

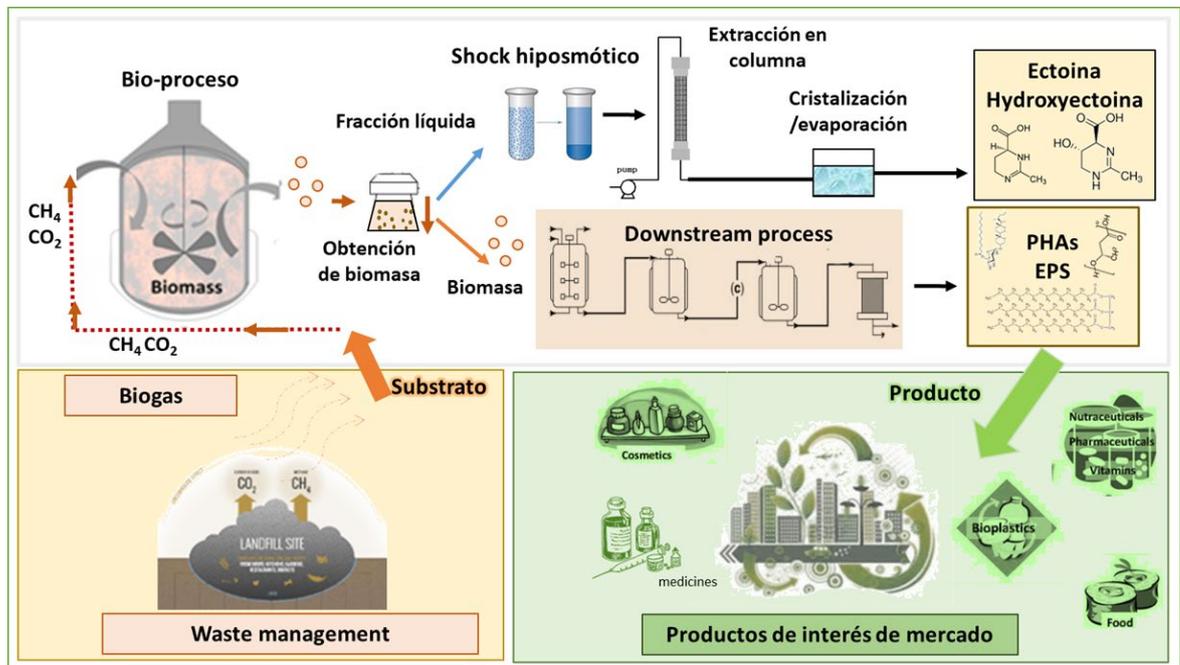


Universidad de Valladolid

UVa

Valorización de metano usando un bioproceso novedoso

Curso 2023/2024



Contenido

| | |
|---|----|
| Introducción | 2 |
| Metano y Cambio Climático | 2 |
| Microbiología del tratamiento de CH ₄ | 2 |
| Biotransformación de metano en sustancias de valor de mercado..... | 3 |
| Ectoína | 3 |
| Bióplásticos (PHA) | 3 |
| Objetivos de la práctica y enfoque..... | 4 |
| Biotransformación de GEI en compuestos de alto valor de mercado | 4 |
| Resultados del aprendizaje de la práctica..... | 5 |
| Organización del curso | 6 |
| Procedimiento experimental..... | 7 |
| Día 1: Preparación de cultivos e inoculación..... | 7 |
| Cepas | 7 |
| Medio y preparación de viales serológicos | 7 |
| Inoculación con la cepa metanotrófica | 7 |
| Comprobación de la morfología y actividad del inóculo..... | 8 |
| Monitorización de botellas..... | 8 |
| Incubación de las bacterias | 8 |
| Día 2: Crecimiento del cultivo y transformación de metano | 8 |
| Cromatografía de gases (GC-TCD) | 9 |
| HPLC..... | 10 |
| Análisis de datos..... | 10 |
| Preguntas para el informe de prácticas | 11 |
| Referencias | 13 |
| Protocolos e información detallada de las técnicas analíticas..... | 14 |
| ANEXO I | 17 |
| ANEXO II | 18 |

Introducción

Metano y Cambio Climático

El metano (CH₄), con un potencial de calentamiento global 25 veces superior al del dióxido de carbono (CO₂), es el segundo gas de efecto invernadero (GEI) más importante a nivel mundial, representando actualmente el 18 % de las emisiones totales de GEI^{1,2}. A pesar de que el CH₄ puede utilizarse como vector energético cuando las concentraciones de este gas son superiores al 20 % en la emisión, más del 56 % de las emisiones antropogénicas de CH₄ contienen concentraciones inferiores al 5 %. Estas emisiones de CH₄ diluidas y difusas escapan a la atmósfera aumentando anualmente su concentración troposférica a razón de 0,1-2 %³.

Una solución para tratar estas emisiones de manera sostenible y rentable es el uso de biotecnologías que puedan transformar este GEI en compuestos de alto valor de mercado gracias al uso de microorganismos especializados. Esta solución promueve el desarrollo de una economía circular, climáticamente neutra y respetuosa con el medio ambiente.

Microbiología del tratamiento de CH₄

Las bacterias aerobias oxidantes de metano (MOB) pertenecen al grupo de bacterias metilótroficas, organismos que utilizan sustratos reducidos de un carbono para su metabolismo. Dentro de este grupo fisiológico, los MOB son el único grupo capaz de utilizar CH₄ como única fuente de energía y carbono (Figura 1)⁴.

