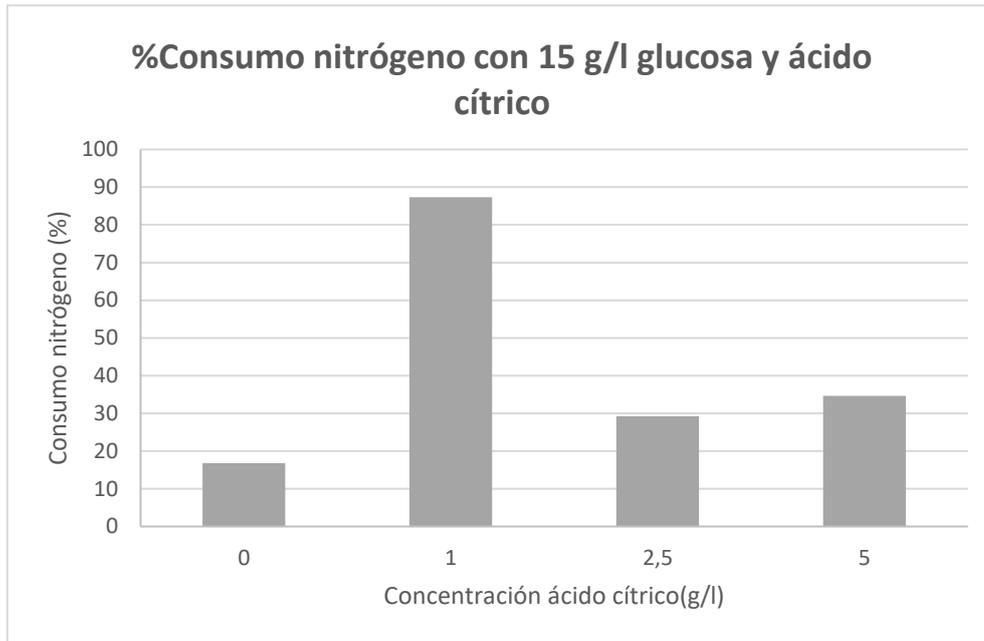


Figura 4-21 Consumo de nitrógeno con 15 g/l glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

4.3.3.2. Concentración de glucosa y ácidos acético y cítrico tras 72 horas de crecimiento

La concentración inicial de glucosa en el experimento es de 15 g/l. Concluido el periodo de crecimiento de 72 h, se observa un consumo del 90% para una concentración de ácido cítrico de 1g/l, mientras que para mayores concentraciones de ácido cítrico el consumo de glucosa disminuye.

La concentración de ácido cítrico que queda tras las 72 horas se corresponde con la concentración del propio medio de crecimiento para la concentración de 1 g/l, mientras que para la concentración de 2,5 g/l y 5 g/l, aparece un ácido cítrico residual correspondiente al ácido añadido en el experimento y que no ha sido consumido por la bacteria (Tabla 8-24 y Figura 4-22).

RESULTADOS

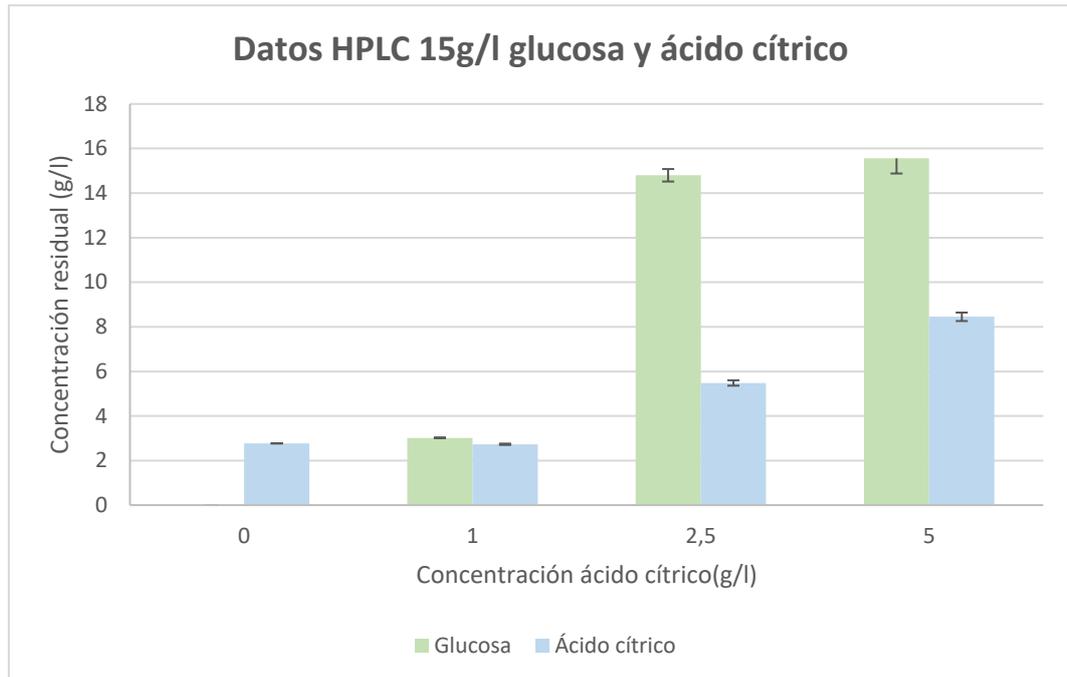


Figura 4-22 Glucosa y ácido cítrico residual para 15 g/l glucosa y ácido cítrico tras 72 horas de crecimiento

4.3.3.3. Acumulación de PHB con ácido cítrico y 15 g/l glucosa como fuente de carbono

El medio es sustituido por otros con idénticas concentraciones de glucosa y cítrico que los iniciales, pero sin nitrógeno y se dejan acumular PHB durante 72 h. Para una concentración de glucosa de 15 g/l y diferentes concentraciones de ácido cítrico, la concentración máxima de PHB se alcanza para una concentración de 1 g/l de ácido cítrico para los dos tiempos de crecimiento, con unos valores de concentración de PHB de $6357,01 \pm 245,68$ mg/l para 24 horas y $111,4 \pm 44,94$ mg/l para 72 horas (Tabla 8-24 y Figura 4-23).

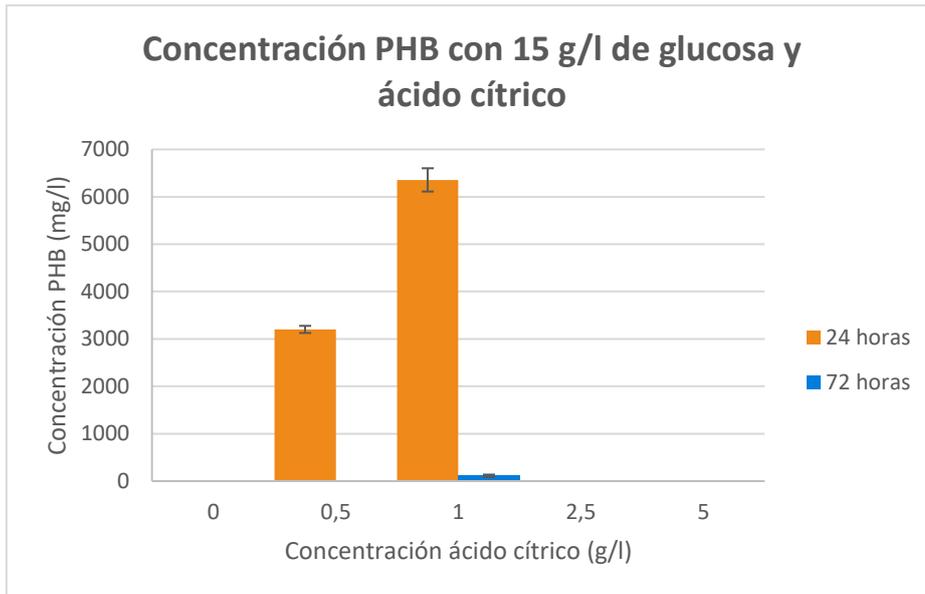


Figura 4-23 Concentración de PHB con 15 g/l de glucosa y ácido cítrico. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

Del mismo modo, el porcentaje más alto de PHB se obtiene, tanto para crecimientos a 24 como a 72 horas, con una concentración de 1 g/l de ácido cítrico, con valores respectivos de $42,03 \pm 1,76\%$ y $2,04 \pm 0,74\%$ (Tabla 8-26 y Figura 4-24).