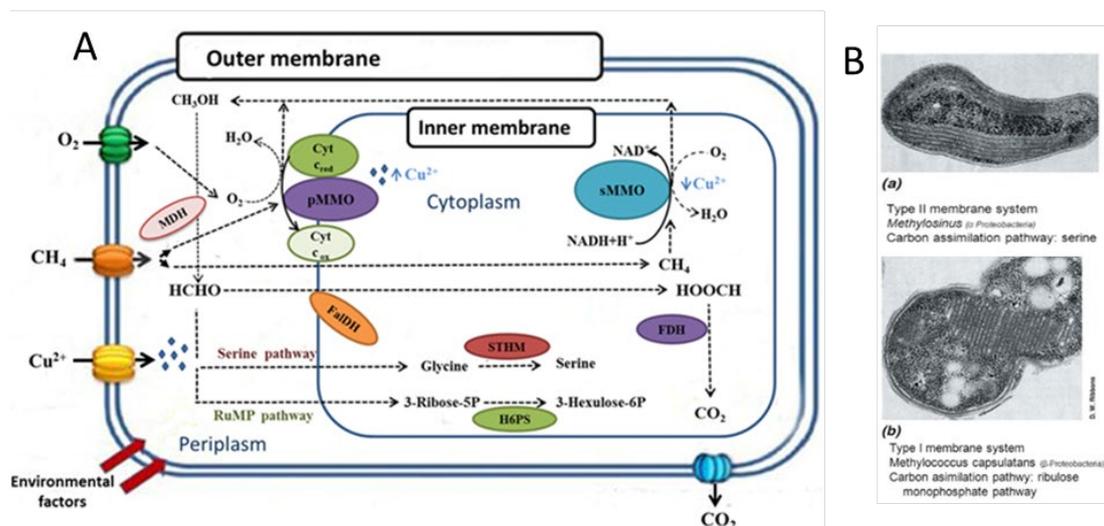


Figura 1: A) Vías aeróbicas de oxidación de metano en bacterias metanótrofas, donde: sMMO: metano monooxigenasa soluble; pMMO: metano monooxigenasa particulada; MDH: metanol deshidrogenasa; FdH: formiato deshidrogenasa; FdH: formaldehído deshidrogenasa; Cyt red/ox: citocromo reducido/oxidado; STHM: serina hidroximetiltransferasa; H6PS: hexulosa-6-fosfato sintasa⁵. **B)** Micrografías electrónicas de metanótrofos tipo I y tipo II⁶.

Tradicionalmente, los MOB se han clasificado en dos grupos diferentes según sus características fisiológicas y morfológicas: metanótrofos tipo I y tipo II. El tipo I incluye aquellos MOB que a) presentan membranas intracitoplasmáticas como haces de discos vesiculares, b) utilizan la ruta de ribulosa monofosfato (RuMP) para la asimilación de carbono y c) contienen ácidos grasos fosfolipídicos de 14 y 16 carbonos de longitud. Los MOB tipo II se caracterizan por a) una membrana intracitoplasmática alineada a lo largo de la periferia de la célula, b) el uso de la vía de la serina para la asimilación de carbono y c) ácidos grasos fosfolipídicos de 18 carbonos de longitud.

Biotransformación de metano en sustancias de valor de mercado

Durante los últimos 20 años se ha descrito una amplia gama de compuestos de alto valor añadido producidos por bacterias metanotróficas, siendo los más prometedores por su relevancia en el mercado y precio, la ectoína y los bioplásticos (polihidroxialcanoatos o PHA)^{5,7} (Figure 2).