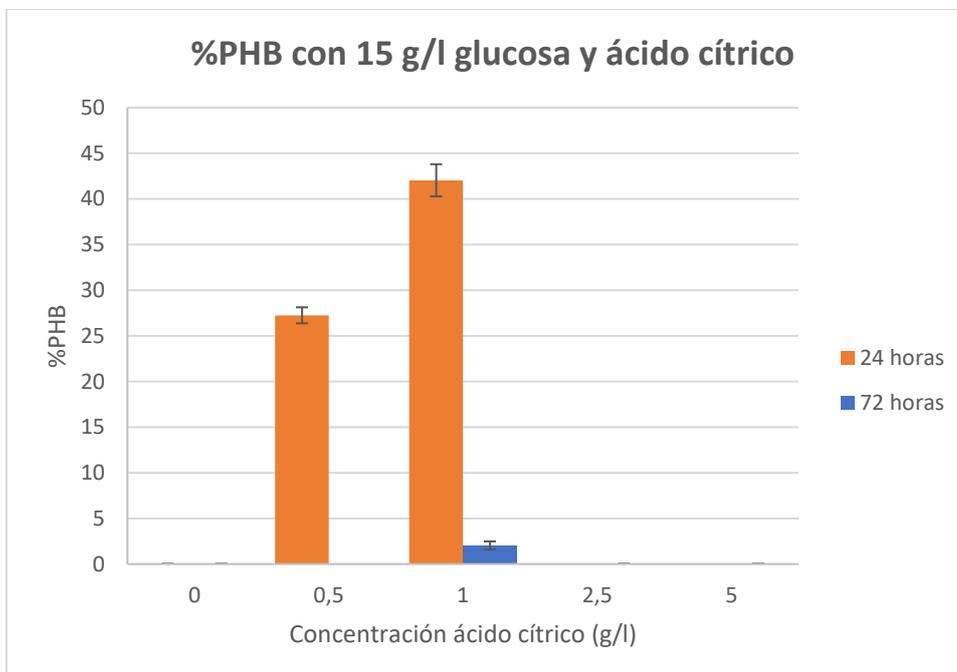


Figura 4-24 Comparación de %PHB con ácido cítrico y 15 g/l de glucosa. Experimentos con 72 h de acumulación, partiendo de experimentos de crecimiento a 24 y 72 h.

4.4. Biomasa microalgal

Se estudia el crecimiento de *Cupriavidus* usando como fuente de carbono biomasa microalgal usando un tiempo de crecimiento de 72 horas (medio con nitrógeno) y otras 72 horas como tiempo de acumulación de PHB (medio sin nitrógeno).

En estos experimentos con biomasa microalgal como fuente de carbono, el nitrógeno del medio se mide tras el tiempo de crecimiento de 72 horas, además de medir el nitrógeno inicial del medio para conocer el consumo de nitrógeno ocurrido durante el crecimiento.

Las muestras obtenidas durante los pretratamientos se analizan con el HPLC para saber las concentraciones de glucosa y VFAs finales.

El crecimiento de *Cupriavidus necator* no puede ser medido mediante absorbancia, debido a los sólidos en suspensión de los medios, por lo que no hay un seguimiento del crecimiento de SST ni datos de PHB en porcentaje.

4.4.1. Experimento 1: Molino de bolas sin buffer

En el experimento del molino de bolas sin buffer, la biomasa microalgal se somete a un pretratamiento durante 5 minutos en un molino de bolas pequeñas. Tras el pretratamiento, se realiza una hidrólisis enzimática de 24 horas con la enzima *Celluclast*. El resultado de esta hidrólisis es el medio que se usa en el experimento 1. Se mide la concentración de nitrógeno del medio, así como una medida de glucosa y VFAs por HPLC.

Se parte de una concentración de nitrógeno de 141,95 mg/l, consumiéndose un $35,33 \pm 5,49$ %.

La glucosa inicial del medio es de $1,56 \pm 0,00$ g/l y hay un consumo del $96,78 \pm 0,91$ %, mientras que para el ácido acético tenía una concentración inicial de $0,25 \pm 0,00$ g/l, y se consumió el $100 \pm 0,00$ %. No hay ácido cítrico, ya que no está presente en este caso.

La concentración de PHB obtenida con este pretratamiento es de $7,57 \pm 0,21$ mg PHB/l (Tabla 4-3).

Tabla 4-3 Resultados experimento 1

	Valor	Media
Consumo de nitrógeno (%)	3,27*	35,33±5,49
	40,82	
	29,84	
Consumo glucosa (%)	95,85	96,78±0,91
	98,59	
	95,90	
Consumo de ácido acético (%)	63,78*	100±0,00
	100,00	
	100,00	
Consumo de ácido cítrico (%)	0,00	0,00±0,00
	0,00	
	0,00	
Concentración PHB (mg/l)	2,03*	7,57±0,21
	7,79	
	7,36	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

4.4.2. Experimento 2: Molino de bolas con buffer

En el experimento del molino de bolas sin buffer, el pretratamiento es el mismo que el indicado en el experimento 1, sin embargo, en la hidrólisis se añade buffer citrato para regular el pH. Se mide la concentración de nitrógeno del medio, así como una medida en HPLC de glucosa y VFAs.

Se parte de una concentración de nitrógeno de 96,61 mg/l, consumiendo un 28,48±3,90 % de nitrógeno.

La glucosa inicial del medio es de 1,34±0,00 g/l y hay un consumo del 96,01±0,02 %, mientras que para el ácido acético con una concentración inicial de 0,21±0,00 g/l, se consumió totalmente. El ácido cítrico sí está presente en este caso, con una concentración inicial de 0,39±0,00 g/l y un consumo del 58,79±3,72%.

RESULTADOS

La concentración de PHB obtenida con este pretratamiento es de $5,44 \pm 0,95$ mg PHB/l (Tabla 4-4).

Tabla 4-4 Resultados experimento 2

	Valor	Media
Consumo de nitrógeno (%)	7,16*	28,48 \pm 3,90
	32,37	
	24,58	
Consumo glucosa (%)	96,03	96,01 \pm 0,02
	95,98	
	96,03	
Consumo de ácido acético (%)	100,00	100,00 \pm 0,00
	100,00	
	100,00	
Consumo de ácido cítrico (%)	62,52	58,79 \pm 3,72
	55,07	
	1,12*	
Concentración PHB (mg/l)	6,91	5,44 \pm 0,95
	3,68	
	5,74	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

4.4.3. Experimento 3: Ácido

En el pretratamiento ácido, se prepara una disolución al 5% de alga con ácido clorhídrico 2M y se autoclava durante 1 hora a 121 °C.

En este caso apenas hubo consumo de nitrógeno ($0,44 \pm 0,28\%$).

La glucosa inicial del medio es de $2,42 \pm 8 \cdot 10^{-4}$ g/l y se llegó a consumir con este tratamiento un $42,28 \pm 1,39\%$, mientras que el consumo de ácido acético fue un $21,86 \pm 1,42\%$. El ácido cítrico con una concentración inicial de $1,85 \pm 1,51 \cdot 10^{-3}$ g/l, tiene un consumo del $70,01 \pm 12,71\%$.

La concentración de PHB obtenida con este pretratamiento es de $22,65 \pm 13,59$ mg PHB/l (Tabla 4-5).

Tabla 4-5 Resultados experimento 3

	Valor	Media
Consumo de nitrógeno (%)	0,17	0,44±0,28
	0,72	
	6,49*	
Consumo glucosa (%)	43,21	42,28±1,39
	39,55	
	44,08	
Consumo de ácido acético (%)	19,03	21,86±1,42
	23,24	
	23,31	
Consumo de ácido cítrico (%)	84,42	82,68±1,74
	80,94	
	44,67*	
Concentración PHB (mg/l)	16,75	22,65±13,59
	48,59	
	2,62	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

4.4.4. Experimento 4: Ácido dilución 1/2

En el experimento 4 se procede del mismo modo que el experimento 3, realizando una dilución al medio obtenido al final del pretratamiento.

La concentración inicial de nitrógeno en este caso es de 371,01 mg/l, y se obtiene un consumo del nitrógeno del 20,26±1,89 %.

La glucosa inicial del medio es de 1,21±0,00 g/l y hay un consumo del 87,78±4,78%, mientras que para el ácido acético había una concentración inicial de 0,15±0,00 g/l, con un consumo del 97,05±2,95%. El ácido cítrico tiene una concentración inicial de 0,96±0,00 g/l y un consumo del 71,04±2,09%.

La concentración de PHB obtenida con este pretratamiento es de 1,22±0,82 mg PHB/l (Tabla 4-6).

RESULTADOS

Tabla 4-6 Resultados experimento 4

	Valor	Media
Consumo de nitrógeno (%)	23,19	20,26±1,89
	20,88	
	16,72	
Consumo glucosa (%)	92,97	87,78±4,78
	92,12	
	78,24	
Consumo de ácido acético (%)	100,00	97,05±2,95
	91,16	
	100,00	
Consumo de ácido cítrico (%)	66,94	71,04±2,09
	73,77	
	72,41	
Concentración PHB (mg/l)	2,78	1,22±0,82
	0,87	
	0,00	

4.4.5. Experimento 5: Ácido optimizado

En el pretratamiento de ácido optimizado, se prepara una disolución al 7,5% de alga con ácido clorhídrico 2M y se autoclava durante 10 minutos a 121 °C.

La concentración inicial de nitrógeno en este caso es de 1212,96 mg/l, y se obtiene un consumo del nitrógeno del 19,26±1,10 %.

La glucosa inicial del medio es de 4,56±0,01 g/l, habiendo un consumo del 37,84±0,71%. El ácido acético tiene una concentración inicial en el medio de 0,46±0,01g/l y se obtiene un consumo del 25,25±1,18%. El ácido cítrico, por otra parte, tiene una concentración inicial de 2,71±0,01 g/l y un consumo del 50,54±8,84%.

La concentración de PHB obtenida con este pretratamiento es de 3,03±2,26 mg PHB/l (Tabla 4-7).

Tabla 4-7 Resultados experimento 5

	Valor	Media
Consumo de nitrógeno (%)	19,91	19,26±1,10
	20,75	
	17,12	
Consumo glucosa (%)	39,25	37,84±0,71
	37,06	
	37,20	
Consumo de ácido acético (%)	27,55	25,25±1,18
	23,64	
	24,57	
Consumo de ácido cítrico (%)	37,86	50,54±8,84
	67,54	
	46,23	
Concentración PHB (mg/l)	7,44	3,03±2,26
	1,65	
	0,00	

4.4.6. Experimento 6: Ácido optimizado dilución 1/2

El procedimiento se corresponde con el experimento 5, pero haciendo una dilución de 1/2 tras sacar la muestra del autoclave.

La concentración inicial de nitrógeno en este caso es de 606,48 mg/l, y se obtiene un consumo del nitrógeno del 10,51±1,51 %.

La glucosa inicial del medio es de 2,28±0,00 g/l y hay un consumo del 47,99±8,09%, mientras que para el ácido acético había una concentración inicial de 0,23±0,00g/l, con un consumo del 100,00±0,00%. El ácido cítrico tiene una concentración inicial de 1,35±0,00 g/l y un consumo del 16,42±9,33%.

La concentración de PHB obtenida con este pretratamiento es de 5,33±0,03 mg PHB/l (Tabla 4-8).

RESULTADOS

Tabla 4-8 Resultados experimento 6

	Valor	Media
Consumo de nitrógeno (%)	13,46	10,51±1,51
	8,44	
	9,64	
Consumo glucosa (%)	63,38	47,99±8,09
	35,93	
	44,67	
Consumo de ácido acético (%)	100,00	100,00±0,00
	100,00	
	100,00	
Consumo de ácido cítrico (%)	35,08*	7,09±0,12
	7,21	
	6,98	
Concentración PHB (mg/l)	5,29	5,33±0,03
	5,39	
	5,30	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

4.4.7. Comparativa de resultados con biomasa microalgal

4.4.7.1. Consumo de nitrógeno

El consumo de nitrógeno en los experimentos es más elevado para el experimento 1, con un consumo de nitrógeno del $35,33 \pm 5,49\%$ (Figura 4-25).

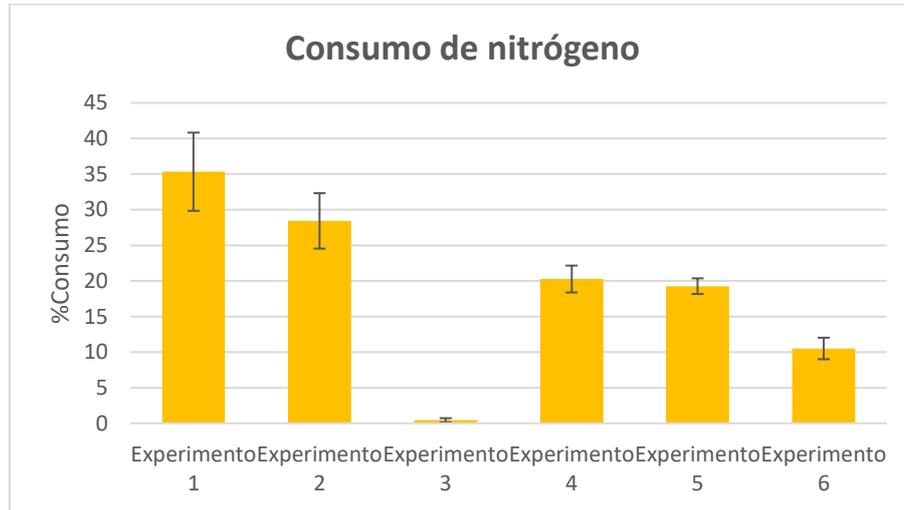


Figura 4-25 Consumo de nitrógeno con biomasa microalgal

4.4.7.2. Consumo de glucosa

En los experimentos con biomasa microalgal como fuente de carbono, se observa el consumo de glucosa por parte de *Cupriavidus*, siendo el experimento 1 en el que se observa mayor consumo de glucosa, con un porcentaje de consumo del $96,78 \pm 0,91\%$ (Figura 4-26).

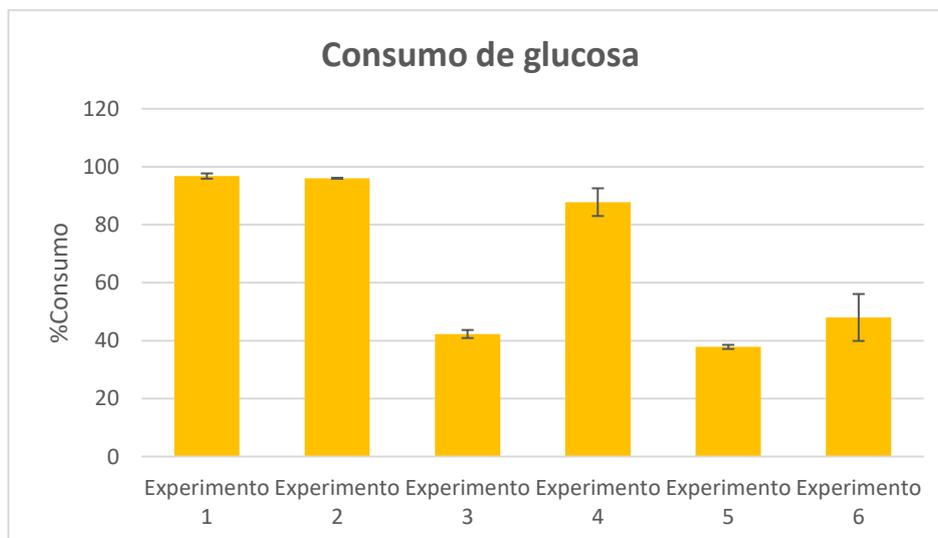


Figura 4-26 Datos HPLC glucosa residual con biomasa microalgal

RESULTADOS

4.4.7.3. Consumo de ácido acético

En los experimentos que usan biomasa microalgal como fuente de carbono, al igual que con la glucosa, hay un consumo de ácido acético de hasta el $100\pm 0,00\%$ para los casos de los experimentos 1, 2 y 6 (Figura 4-27).

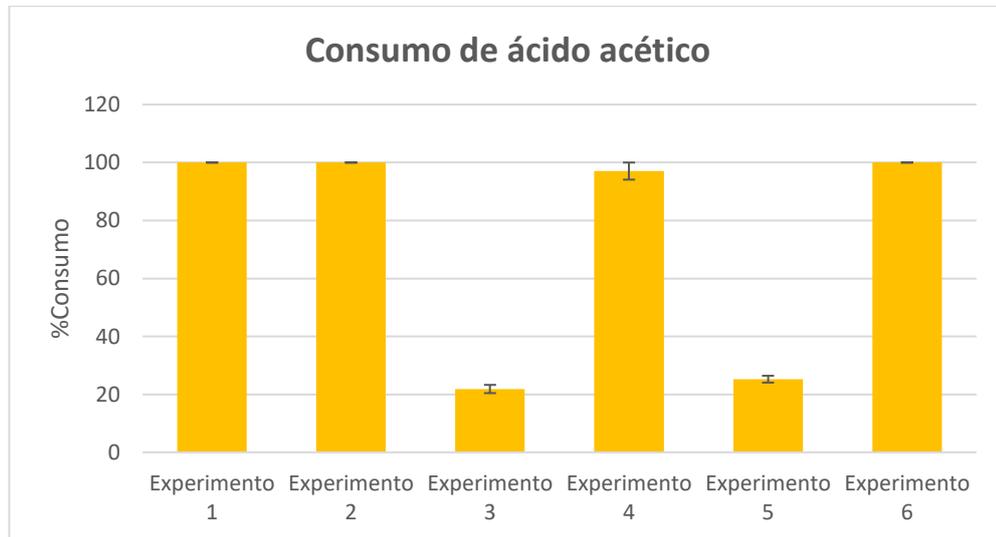


Figura 4-27 Datos HPLC ácido acético residual con biomasa microalgal

4.7.7.4. Consumo de ácido cítrico

Al igual que con la glucosa y el ácido acético, *Cupriavidus* consume ácido cítrico como fuente de carbono cuando se usa biomasa microalgal, consumiendo hasta un porcentaje de $82,68\pm 1,74\%$ del ácido cítrico presente en la biomasa en el caso del experimento 3 (Figura 4-28).