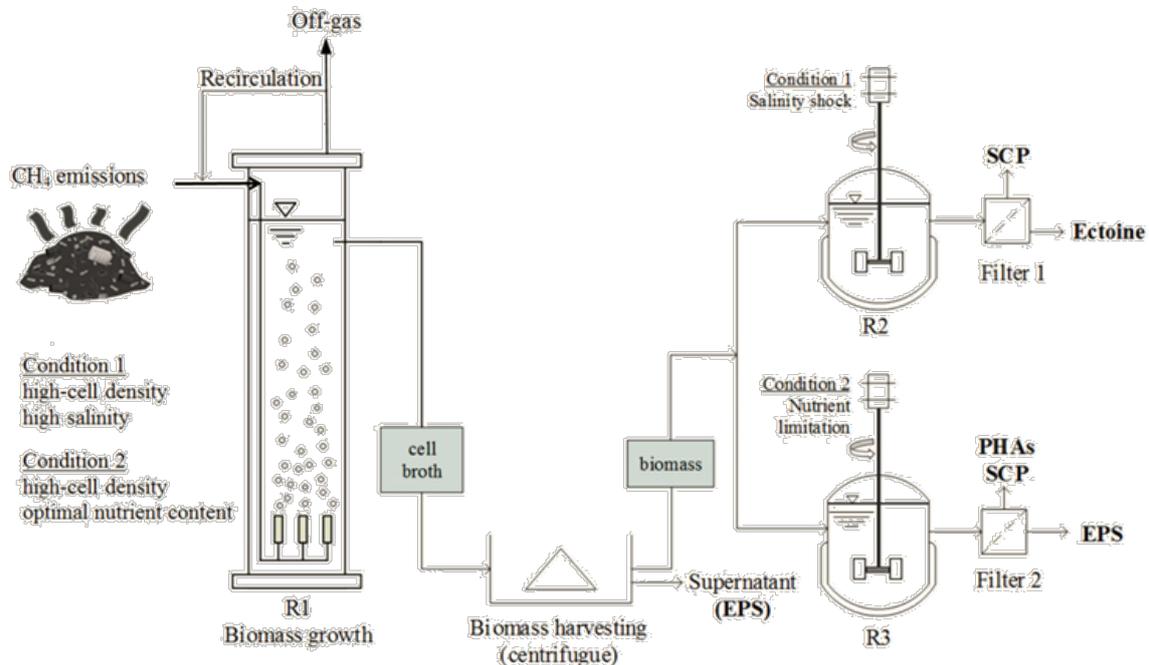


Figura 2. Diagrama de proceso para una biorrefinería de metano que produce ectoína, proteína unicelular, polihidroxialcanoato, exopolisacáridos y biocombustibles a partir de una emisión de vertedero².

Ectoína

La ectoína es un iminoácido cíclico (soluble en agua, de bajo peso molecular y zwitteriónico) que proporciona equilibrio osmótico a un amplio número de bacterias halotolerantes. Debido a su alta eficacia como estabilizador de enzimas, complejos ADN-proteína y ácidos nucleicos, la ectoína se utiliza en medicina, cosmetología, dermatología y nutrición. En este sentido, este osmolito es probablemente uno de los productos más valiosos sintetizados por microorganismos, vendiéndose en la industria farmacéutica a 1000 € kg^{-1} y con un consumo global de 15000 toneladas por año^{8,9}. A pesar de su potencial, la ectoína actualmente sólo es producida biotecnológicamente por *Halomonas elongata* a través de un largo proceso de fermentación por lotes que es costoso debido al uso de sustratos de alto precio. Investigaciones actuales han demostrado que los metanótrofos halotolerantes pertenecientes a los géneros *Methylobacterium*, *Methylobacter* y *Methylohalobius* son capaces de producir ectoína en biorreactores discontinuos y continuos alcanzando contenidos de 3-10 % (g/g) dependiendo de la concentración de metano y NaCl^{10,11}.

Bioplásticos (PHA)

Los PHA como el poli-3-hidroxibutirato (PHB) y el copolímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) son biopolíesteres intracelulares producidos en condiciones de exceso de carbono y limitación de nutrientes. Sus excelentes propiedades mecánicas junto con su biodegradabilidad y biocompatibilidad hacen de los PHA una alternativa atractiva y potencial a los plásticos que proceden del petróleo. *Ralstonia eutropha*, *Bacillus megaterium* y *Alcaligenes latus* son las principales bacterias heterótrofas productoras de PHA industrial, y las materias primas utilizadas más comunes son la glucosa y la fructosa. Sin embargo, el alto costo de estas fuentes de carbono, que representan el 30-40% de los costes totales de producción y su competencia con la industria

alimenticia, aún dificulta la comercialización de los PHA debido a su precio de mercado poco competitivo (4-20 € kg PHA⁻¹). En este contexto, el metano ha surgido recientemente como una materia prima potencial para la producción de PHA^{12,13}. En condiciones de limitación de nutrientes (es decir, limitación de N, P o Mg), *Methylocystis*, *Methylosinus* y *Methylocella* se consideran los principales géneros metanotróficos productores de PHA, que alcanzan contenidos de PHBV que oscilan entre el 20 y el 51 % (en peso) durante el tratamiento de metano en biorreactores operados en continuo.

Objetivos de la práctica y enfoque.

Biotransformación de GEI en compuestos de alto valor de mercado

Las tecnologías de tratamiento biológico basadas en la transformación de compuestos tóxicos en sustancias de alto valor de mercado son el futuro de una economía sustentable y respetuosa con el clima y el ambiente. Sin embargo, su aplicación a gran escala en la industria es aún limitada. Para superar esto, es necesaria una mejor transferencia de conocimiento entre la industria y la microbiología fundamental. En esta práctica implementaremos el concepto de biotransformación de residuos mediante la transformación biológica de las emisiones de metano en dos compuestos diferentes, ectoína y bioplásticos.

Cultivaremos dos metanótrofos, cada uno perteneciente a un tipo diferente. i) *Methylomicrobium alcaliphilum*, que pertenece al tipo I y produce ectoína y ii) *Methylocystis hirsuta* que pertenece al tipo II y produce bioplásticos. El metano se utilizará como única fuente de energía y carbono en nuestros cultivos. Se utilizarán altas concentraciones de sal para producir ectoína, mientras que la limitación de nitrógeno se utilizará para producir bioplásticos.

A través de estos cultivos, comprenderemos las capacidades de las bacterias metanótrofas para biotransformar el metano en compuestos de alto valor agregado. Para eso, monitorearemos estos cultivos haciendo un seguimiento del consumo de sustrato y la formación de biomasa y productos de valor. Para ello analizaremos la fase gas y líquida con métodos analíticos como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta presión. El tipo de metanótrofo presente en cada cultivo se determinará mediante microscopía. En última instancia, determinaremos el crecimiento de cada metanótrofo y el rendimiento de biomasa utilizando espectrofotometría y peso seco de biomasa. De este experimento obtendremos las tasas de biotransformación de metano y los rendimientos de producción de cada compuesto. Con todo este conocimiento podemos hacer una estimación de viabilidad y elegir el proceso más adecuado y rentable con los datos obtenidos.