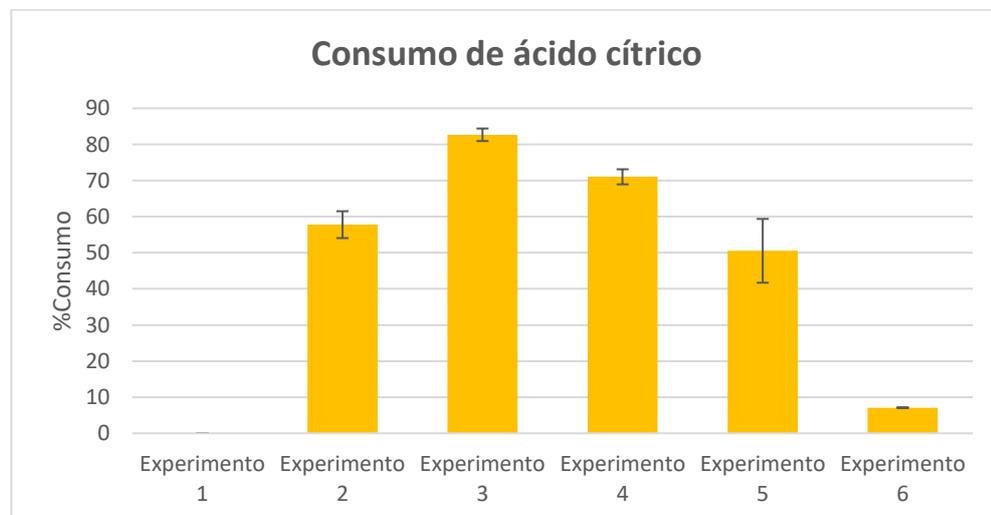


Figura 4-28 Datos HPLC ácido cítrico residual con biomasa microalgal

4.7.7.5. Concentración de PHB

Se ha estudiado la concentración de PHB con diferentes pretratamientos a la biomasa microalgal, obteniendo la concentración más alta para el pretratamiento con ácido clorhídrico 2M, obteniendo una concentración de PHB de $22,65 \pm 23,54$ mg/l, mientras que el valor más bajo se obtiene con el pretratamiento de ácido clorhídrico 2M diluido a un medio, con una concentración de PHB de $1,21 \pm 1,42$ mg/l (Figura 4-29).

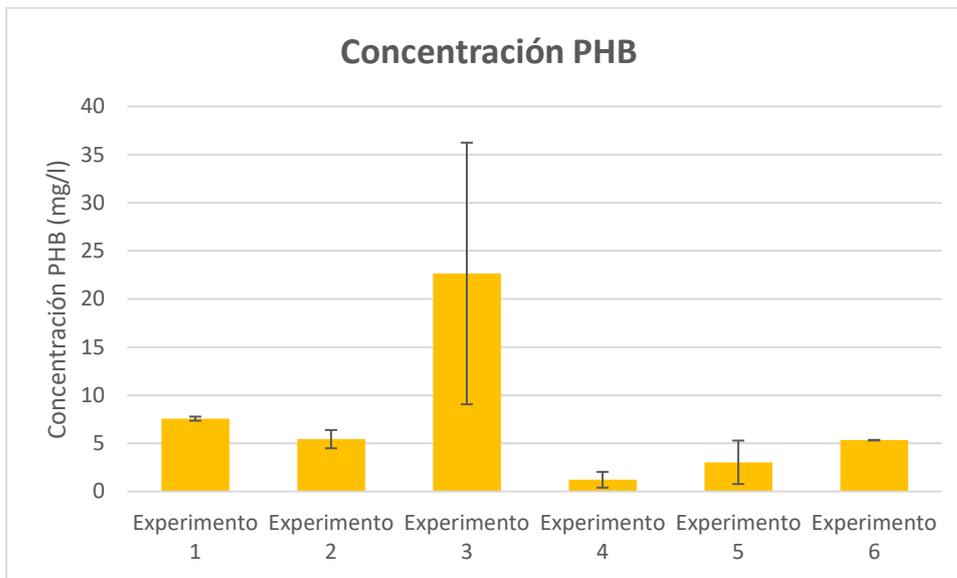


Figura 4-29 Concentración de PHB con biomasa microalgal como fuente de carbono y distintos pretratamientos

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Glucosa

En el crecimiento de *Cupriavidus* con glucosa como fuente de carbono se observa que, para tiempos de 24 horas, el crecimiento aumenta hasta una concentración de 5 g/l, a partir de la cual permanece en unos valores similares hasta 20 g/l. Sin embargo, para 72 horas de crecimiento, el crecimiento de *Cupriavidus* aumenta con la concentración de glucosa. Esto es debido a que la bacteria no puede asimilar la cantidad de glucosa añadida al medio en un tiempo de 24 horas, por lo que el crecimiento es el mismo a partir de 5 g/l de glucosa en tiempos de 24 horas.

Por otra parte, el consumo de nitrógeno para el tiempo de crecimiento de 72 horas aumenta de forma directa con el aumento en la concentración de glucosa, ya que una mayor concentración de SST supone un mayor consumo del nitrógeno del medio para el crecimiento.

Finalmente, a pesar de que el crecimiento es mayor a 72 horas que a 24, la acumulación de PHB es mayor (tanto en concentración como en porcentaje) para tiempos de crecimiento de 24 horas que de 72 horas. La mayor acumulación de PHB, $566,45 \pm 54,16$ mg/l, se obtiene para una concentración de 20 g/l de glucosa y 24 horas de crecimiento. La mayor acumulación para 72 horas de crecimiento fue de $103,88 \pm 10,20$ mg/l de PHB.

Purama et al., (2018) estudiaron el crecimiento de *Cupriavidus necator* H16 Re2058/pCB113, durante tiempos de 16-18 horas a 30°C y con una agitación de 200 rpm, y acumulación de PHB mediante limitación de nitrógeno durante 48 horas, usando melaza (azúcar diluido en agua) como fuente de carbono, obteniendo la mayor concentración de PHB para una concentración de 20 g/l de azúcar con una concentración de PHB de $1,33 \pm 0,05$ g/l.

En el estudio de Yong Sen et al., (2019), se emplean distintos azúcares de melazas, principalmente glucosa, fructosa y sacarosa. Se emplea un tiempo de crecimiento de 24 horas a 30°C y 250 rpm y un tiempo de acumulación variable, entre 2 y 84 horas, con una limitación de nitrógeno en el medio.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO *CUPRIAVIDUS NECATOR*

Cuando se usan $2,81 \pm 0,10$ g/l de glucosa como fuente de carbono, para un tiempo de acumulación de 72 horas, se obtiene una concentración de PHB de $1,62 \pm 0,45$ g/l.

5.2. Ácido acético

Al estudiar el crecimiento de *Cupriavidus necator* con ácido acético como fuente de carbono, se observa que cuando se utiliza únicamente el ácido, no se observa apenas crecimiento en la bacteria, mientras que, para una mezcla de glucosa y ácido acético, se observa un crecimiento de hasta 0,5 g/l de ácido acético, concentración a partir de la cual el ácido resulta tóxico para el crecimiento.

La mayor acumulación de PHB se produce con 24 horas de crecimiento de *Cupriavidus* con 15 g/l de glucosa, 0,25 g/l de ácido acético, llegando a alcanzar un valor de 3244,93 mg/l de PHB, valor seis veces mayor que el máximo obtenido con glucosa.

Marudkla et al., (2018) estudió el efecto del ácido acético sobre el crecimiento de *Cupriavidus necator* y sobre la acumulación de PHB. La mayor concentración de PHB obtenida fue de $6,54 \pm 0,44$ g/l para una concentración de 0,5 g/l de ácido acético y 15 g/l de glucosa. El tiempo de crecimiento empleado fue de 32 horas y de acumulación de 32 horas y la acumulación de PHB se realizó mediante una limitación de nitrógeno en el medio.

5.3. Ácido cítrico

El crecimiento de *Cupriavidus necator* con ácido cítrico como fuente de carbono alcanza su máximo para una concentración de 1 g/l, a partir del cual la concentración de ácido resulta tóxica para el crecimiento.

La mayor acumulación de PHB se produce para 15 g/l de glucosa, 24 horas de crecimiento y una concentración de ácido cítrico de 1 g/l, con un valor de $6357,01 \pm 245,68$ mg/l, mientras que para tiempos de crecimiento de 72 horas, la concentración de PHB más alta obtenida se da para una concentración de 1 g/l de ácido acético, con un valor de $111,40 \pm 25,95$ mg/l

DISCUSIÓN

de PHB. El valor obtenido a 24 horas de crecimiento es 12 veces mayor que el valor máximo obtenido con glucosa como fuente de carbono

Aramvash et al., (2016) estudiaron el crecimiento y acumulación de PHB, empleando un tiempo de crecimiento de 48 horas y un tiempo de acumulación de otras 48 horas y a 30°C de temperatura y 200 rpm de agitación. Como fuente de carbono, se usan 20 g/l de fructosa y 1,2 g/l de ácido cítrico, obteniendo una acumulación de $0,5\pm 0,001$ g/l de PHB limitando el nitrógeno del medio

5.4. Biomasa microalgal

En los resultados obtenidos con pretratamientos de biomasa microalgal, se obtienen unas concentraciones de PHB bajas respecto a los valores máximos obtenidos en estudios previos. Los experimentos se realizaron con 72 horas de crecimiento, ya que supusimos a mayor crecimiento de la bacteria mayor acumulación de PHB; pero cuando luego analizamos los datos de acumulación de PHB, observamos que nuestra suposición no había sido acertada, ya que había mayor acumulación con 24h de crecimiento que con 72h.

De los seis experimentos planteados con la biomasa microalgal, se puede concluir que usando la biomasa microalgal, la bacteria *Cupriavidus necator* consume glucosa (hasta un $96,78\pm 0,91\%$ en el experimento 2), así como ácido acético, que llega a ser consumido en su totalidad en el experimento 2 y ácido cítrico, aunque en menor porcentaje, con un consumo máximo en el experimento 4 del $71,04\pm 2,09\%$. La producción de PHB alcanza su máximo en el pretratamiento ácido (experimento 3), con un valor de $22,65\pm 13,59$ mg/l, mientras que, con el pretratamiento de ácido diluido, se obtiene la concentración más baja de PHB, $1,22\pm 0,82$ mg/l.