Resultados del aprendizaje de la práctica

Después de completar con éxito esta práctica, se espera que los estudiantes sean capaces de:

- formular una pregunta o hipótesis de investigación y un objetivo de investigación;
- realizar experimentos utilizando métodos avanzados comúnmente utilizados en microbiología;
- describir experimentos de seguimiento basados en los resultados obtenidos;
- identificar un problema de investigación a partir de la literatura y los resultados generados;
- encontrar, interpretar y citar literatura relevante para un estudio determinado;
- trabajar en equipo tanto en la realización de experimentos como en la redacción del informe de prácticas.

Además de estos resultados generales, específicamente el alumno aprenderá a:

- preparar medio de cultivo con diferentes características.
- trabajar con bacterias que usan gas como sustrato.
- evaluar la pureza de la muestra y el control de calidad en la configuración experimental
- estudiar los procesos metabólicos por consumo de sustrato y rendimientos de producto usando cromatografía de gases y de líquidos
- calcular las tasas de degradación
- diseñar nuevos experimentos, analizar los resultados correctamente y presentarlos de manera ordenada y con referencias científicas.

Organización del curso

El curso dura de 15:30-18:00 durante dos días.

| Día | Programa | Pag. |
|-----|----------|------|
|-----|----------|------|

| Leyenda |
|---------|
|---------|

| Día 1 | Introducción al uso de metanótrofos | |
|-------|--|---|
| | 1. Finalización del medio y adición de gas | 7 |
| | 2. Inoculación de los microorganismos | 7 |
| | 3. Muestreo de líquido | 8 |
| | 4. Espectometría | 9 |
| | | |

| |
|---------------------|
| Teoría |
| Técnicas de cultivo |
| Métodos analíticos |
| Microbiología |
| Análisis de datos |

| Día 2 | Técnicas analíticas y análisis de datos | |
|-------|---|----|
| | 1. Observación al microscopio | 8 |
| | 2. Muestreo gas y líquido | 8 |
| | 3. Cromatografía | 8 |
| | 4. Espectometría | 9 |
| | 5. Análisis de datos | 10 |
| | 6. Cálculos | 11 |
| | | |
| | | |

| | | |
|--|------------------------------------|--|
| | Entrega de la memoria de prácticas | Una semana desde el final de la práctica |
|--|------------------------------------|--|

Procedimiento experimental

Día 1: Preparación de cultivos e inoculación

Cepas

Las cepas bacterianas se han pedido a la colección de microorganismos alemán del Instituto Leibniz-(DSMZ).

| Bacteria | cepa | Medio | Referencia |
|--------------------------------------|------|--|-------------------------|
| <i>Methylocystis hirsuta</i> | CSC1 | 1179. NMS Medio para metanótrofos | Lindner et al. 2007 |
| <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> | 20Z | 1180. Medio para de crecimiento metanótrofos | Kalyuzhnaya et al. 2008 |

Medio y preparación de viales serológicos

Se han preparado dos medios que dependerán de la cepa utilizada y del compuesto que se quiera producir.

- Producción de bioplásticos: medio de sal mineral de nitrato para metanótrofos con limitación de nitrógeno. El medio 1179 se describe en el Anexo 1.
- Metanótrofos haloalcalifílicos: Medio de sal mineral de nitrato para metanótrofos alcalifílicos con un 6% de NaCl. El medio 1180 se describe en el Anexo 2.

1. Preparación de los viales serológicos

Después de la preparación de los medios, viales serológicos de 120 ml con 45 ml de medio, se cerrarán con tapones de goma de butilo y sellos de aluminio. Luego, las botellas se autoclavarán para obtener un medio estéril.

En total habrá 4 botellas estériles por cepa cultivada con el medio correspondiente:

- 3 réplicas de las botellas de crecimiento
- Un control negativo sin biomasa

Termina de preparar el medio de acuerdo con anexo 1 y 2. Ten en cuenta que cada bacteria requiere unas condiciones diferentes.

2. Adición del gas

- El metano se suministrará a una concentración de espacio de cabezas de CH₄ de 20% utilizando una jeringa calibrada desde una bolsa hermética tedlar.
- Para evitar contaminación, el gas se filtrará introduciéndolo en las botellas autoclavadas con una jeringa y aguja desechables.

3. Inoculación con la cepa metanotrófica

- Las botellas réplicas se inocularán con un 5% de cultivo puro de la cepa correspondiente.
- El control negativo no lleva inóculo.

4. Monitorización de botellas

- La concentración de CH₄ y CO₂ en el espacio de cabeza se medirá mediante cromatografía de gases con detector de conductividad térmica (GC-TCD).
- Periódicamente se extraerán muestras líquidas (2 ml) para monitorear la concentración de biomasa a través de la densidad óptica (DO) y las sustancias de valor añadido.

4.1 Procedimiento de muestreo de gas

Trabajar con un gas como sustrato es complicado porque no podemos perder gas al muestrear.

1. Use una jeringa de cromatografía hermética.
2. Tome una muestra de 0,1 ml de espacio de cabeza
3. Inyectar la muestra en el GC-TCD.
4. Tomar datos del cromatograma.

4.2 Procedimiento de muestreo de líquido

Análisis del crecimiento del cultivo:

1. Muestrear 1,0 ml de cultivo.
2. Homogenizar bien por agitación.
3. Analizar densidad óptica (600 nm) en el espectrofotómetro.

5. Incubación de las bacterias

Una vez inoculadas, las botellas se monitorearán y se incubarán a 30 °C con agitación orbital continua de 200 rpm durante 24 horas.

Día 2: Crecimiento del cultivo y transformación de metano

6. Comprobación de la morfología y actividad del inóculo

Para comprobar que las cepas están puras y poder identificarlas a posteriori por su morfología usaremos un microscopio de contraste de fases. Las principales morfologías que encontramos en arqueas y bacterias (A), hongos (B) y protozoos (C) se muestran en la figura 3.

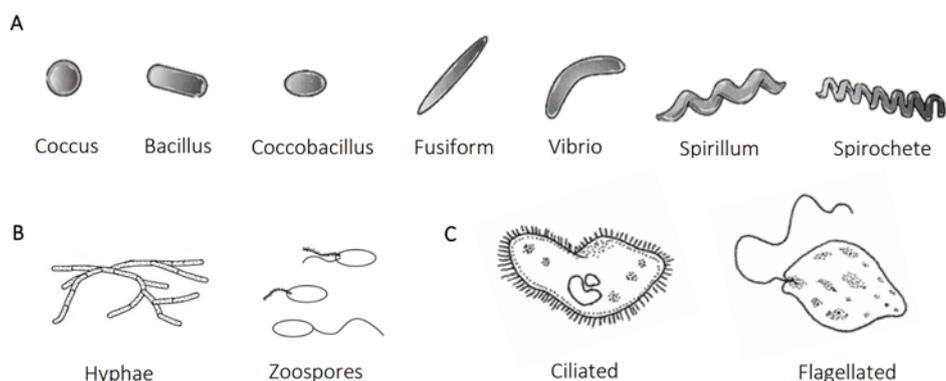


Figura 3: Principales morfologías de procariotas y eucariotas.

Procedimiento:

1. Muestra 0,2 ml de cultivo con una jeringa estéril.
2. Agrega una gota de cultivo en un portaobjetos de vidrio.
3. Agrega el cubre sobre el portaobjetos.
4. Pon la muestra en el microscopio. Utiliza objetivos de contraste de fase de 40.
5. Describe la morfología celular de los diferentes cultivos, especialmente las características en las que se diferencian.
6. Limpia los objetivos con papel de seda suave y apaga la luz del microscopio.

7. Muestreo de gas y líquido

Este día tomaremos muestra de líquido y de gas de nuevo para observar la transformación de gas y la producción de biomasa y ectoína.

- Toma muestra de líquido:
 1. Toma 2 mL de líquido para medir DO (600 nm)
 2. Análisis de la producción del fármaco ectoína:
 - 2.1 Muestrear 2,0 ml de cultivo y transferirlo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml
 - 2.2 Centrifugar las muestras a 12000 rpm, 5 mins. La centrifuga debe estar equilibrada.
 - 2.3 Retira el sobrenadante y añade 1 mL de etanol 70%.
 - 2.4 Homogeniza la muestra en el vórtex durante 2 minutos.
 - 2.5 Toma el sobrenadante de la muestra
 - 2.6 Transfiere el sobrenadante a un vial de HPLC filtrándolo sobre filtro de 0.22 micras.
 - 2.7 Llévalo para su análisis al HPLC.
- Toma muestra de la fase gas e inyéctala en el GC-TCD.

Cromatografía de gases (GC-TCD)

Los GC se utilizan con mucha frecuencia en el laboratorio para analizar y cuantificar diferentes tipos de gases. Para hacer esto correctamente, debe usar estándares del gas de análisis. En nuestro curso, utilizaremos CH₄ al 100 % (99 % de pureza) contenido en una bolsa de tedlar como estándar. Como el gas no tiene presión atmosférica en esta bolsa podemos calcular la concentración del gas según la ley de los gases ideales:

Ley de gases ideales

PV=nRT

R (constante gas ideal)= 0.0082 atm L mol⁻¹ K⁻¹

T (temperatura ideal)= 298K

De acuerdo a esto:

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT}$$

$$\frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{0.99 \text{ atm}}{\left(0.082 \frac{\text{atmL}}{\text{mol K}}\right) 298\text{K}} = 0.040 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 16\text{g} \frac{\text{CH}_4}{\text{mol}} = \frac{0.64\text{g}}{\text{L}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = 640 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

1. Haz mezclas de aire/CH₄ al 20%, 10% y 5%.
2. Para ello usa viales de 250 mL cerrados herméticamente y rellenos de aire.
3. Primero retira del espacio de cabeza el mismo aire que el gas que se agregará a la botella con una jeringa.
4. Inyecte cada muestra tres veces y haga una curva estándar como se muestra en la figura 4.

| % | mg L ⁻¹ | area |
|-----|--------------------|---------|
| 100 | 640 | 1764302 |
| 100 | 640 | 1798501 |
| 50 | 320 | 799778 |
| 50 | 320 | 830205 |
| 20 | 128 | 333847 |
| 20 | 128 | 337597 |
| 10 | 64 | 174262 |
| 10 | 64 | 174476 |
| 5 | 32 | 89737 |
| 5 | 32 | 95258 |
| 1 | 6,4 | 15094 |
| 1 | 6,4 | 14885 |

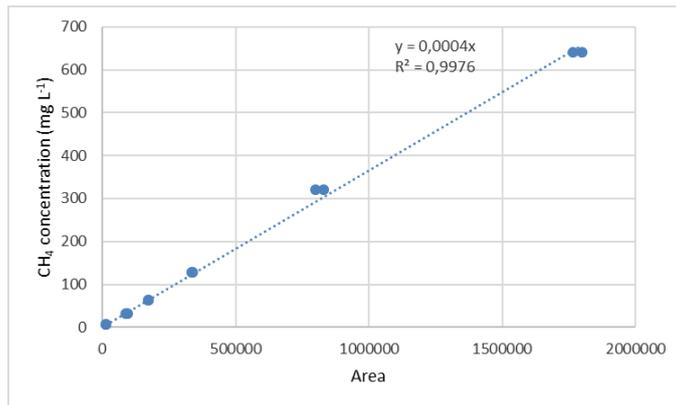


Figure 4. GC curve of different methane concentrations.