Además, las concentraciones iniciales de glucosa fueron menores de las esperadas, comparando con los valores previos de concentración de glucosa y de ácidos de los que partimos (Tabla 1-1). En el pretratamiento de molino de bolas (experimentos 1 y 2), la concentración de glucosa esperada era de $3,00\pm 0,00$ g/l, obteniendo en este experimento un valor de $1,34\pm 0,00$ g/l de glucosa para el pretratamiento de molino de bolas con buffer citrato

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

(experimento 1) y $1,56 \pm 0,00$ g/l para el pretratamiento sin buffer (experimento 2). La glucosa esperada para el pretratamiento ácido era de $15,00 \pm 0,00$ g/l, mientras que la obtenida en el pretratamiento fue de $2,42 \pm 0,01$ g/l. Por último, para el pretratamiento del ácido optimizado, se esperaba una concentración de glucosa de $7,00 \pm 0,00$ g/l frente a los $4,56 \pm 0,01$ g/l obtenidos tras el pretratamiento.

En el caso del pretratamiento ácido y ácido optimizado, la concentración de ácido cítrico obtenida tras los pretratamientos supera la tolerancia de la bacteria con valores de $1,85 \pm 1,50 \cdot 10^{-3}$ g/l y $3,07 \pm 0,02$ g/l respectivamente, siendo estos valores superiores a los esperados, basándonos en los datos preliminares de los que se partían (Tabla 1-1).

Los valores bajos de PHB se pueden deber a la aparición en el hidrolizado de otros ácidos no estudiados en este trabajo y de los cuales se desconoce la toxicidad. Además, la elección de tiempos de crecimiento de 72 horas puede también afectar a la acumulación de PHB, ya que se ha demostrado una mayor acumulación, tanto en porcentajes como en concentración de PHB, para tiempos de crecimiento de 24 horas.

6. CONCLUSIONES

6.CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio de los inhibidores en el crecimiento y acumulación de PHB por *Cupriavidus necator* se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha comprobado la capacidad de *Cupriavidus* para producir PHB usando glucosa como fuente de carbono.
- Se obtienen mejores resultados de acumulación de PHB en *Cupriavidus necator* para tiempos de crecimiento de 24 horas que de 72 horas, por lo que un mayor crecimiento no supone una mayor acumulación de PHB.
- La acumulación de PHB es directamente proporcional a la concentración de glucosa.
- El ácido acético es tóxico para el crecimiento de *Cupriavidus* a partir de una concentración de 0,5g/l.
- El ácido cítrico es tóxico para el crecimiento de *Cupriavidus* a partir de una concentración de 2,5 g/l.
- Al usar como fuente de carbono 7 g/l glucosa y ácido acético a una concentración de 0,25 g/l se obtuvo una acumulación de PHB de 2419,68±50,25 mg/l, superior a la obtenida con glucosa.
- Al usar como fuente de carbono 15 g/l glucosa y ácido acético a una concentración de 0,25 g/l se obtuvo una acumulación de PHB de 3244,93±341,21 mg/l, superior a la obtenida con glucosa.
- Al usar como fuente de carbono 7 g/l glucosa y ácido cítrico a una concentración de 1 g/l se obtuvo una acumulación de PHB de 2352,54±136,25 mg/l, superior a la obtenida con glucosa.
- Al usar como fuente de carbono 15 g/l glucosa y ácido cítrico a una concentración de 1 g/l se obtuvo una acumulación de PHB de 6357,01±245,67 mg/l, superior a la obtenida con glucosa.

Tabla 6-1 Resumen resultados de concentración de PHB

Concentración de glucosa (g/l)	Concentración de ácido con mayor acumulación de PHB	Concentración PHB con 24 horas de crecimiento (mg/l)	Concentración PHB con 72 horas de crecimiento (mg/l)
7	-	206,99±3,83	n.d.
15	-	366,47±7,35	n.d.
7	0,25 g/l ácido acético	2419,68±50,25	82,76±2,63
15	0,25 g/l ácido acético	3244,93±341,21	31,84±12,67
7	1 g/l ácido cítrico	2352,54±136,25	74,10±11,96
15	1 g/l ácido cítrico	6357,01±245,67	111,40±25,95

- *Cupriavidus necator* ha consumido residuos de la biomasa microalgal, como glucosa, ácido acético o ácido cítrico para su crecimiento.
- No hemos conseguido acumular PHB usando biomasa microalgal como fuente de carbono por la posible presencia de otros VFAs cuya toxicidad no ha sido estudiada o por el tiempo de crecimiento elegido en el experimento no era el óptimo.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Achilias, D.S., Roupakias, C., Megalokonomos, P., Lappas, A.A., Antonakou, V., 2007. Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP). *J. Hazard. Mater.* 149, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.076>
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Aramvash, A., Hajizadeh-Turchi, S., Moazzeni-Zavareh, F., Gholami-Banadkuki, N., Malek-Sabet, N., Akbari-Shahabi, Z., 2016. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in *Cupriavidus necator* and its characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 397–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002>
- Arroyo, M. del M.D., Hornedo, R.M. de I., Sánchez, J.V.M., Cofreces, C.L., González, M.C.G., 2007. Evaluación De Residuos Orgánicos De Origen Animal Procedentes De Granjas Avícolas. *Ing. Recur. Nat. y del Ambient.* 33–39.
- Azizi, N., Najafpour, G., Younesi, H., 2017. Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using *Cupriavidus necator*. *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 1029–1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.184>
- BBC News, 2017. Ocean plastic a “planetary crisis” - UN - BBC News [WWW Document]. URL <https://www.bbc.com/news/science-environment-42225915> (accessed 7.9.19).
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.* 8, 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- D’Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., Bastiaens, L., 2017. Cell disruption technologies, in: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Elsevier, pp. 133–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>
- De Farias Silva, C.E., Sforza, E., 2016. Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. *Process Biochem.* 51, 2112–2118.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.015>

- Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennete, N., Ananyev, G.M., Posewitz, M.C., 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007>
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T., Manuel Estevez, J., Oneill, M., Popper, Z.A., 2012. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Enzymes for education, 2018. Cellulase (Celluclast) [WWW Document]. URL <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/celluclast.html> (accessed 7.8.19).
- Fonseca Santiago, A., Lucia Calijuri, M., Peixoto Assemany, P., do Carmo Calijuri, M., José Delgado dos Reis, A., Santiago, F., 2013. Environmental Technology Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent) Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. *Environ. Technol.* 34, 1877–1885. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.812670>
- Frutos, O.D., Barriguín, G., Lebrero, R., Muñoz, R., 2017. 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.* 598, 765–771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.161>
- Fuentes, J.L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-Del-Valle, M., Vílchez, C., 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Mar. Drugs* 14. <https://doi.org/10.3390/md14050100>
- Gahlawat, G., Soni, S.K., 2017. Bioresource Technology Valorization of waste glycerol for the production of poly copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresour. Technol.* 243, 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.139>
- García, D., Posadas, E., Blanco, S., Ación, G., García-Encina, P., Bolado, S., Muñoz, R., 2018. Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 248, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079>
- García, D., Posadas, E., Grajeda, C., Blanco, S., Martínez-Páramo, S., Ación, G., García-Encina, P., Bolado, S., Muñoz, R., 2017. Comparative evaluation of piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors under

BIBLIOGRAFÍA

- indoor and outdoor conditions. *Bioresour. Technol.* 245, 483–490.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.135>
- Gomez Millan, G., 2015. Desarrollo de biorrefinerías en el mundo (Biorefineries development : a worldwide review). *Cienc. Desarro.*
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Hames, B., 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : April 2008 Revision Date : August 2012.
- Idris, S., M Ibrahim, H., Safiyanu & Saleh ibrahim, A., 2018. General review on toxic algae.
- Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* 17, 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kootstra, M., Elissen, H., Huurman, S., 2017. A running document for "Kleinschalige Bioraffinage PHA's (Polyhydroxyalkanoates): General information on structure and raw materials for their production.
- Marjadi, D; Dharaiya, N., 2018. Isolating Potential Microorganisms for Production of Poly- a - Hydroxybutyrate: A Better Option for Biodegradable Plastic. *Microb. Res. An Overv.* 223–248.
- Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S., Bolado Rodríguez, S., 2016. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresour. Technol.* 218, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.087>
- Martín Juárez, J., Riol Pastor, E., Fernández Sevilla, J.M., Muñoz Torre, R., García-Encina, P.A., Bolado Rodríguez, S., 2018. Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. *Bioresour. Technol.* 257, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.063>
- Marudkla, J., Lee, W.-C., Wannawilai, S., Chisti, Y., Sirisansaneeyakul, S., 2018. Model of acetic acid-affected growth and poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.004>
- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F., 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chim. Acta* 356, 328–334.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

[https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00363-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00363-3)

- Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Ación Fernández, F., Robles Medina, A., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Mozumder, M.S.I., Garcia-Gonzalez, L., De Wever, H., Volcke, E.I.P., 2015. Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* 191, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.110>
- Park, S., Li, Y., 2012. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresour. Technol.* 111, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.160>
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M., 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1791-x>
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G.R., Nicolaus, B., 2011. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea* 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/693253>
- Postma, P.R., Suarez-Garcia, E., Safi, C., Yonathan, K., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2017. Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. *Bioresour. Technol.* 224, 670–679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.071>
- Povolo, S., 2015. Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Cupriavidus necator* from Fatty Waste Can Be Enhanced by phaZ1 Inactivation. *Chem. Biochem. Eng. Q. J.* 29, 67–74. <https://doi.org/10.15255/cabeq.2014.2248>
- Purama, R.K., Al-Sabahi, J.N., Sudesh, K., 2018. Evaluation of date seed oil and date molasses as novel carbon sources for the production of poly(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyhexanoate) by *Cupriavidus necator* H16 Re 2058/pCB113. *Ind. Crops Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.013>
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., Ramsay, J.A., 1990. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2093–2098.
- Sharma, L., Mallick, N., 2005. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light–dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresour. Technol.* 96, 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.009>

BIBLIOGRAFÍA

- Shim, J., Hong, S.H., Eo, S., 2018. Chapter 1 - Marine Microplastics: Abundance, Distribution, and Composition. *Microplastic Contam. Aquat. Environ.* 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813747-5.00001-1>
- Shrivastav, A., Kim, H.-Y., Kim, Y.-R., 2013. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/581684>
- Tijani, H., Abdullah, N., Yuzir, A., 2015. Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 1610–1622. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.179>
- Toledo-Cervantes, A., Lebrero, R., Cavinato, C., Muñoz, R., 2017. Biogas upgrading using algal-bacterial processes. *Microalgae-Based Biofuels Bioprod. From Feed. Cultiv. to End-Products* 283–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00012-1>
- van Harmelen, T., Oonk, H., 2006. MICROALGAE BIOFIXATION PROCESSES: Applications and Potential Contributions to Greenhouse Gas Mitigation Options.
- Yong Sen, K., Hazwan Hussin, M., Baidurah, S., 2019. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>

8. ANEXOS

8.ANEXOS

8.1. Anexo I: Calibrado DNS

Tabla 8-1 Datos Recta de calibrado del DNS 1

Muestra	OD	OD	Media	Concentración glucosa (g/L)
Blanco	0,027	0,026	0,0264	0
1	0,198	0,214	0,2058	0,02
2	0,264	0,400	0,3249	0,04
3	0,785	0,829	0,8067	0,08
4	1,094	1,158	1,1255	0,12
5	1,382	1,518	1,4484	0,16

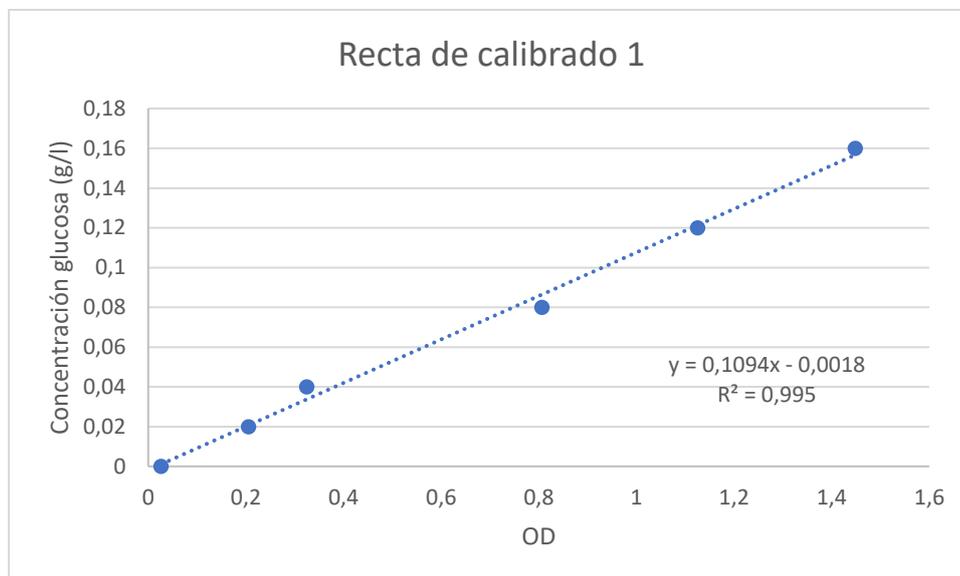


Figura 8-1 Recta de calibrado 1

8.2. Anexo II: Resultados

8.2.1. Glucosa

Tabla 8-2 Crecimiento de la bacteria con glucosa a distintos tiempos

Concentración glucosa (g/l)	Concentración SST 24 horas (g/l)	Media Concentración 24 horas (g/l)	Concentración SST 72 horas (g/l)	Media Concentración 72 horas (g/l)
0	$5,13 \cdot 10^{-3}$	$5,93 \cdot 10^{-3} \pm 9,27 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4} \pm 0,00$
	$5,13 \cdot 10^{-3}$		$3 \cdot 10^{-4}$	
	$7,91 \cdot 10^{-3}$		$3 \cdot 10^{-4}$	
2,5	$15,95 \cdot 10^{-2}$	$14,57 \cdot 10^{-2} \pm 7,02 \cdot 10^{-3}$	$81,80 \cdot 10^{-2}$	$85,24 \cdot 10^{-2} \pm 5,71 \cdot 10^{-2}$
	$13,59 \cdot 10^{-2}$		$96,82 \cdot 10^{-2}$	
	$14,28 \cdot 10^{-2}$		$78,19 \cdot 10^{-2}$	
5	$19,36 \cdot 10^{-2}$	$18,40 \cdot 10^{-2} \pm 1,59 \cdot 10^{-2}$	1,84	$1,75 \pm 4,85 \cdot 10^{-2}$
	$20,82 \cdot 10^{-2}$		1,67	
	$15,46 \cdot 10^{-2}$		1,74	
7	$19,21 \cdot 10^{-2}$	$19,17 \cdot 10^{-2} \pm 2,55 \cdot 10^{-4}$	-	-
	$19,12 \cdot 10^{-2}$		-	
10	$19,15 \cdot 10^{-2}$	$19,39 \cdot 10^{-2} \pm 1,11 \cdot 10^{-2}$	3,83	$3,58 \pm 0,14$
	$21,51 \cdot 10^{-2}$		3,57	
	$17,69 \cdot 10^{-2}$		3,35	
15	$18,37 \cdot 10^{-2}$	$18,94 \cdot 10^{-2} \pm 5,65 \cdot 10^{-4}$	-	-
	$19,59 \cdot 10^{-2}$		-	
20	$17,13 \cdot 10^{-2}$	$18,98 \cdot 10^{-2} \pm 1,02 \cdot 10^{-2}$	5,38	$5,66 \pm 0,31$
	$20,61 \cdot 10^{-2}$		6,30	
	$19,36 \cdot 10^{-2}$		5,34	

ANEXOS

Tabla 8-3 Concentración de nitrógeno tras 72 horas con glucosa como fuente de carbono

Concentración glucosa (g/l)	Porcentaje de consumo de nitrógeno (%)	Media de porcentaje (%)
0	26,06	24,12±1,15
	24,23	
	22,08	
2,5	43,65	46,30±1,34
	47,25	
	47,99	
5	69,08	71,07±1,34
	73,63	
	70,50	
10	92,88	93,75±0,47
	93,87	
	94,50	
20	94,69	93,89±0,91
	92,07	
	94,90	

Tabla 8-4 Concentración de glucosa final

Concentración glucosa inicial (g/l)	Concentración de glucosa final (g/l)	Media de concentración de glucosa final (g/l)
0	0,00	0,0000±0
	0,00	
	0,00	
2,5	0,00	0,0000±0
	0,00	
	0,00	
5	0,00	0,00±0,00
	0,00	
	0,00	
10	1,00·10 ⁻³	3,00·10 ⁻⁴ ±3,00·10 ⁻⁴
	0,00	
	0,00	
20	2,79·10 ⁻²	2,76·10 ⁻² ±6,31·10 ⁻³
	2,87·10 ⁻²	
	1,63·10 ⁻²	

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

Tabla 8-5 Concentraciones de PHB con glucosa como fuente de carbono

Concentración glucosa (g/l)	PHB 24 horas (mg/l)	Media PHB 24 horas (mg/l)	PHB 72 horas (mg/l)	Media PHB 72 horas (mg/l)
0	0,00	0,00±0	0,00	0,00±0
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
2,5	76,35	114,63±20,79	59,33	62,01±6,85
	119,72		74,98	
	147,83		51,72	
5	295,69	191,39±56,11	111,57	103,88±10,20
	175,11		116,40	
	103,38		83,66	
7	210,82	206,99±3,83	-	-
	203,17		-	
	474,46		33,25	
10	120,81	229,52±122,73	13,93	21,03±6,13
	93,28		15,92	
	359,12		-	
15	373,81	366,47±7,35	-	-
	465,18		202,44	
	650,37		214,84	
20	583,81	566,45±54,16	225,04	214,11±6,53
			214,84	