HPLC

Preparación de patrones y toma de muestras

Para una cuantificación precisa mediante HPLC es importante construir una buena curva estándar cada vez que se utiliza el equipo. Para ello, se utilizan diluciones seriadas de soluciones estándar madre. En este experimento utilizaremos la HPLC para medir la ectoína.

1. Homogeneizar todas las soluciones madre antes de la dilución
2. Prepara soluciones con concentración de estándar de: 5, 10, 15, 20 mg L⁻¹ de ectoína.
3. Crea una curva patrón con las áreas de los cromatogramas.

Análisis de datos

| Cepa: | | | | | | | | |
|-------|---------|----|-----------|----------------------|--------------------|--------------|-----------|--------------------|
| Fecha | Muestra | OD | SST (g/L) | CH ₄ area | [CH ₄] | Ectoína area | [Ectoína] | Ectoína específica |
| | 1 | | | | | | | |
| | 1 | | | | | | | |
| | 1 | | | | | | | |
| | C- | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | |
| | C- | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|--|-----------|--|--|--|--|--|--|--|
| | C+ | | | | | | | |
|--|-----------|--|--|--|--|--|--|--|

Tasa de degradación de metano:

$$D = \frac{\Delta[CH_4] VR}{t VL}$$

VL= Volumen fase líquida
VR= Volume botella o reactor

Concentración de ectoína

Calcula la curva estándar de ectoína con los datos obtenidos del HPLC y obtén la concentración de ectoína en tus muestras

| Area | Concentration (mg L ⁻¹) |
|----------|-------------------------------------|
| 87168 | 5 |
| 178480 | 10 |
| 383065 | 20 |
| 798526 | 50 |
| 1732792 | 100 |
| 3435612 | 250 |
| 6800805 | 500 |
| 13478589 | 1000 |

Contenido específico de ectoína

Se calcula utilizando la OD medida y su conversión en peso seco.

$$Rendimiento = \frac{Ectoína (g L)}{Biomasa (g L)} * 100$$

Datos para *Methylophilum alcaliphilum*

| OD | Dry weight (g L ⁻¹) |
|-------|---------------------------------|
| 1,741 | 0,62 |
| 0,613 | 0,215 |
| 0,445 | 0,166 |
| 0,222 | 0,1 |
| 0,111 | 0,05 |
| 0,03 | 0,03 |

Utilizando la curva calcula el contenido de ectoína específico en tus muestras.

Preguntas para el informe de prácticas

Pregunta 1:

P1a: Presenta los rendimientos de producción de ectoína/bioplástico obtenidas y las correspondientes tasas de eliminación de metano.

P1b: Con los resultados actuales, cuál es más rentable.

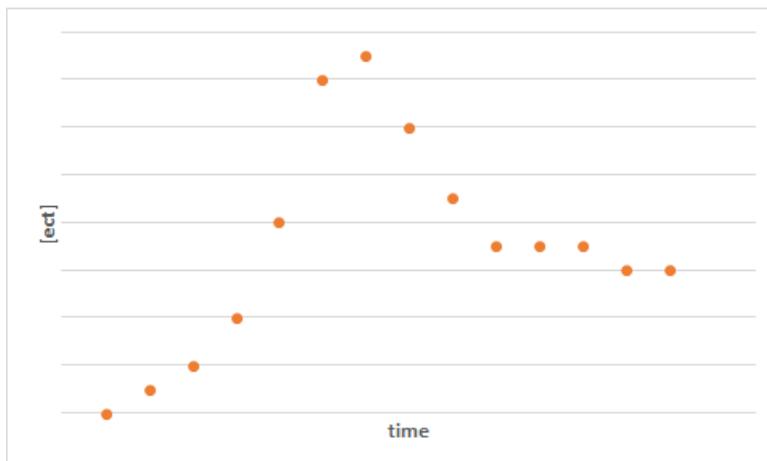
P1c: ¿Cómo implementarías dicha bacteria en un proceso en continuo?

P1d: ¿Qué cepa es óptima para la eliminación de GEI?

Pregunta 3:

¿Cómo optimizarías la producción de ectoína en este proceso? Diseña un biorreactor para el proceso.

Pregunta 4 -caso de estudio-: La producción de ectoína se midió a lo largo del tiempo y se observó un pico en mitad del experimento. ¿Qué es este pico y cómo investigarías con las técnicas aprendidas lo que ha sucedido? Escriba una breve propuesta (incluyendo pregunta de investigación, hipótesis, técnicas utilizadas) para estudiar/explicar este fenómeno.



Referencias

- (1) EEA (European Environmental Agency). Data Viewer on Greenhouse Gas Emissions and Removals, Sent by Countries to UNFCCC and the EU Greenhouse Gas Monitoring Mechanism (EU Member States).; EEA greenhouse gas - data viewer; 2019.
- (2) Cantera, S.; Muñoz, R.; Lebrero, R.; López, J. C.; Rodríguez, Y.; García-Encina, P. A. Technologies for the Bioconversion of Methane into More Valuable Products. *Current opinion in biotechnology* **2018**, 50, 128–135.
- (3) European comission. Smarter, Greener, More Inclusive? — Indicators to Support the Europe 2020 Strategy, 2018th ed.; © European Union, 2018: Luxemburg, 2018.
- (4) Hanson, R. S.; Hanson, T. E. Methanotrophic Bacteria. *MICROBIOL. REV.* **1996**, 60 (2), 439.
- (5) Cantera, S.; Frutos, O. D.; López, J. C.; Lebrero, R.; Torre, R. M. Technologies for the Bio-Conversion of GHGs into High Added Value Products: Current State and Future Prospects. In *Carbon Footprint and the Industrial Life Cycle: From Urban Planning to Recycling*; Álvarez Fernández, R., Zubelzu, S., Martínez, R., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 359–388. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54984-2_17.
- (6) Madigan, M. T.; Madigan, M. T.; Brock, T. D. *Brock Biology of Microorganisms*; Pearson/Benjamin Cummings: San Francisco, CA, 2009.
- (7) Strong, P. J.; Kalyuzhnaya, M.; Silverman, J.; Clarke, W. P. A Methanotroph-Based Biorefinery: Potential Scenarios for Generating Multiple Products from a Single Fermentation. *Bioresource Technology* **2016**, 215, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.099>.
- (8) Czech, L.; Hermann, L.; Stöveken, N.; Richter, A. A.; Höppner, A.; Smits, S. H. J.; Heider, J.; Bremer, E. Role of the Extremolytes Ectoine and Hydroxyectoine as Stress Protectants and Nutrients: Genetics, Phylogenomics, Biochemistry, and Structural Analysis. *Genes* **2018**, 9 (4), 177. <https://doi.org/10.3390/genes9040177>.
- (9) Pastor, J. M.; Salvador, M.; Argandoña, M.; Bernal, V.; Reina-Bueno, M.; Csonka, L. N.; Iborra, J. L.; Vargas, C.; Nieto, J. J.; Cánovas, M. Ectoines in Cell Stress Protection: Uses and Biotechnological Production. *Biotechnology Advances* **2010**, 28 (6), 782–801. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.06.005>.
- (10) Cantera, S.; Lebrero, R.; Rodríguez, S.; García-Encina, P. A.; Muñoz, R. Ectoine Bio-Milking in Methanotrophs: A Step Further towards Methane-Based Bio-Refineries into High Added-Value Products. *Chemical Engineering Journal* **2017**, 328, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.027>.
- (11) Cantera, S.; Lebrero, R.; Sadornil, L.; García-Encina, P. A.; Muñoz, R. Valorization of CH₄ Emissions into High-Added-Value Products: Assessing the Production of Ectoine Coupled with CH₄ Abatement. *Journal of Environmental Management* **2016**, 182, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.064>.
- (12) Pieja, A.; Schauer-Gimenez, A.; Oakenfull, A.; Morse, M. *Biorenewables at Mango Materials*. In *Industrial Biorenewables*; John Wiley & Sons, Ltd, 2016; pp 371–395. <https://doi.org/10.1002/9781118843796.ch16>.
- (13) Pieja, A. J.; Morse, M. C.; Cal, A. J. Methane to Bioproducts: The Future of the Bioeconomy? *Current Opinion in Chemical Biology* **2017**, 41, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.024>.

Protocolos e información detallada de las técnicas analíticas

Cromatografía de gases (GC-TCD)

La cromatografía de gases es una técnica utilizada en química analítica para separar y analizar una mezcla compleja de compuestos dentro de una muestra que se puede vaporizar sin descomponerse. Como resultado, se puede detectar la presencia de diferentes compuestos de interés (así como su cantidad relativa). La “fase móvil” es un gas portador, generalmente helio (90% de los instrumentos) o nitrógeno. La “fase estacionaria” está compuesta por una capa microscópica de líquido o un polímero colocado sobre un soporte sólido inerte que se encuentra dentro de un tubo de vidrio (o metal) llamado “columna”. En la figura 5 se puede ver un esquema general de un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica. Los compuestos gaseosos de la muestra serán transportados a la columna por el gas portador e interactuarán con las paredes de la columna, conteniendo la fase estacionaria y siendo retenidos. La columna se encuentra en un horno y al aumentar la temperatura, los diferentes gases serán eluidos en diferentes momentos, dependiendo de la afinidad que tengan por la columna. El tiempo de elución de un compuesto (determinado por su punto de ebullición (o presión de vapor)) se conoce como “tiempo de retención”, y es característico de cada compuesto. Todos los gases eluidos progresivamente pasarán por un “detector” y aparecerán en el ordenador como diferentes picos.