ANEXOS

Tabla 8-6 Porcentaje de PHB acumulado con glucosa como fuente de carbono

Concentración glucosa (g/l)	PHB 24 horas (%)	Media PHB 24 horas (%)	PHB 72 horas (%)	Media PHB 72 horas (%)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
2,5	9,72	15,41±2,93	7,89	7,34±0,59
	17,05		7,97	
	19,47		6,17	
5	30,84	20,80±5,27	5,82	5,70±0,49
	18,58		6,48	
	12,98		4,81	
7	23,14	11,98±0,15	-	-
	22,83		-	
	56,43		0,90	
10	13,89	27,19±14,64	0,39	0,59±0,16
	11,26		0,47	
	39,12		-	
15	42,73	40,93±1,81	-	-
	61,27		2,82	
	70,67		3,10	
20	65,99	65,98±2,71	3,00	2,97±0,08

8.2.2. Ácido acético y 7 g/l glucosa

Tabla 8-7 Crecimiento con ácido acético y 7g/l de glucosa a distintos tiempos

Concentración ácido acético(g/l)	Concentración SST 24 horas (g/l)	Media Concentración 24 horas (g/l)	Concentración SST 72 horas (g/l)	Media Concentración 72 horas (g/l)
0	9,60·10 ⁻⁴	1,29·10 ⁻³ ±4,63·10 ⁻⁴	0,00	0,00±0,00
	9,60·10 ⁻⁴		0,00	
	2,35·10 ⁻³		0,00	
0,25	1,04	1,13±0,06	1,95	1,82±0,08
	1,19		1,77	
	1,22		1,74	
	1,13		-	
	1,09		-	
0,5	2,14	2,13±0,01	2,64	2,44±0,10
	2,16		2,32	
	2,18		2,37	
	2,06		-	
	2,15		-	
0,75	0,00	0,00±0,00	0,09	0,09±0,002
	0,00		0,09	
	0,00		0,09	
1	0,00	0,00±0,00	-	-
	0,00		-	
	0,00		-	

ANEXOS

Tabla 8-8 Concentración de nitrógeno tras 72 horas con 7 g/l de glucosa y ácido acético como fuente de carbono

Concentración Ácido acético (g/l)	Porcentaje consumo nitrógeno (%)	Media de porcentaje (%)
0	0,43	4,98±3,44
	2,79	
	11,72	
0,25	65,54	76,27±5,36
	81,74	
	81,53	
0,5	75,38	72,25±3,08
	66,09	
	75,29	
0,75	30,29	29,01±1,65
	31,00	
	25,74	

Tabla 8-9 Resultados HPLC para 7 g/l glucosa y ácido acético

Concentración Ácido acético (g/l)	Glucosa (g/l)	Media glucosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Media ácido acético (g/l)	Ácido cítrico (g/l)	Media ácido cítrico (g/l)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	2,79	2,77±0,03
	0,00		0,00		2,71	
	0,00		0,00		2,81	
0,25	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0	2,64	2,63±0,01
	0,00		0,00		2,63	
	0,00		0,00		2,63	
0,5	0,00	0,03±0,02	0,00	0,00±0,00	2,64	2,63±0,01
	0,06		0,00		2,65	
	0,03		0,00		2,61	
0,75	4,47	4,48±0,10	0,50	0,49±0,01	2,69	2,68±0,01
	4,32		0,49		2,66	
	4,66		0,48		2,68	

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

Tabla 8-10 Concentración de PHB con 7g/l de glucosa y ácido acético

Concentración ácido acético (g/l)	PHB 24 horas (mg/l)	Media PHB 24 horas (mg/l)	PHB 72 horas (mg/l)	Media PHB 72 horas (mg/l)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
0,25	2368,43	2468,98±150,46	78,14	82,76±2,63
	2356,96		82,89	
	2538,65		87,24	
	2637,07		-	
	2845,77		-	
0,5	2640,01	2264,28±190,78	32,00	32,86±9,45
	2296,30		16,95	
	1550,68		49,64	
	2539,23		-	
	2295,16		-	
0,75	0,00	0,00±0,00	5,60	5,49±0,05
	0,00		5,47	
	0,00		5,42	

ANEXOS

Tabla 8-11 Acumulación de PHB con 7 g/l de glucosa y ácido acético como fuente de carbono

Concentración ácido acético (g/l)	PHB 24 horas (%)	Media PHB 24 horas (%)	PHB 72 horas (%)	Media PHB 72 horas (%)
0	0,00	0,00±0	0,00	0,00±0,00
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
0,25	32,14	31,67±0,56	3,77	4,10±0,19
	33,67		4,11	
	30,69		4,42	
	31,22		-	
	30,67		-	
0,5	26,17	33,93±3,6	1,14	1,57±0,22
	30,67		1,77	
	47,43		1,81	
	31,28		-	
	34,12		-	
0,75	0,00	0,00±0,00	15,44	15,58±0,07
	0,00		15,62	
	0,00		15,67	
1	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

8.2.3. Ácido acético y 15 g/l glucosa

Tabla 8-12 Crecimiento con ácido acético y 15g/l de glucosa a distintos tiempos

Concentración ácido acético (g/l)	Concentración SST 24 horas (g/l)	Media Concentración 24 horas (g/l)	Concentración SST 72 horas (g/l)	Media Concentración 72 horas (g/l)
0	1,65·10 ⁻³	3,27·10 ⁻³ ±8,36·10 ⁻⁴	1,21·10 ⁻²	1,21·10 ⁻² ±0,00
	3,74·10 ⁻³		-	
	4,44·10 ⁻³		-	
0,25	1,41	1,42±2,21·10 ⁻²	8,08	8,52±22,55·10 ⁻²
	1,42		8,79	
	1,48		8,71	
	1,37			
	1,42			
0,5	0,59	0,70±0,49	0,21	0,21±6,5·10 ⁻²
	0,76		0,19	
	0,69		0,22	
	0,73		-	
	0,72		-	
0,75	0,064	7,10·10 ⁻² ±4,7·10 ⁻³	0,08	0,08±3,7·10 ⁻³
	0,067		0,08	
	0,080		-	
1	0,00	0,00±0,00	-	-
	0,00		-	
	0,00		-	

Tabla 8-13 Concentración de nitrógeno tras 72 horas con 15 g/l de glucosa y ácido acético

Concentración Ácido acético (g/l)	Porcentaje consumo nitrógeno (%)	Media de porcentaje (%)
0	16,78	16,78±0,00
	86,63	
0,25	88,72	88,42±0,96
	89,90	
0,5	32,40	30,74±1,72
	27,29	
	32,51	
0,75	36,00	34,56±1,44
	33,12	

ANEXOS

Tabla 8-14 Resultados HPLC para glucosa 15 g/l y ácido acético

Concentración Ácido acético (g/l)	Glucosa (g/l)	Media glucosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Media ácido acético (g/l)	Ácido cítrico (g/l)	Media ácido cítrico (g/l)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	2,77	2,77±0,00
	2,81*		0,00		2,66	
0,25	11,14	10,52±0,62	0,00	0,00±0,00	7,02	4,67±1,27
	9,90		0,00		4,34	
0,5	12,62		0,00		7,41	
	12,40	12,11±0,41	0,00	0,00±0,00	6,80	7,34±0,29
0,75	11,31		0,00		7,80	
	12,59	12,76±0,17	0,59	0,58±0,01	6,32	6,36±0,04
	12,92		0,57		6,40	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

Tabla 8-15 Concentración de PHB con 15 g/l de glucosa y ácido acético

Concentración ácido acético (g/l)	PHB 24 horas (mg/l)	Media PHB 24 horas (mg/l)	PHB 72 horas (mg/l)	Media PHB 72 horas (mg/l)
0	0,00		0,00	
	0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00
	0,00		-	
0,25	3797,35		56,60	
	3882,72		14,77	
	3710,20	3244,932±341,21	24,14	31,84±12,67
	2295,16		-	
	2539,23		-	
0,5	2223,73		0,00	
	2446,65		0,00	
	1955,77	2285,96±125,25	0,00	0,00±0,00
	2129,64		-	
0,75	2674,03		-	
	58,51		0,00	
	52,04	52,31±3,51	0,00	0,00±0,00
1	46,38		-	
	0,00		-	
	0,00	0,00±0,00	-	-
	0,00		-	

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

Tabla 8-16 Acumulación de PHB con 15 g/l de glucosa y ácido acético como fuente de carbono

Concentración ácido acético (g/l)	PHB 24 horas (%)	Media PHB 24 horas (%)	PHB 72 horas (%)	Media PHB 72 horas (%)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	0,00		-	
	0,00		-	
0,25	34,26	29,41±2,07	1,38	0,83±0,29
	31,94		0,42	
	31,93		0,67	
	23,81		-	
	25,12		-	
0,5	78,38	74,91±2,59	0,00	0,00±0,00
	76,33		0,00	
	64,74		0,00	
	76,39		-	
0,75	78,73	22,51±1,06	-	0,00±0,00
	23,21		0,00	
	23,88		0,00	
1	20,43	0,00±0,00	-	-
	0,00		-	
	0,00		-	

ANEXOS

8.2.4. Ácido cítrico y 7 g/l de glucosa

Tabla 8-17 Crecimiento con ácido cítrico y 7g/l de glucosa a distintos tiempos

Concentración ácido cítrico (g/l)	Concentración SST 24 horas (g/l)	Media Concentración 24 horas (g/l)	Concentración SST 72 horas (g/l)	Media Concentración 72 horas (g/l)
0	2,64·10 ⁻⁴	9,60·10 ⁻⁴ ±4,01·10 ⁻⁴	0,000	0,00±0,00
	1,65·10 ⁻³		0,00	
	9,60·10 ⁻⁴		0,00	
0,5	19,14·10 ⁻²	18,94·10 ⁻² ±5,12·10 ⁻²	1,82	1,78±0,03
	18,37·10 ⁻²		1,79	
	31,11·10 ⁻²		4,79	
	32,64·10 ⁻²		4,11	
1	32,50·10 ⁻²	32,12·10 ⁻² ±4,64·10 ⁻³	4,35	4,41±0,19
	31,820·10 ⁻²		-	
	32,84·10 ⁻²		-	
	0,00		1,82	
2,5	0,00	0,00±0,00	1,79	1,78±0,03
	0,00		1,72	
	0,00		1,72	
5	9,60·10 ⁻⁴	1,65·10 ⁻³ ±4,01·10 ⁻⁴	-	
	2,35·10 ⁻³		-	
	1,65·10 ⁻²		-	
7,5	0,00	1,43·10 ⁻³ ±4,64·10 ⁻⁴	-	-
	2,35·10 ⁻³		-	
	3,74·10 ⁻³		-	
10	0,00	2,03·10 ⁻³ ±1,09·10 ⁻³	-	-
	2,35·10 ⁻³		-	
	3,74·10 ⁻³		-	

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR**



Tabla 8-18 Concentración de nitrógeno tras 72 horas con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico

Concentración Ácido cítrico (g/l)	Porcentaje consumo nitrógeno (%)	Media de porcentaje (%)
0	0,43	5,00±3,43
	2,85	
	11,72	
1	78,85	81,86±2,67
	79,53	
	87,19	
2,5	38,16	43,19±2,73
	47,54	
	43,88	

Tabla 8-19 Resultados HPLC para 7 g/l glucosa y ácido cítrico

Concentración ácido cítrico (g/l)	Glucosa (g/l)	Media glucosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Media ácido acético (g/l)	Ácido cítrico (g/l)	Media ácido cítrico (g/l)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	2,79	2,77±0,03
	0,00		0,00		2,71	
	0,00		0,00		2,81	
1	0,04	0,01±0,01	0,00	0,00±0,00	2,69	2,67±0,01
	0,00		0,00		2,66	
	0,00		0,00		2,68	
2,5	7,00	6,89±0,11	0,00	0,00±0,00	2,28	2,58±0,30
	6,78		0,00		2,88	
	0,08*		0,00		2,58	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

ANEXOS

Tabla 8-20 Concentración de PHB con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico

Concentración ácido cítrico (g/l)	PHB 24 horas (mg/l)	Media PHB 24 horas (mg/l)	PHB 72 horas (mg/l)	Media PHB 72 horas (mg/l)
0	0,00	0,00±0	0,00	0,00±0
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
0,5	1279,26	1231,82±47,45	-	-
	1184,37		-	
	2086,51		95,19	
1	2536,76	2352,54±136,26	53,76	74,10±11,96
	2434,34		73,35	
	2354,18		-	
	2377,91		-	
2,5	-	-	8,35	8,14±0,23
	-		7,69	
	-		8,38	

Tabla 8-21 Acumulación de PHB con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

Concentración ácido cítrico (g/l)	PHB 24 horas (%)	Media PHB 24 horas (%)	PHB 72 horas (%)	Media PHB 72 horas (%)
0	0,00	0,00±0	0,00	0,00±0
	0,00		0,00	
	0,00		0,00	
0,5	21,31	21,01±0,29	-	-
	20,72		-	
	47,98		2,53	
1	37,53	41,27±2,57	1,60	2,11±0,27
	42,22		2,19	
	43,19		-	
	39,81		-	
2,5	-	-	0,86	0,83±0,04
	-		0,74	
	-		0,88	

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR

8.2.5. Ácido cítrico y 15 g/l de glucosa

Tabla 8-22 Crecimiento con ácido cítrico y 15g/l de glucosa a distintos tiempos

Concentración ácido cítrico (g/l)	Concentración SST 24 horas (g/l)	Media Concentración 24 horas (g/l)	Concentración SST 72 horas (g/l)	Media Concentración 72 horas (g/l)
0	$3,05 \cdot 10^{-3}$	$1,89 \cdot 10^{-3} \pm 6,13 \cdot 10^{-4}$	$1,21 \cdot 10^{-2}$	1,21±0,00
	$9,60 \cdot 10^{-4}$		-	
	$1,66 \cdot 10^{-3}$		-	
0,5	1,54	1,59±0,03	-	-
	1,62		-	
	2,37		5,93	
1	2,99	$2,82 \pm 0,12$	4,63	5,49±0,43
	3,03		5,93	
	2,78		-	
	2,94		-	
2,5	$2,35 \cdot 10^{-3}$	$5,13 \cdot 10^{-3} \pm 1,39 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00±0,00
	$6,52 \cdot 10^{-3}$		0,00	
	$6,52 \cdot 10^{-3}$		0,00	
5	$6,52 \cdot 10^{-3}$	$6,75 \cdot 10^{-3} \pm 2,32 \cdot 10^{-3}$	0,00	0,00±0,00
	$7,22 \cdot 10^{-3}$		0,00	
	$6,52 \cdot 10^{-3}$		0,00	
7,5	$6,52 \cdot 10^{-3}$	$4,67 \cdot 10^{-3} \pm 1,85 \cdot 10^{-3}$	-	-
	$6,52 \cdot 10^{-3}$		-	
	$9,60 \cdot 10^{-4}$		-	
10	$6,52 \cdot 10^{-3}$	$6,06 \cdot 10^{-3} \pm 4,65 \cdot 10^{-4}$	-	-
	$6,52 \cdot 10^{-3}$		-	
	$5,13 \cdot 10^{-3}$		-	

ANEXOS

Tabla 8-23 Concentración de nitrógeno tras 72 horas con 7 g/l de glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

Concentración Ácido cítrico (g/l)	Porcentaje de consumo de nitrógeno (%)	Media de porcentaje (%)
0	16,78	16,78±0,00
	83,46	
1	87,30	87,31±2,23
	91,16	
2,5	30,61	29,22±2,96
	23,54	
5	33,52	34,65±3,28
	29,66	
	36,21	
	38,09	

Tabla 8-24 Resultados HPLC para glucosa 15 g/l y ácido cítrico

Concentración Ácido cítrico (g/l)	Glucosa (g/l)	Media glucosa (g/l)	Ácido acético (g/l)	Media ácido acético (g/l)	Ácido cítrico (g/l)	Media ácido cítrico (g/l)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00	2,77	2,77±0,00
	0,32*		0,00		2,79	
1	3,02	3,02±0,00	0,00	0,00±0,00	2,71	2,73±0,03
	3,02		0,00		2,71	
2,5	14,29		0,00		5,52	
	15,24	14,80±0,28	0,00	0,00±0	5,25	5,48±0,12
5	14,86		0,00		5,67	
	16,29		0,00		8,45	
5	16,19	15,56±0,68	0,00	0,00±0,00	8,77	8,45±0,19
	14,21		0,00		8,13	

*-Los datos marcados no se incluyen en el cálculo de la media

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE AGENTES INHIBIDORES EN LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
EMPLEANDO CUPRIAVIDUS NECATOR**

Tabla 8-25 Concentración de PHB con 15 g/l de glucosa y ácido cítrico

Concentración ácido cítrico (g/l)	PHB 24 horas (mg/l)	Media PHB 24 horas (mg/l)	PHB 72 horas (mg/l)	Media PHB 72 horas (mg/l)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	0,00		-	
	0,00		-	
0,5	3127,54	3202,01±74,47		
	3276,48			
	7293,73		59,53	
1	6229,33	6357,01±245,68	135,88	111,40±25,95
	6338,08		138,78	
	5983,15		-	
	5940,77		-	
	-		-	
2,5	-	-	0,00	0,00±0,00
	-		0,00	
5	-	-	0,00	0,00±0,00
	-		0,00	
	-		0,00	
	-		0,00	

Tabla 8-26 Acumulación de PHB con 15 g/l de glucosa y ácido cítrico como fuente de carbono

Concentración ácido cítrico (g/l)	PHB 24 horas (%)	Media PHB 24 horas (%)	PHB 72 horas (%)	Media PHB 72 horas (%)
0	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	0,00		-	
	0,00		-	
0,5	28,12	27,24±0,88	-	-
	26,37		-	
	46,77		1,18	
1	36,64	42,03±1,76	2,57	2,04±0,43
	44,89		2,37	
	40,79		-	
	41,08		-	
	-		-	
2,5	-	-	0,00	0,00±0,00
	-		0,00	
5	-	-	0,00	0,00±0,00
	-		0,00	
	-		0,00	
	-		0,00	

8.3. Anexo III: Nomenclatura y unidades

A lo largo de este trabajo se emplearán las siguientes abreviaturas:

SST - Sólidos suspendidos totales

OD - Densidad óptica

VFA - Volatile fatty acids (Ácidos grasos volátiles)

Las unidades usadas en el trabajo son:

Masa

g - gramos

mg - miligramos

Volumen

l - litros

ml - mililitros

Longitud

mm-milímetros

μm -micrómetros