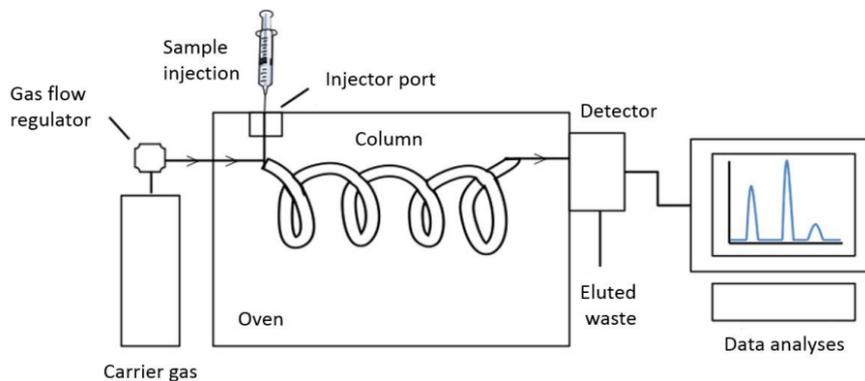


Figura 5. GC instrumentación y funcionamiento

HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método adecuado para el análisis de una amplia gama de compuestos disueltos. La cromatografía líquida se basa en la distribución del analito (muestra) entre una fase móvil (eluyente) y una fase estacionaria (material de relleno de la columna). Dependiendo de la estructura química del analito, sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto para ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa y característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna, mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. Finalmente, la unidad de detección (por ejemplo, detector UV) reconoce los analitos después de salir de la columna. Las señales se convierten y registran mediante un sistema de gestión de datos (software informático) y luego se muestran en un cromatograma. Después de pasar por la unidad detectora, la fase móvil puede someterse a unidades detectoras adicionales, una unidad de recolección de fracciones o al desecho. En general, un sistema de HPLC contiene los siguientes módulos: un depósito

de disolvente, una bomba, una válvula de inyección, una columna, una unidad detectora y una unidad de procesamiento de datos (Fig. 6).

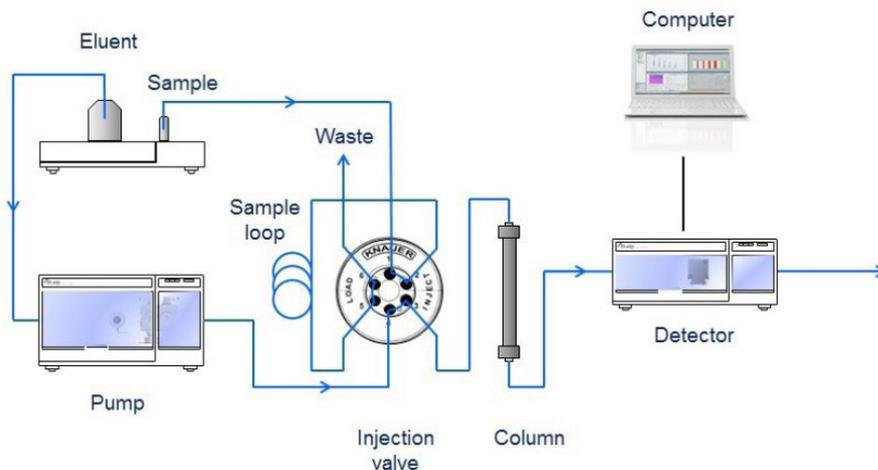


Figura 6. Esquema de un HPLC.

Espectrofotetría

En la espectrofotetría se aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica de cada sustancia. El espectrofotómetro proporciona una manera de estimar la densidad de células en un cultivo usando el espectro de luz visible a 600nm. El método espectrofotométrico se basa en la dispersión de la luz por las células en el cultivo. Cuando la luz en un espectrofotómetro golpea una partícula grande como una célula, los rayos de luz se desvían de una trayectoria recta y estos rayos de luz no llegan al detector. Cuanto mayor sea el número de células en una muestra, mayor será la dispersión de la luz. La capacidad de dispersión de luz de una célula depende de su tamaño y geometría, por lo que es necesaria una curva de calibración para extrapolar las mediciones de densidad óptica al número de celdas o biomasa. La dispersión de la luz se mide con el espectrofotómetro ajustado para obtener la absorbancia. (Figura 7).

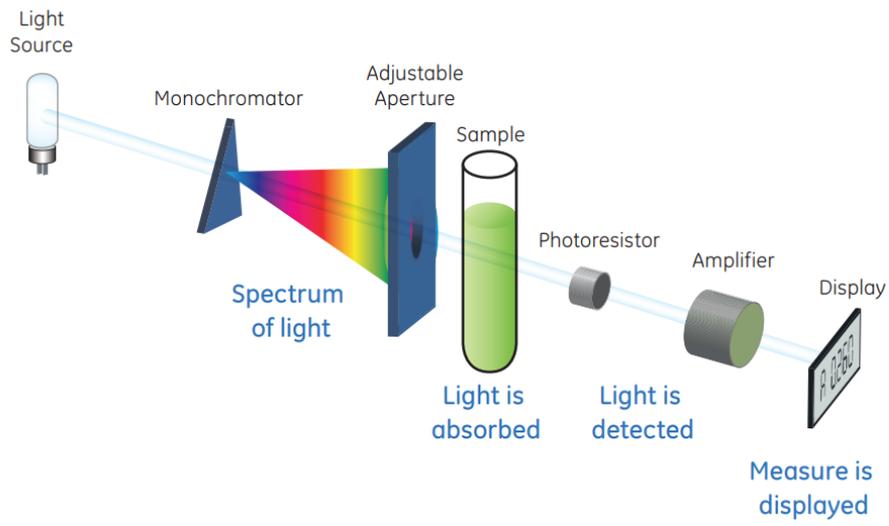


Figura 7. Esquema de un espectrofotómetro.

ANEXO I

1180. METHYLOMICROBIUM MEDIUM

| | | |
|--|---------|----|
| NaCl | 30.00 | g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.20 | g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0.02 | g |
| KNO ₃ | 1.00 | g |
| Elementos traza (see below) | 1.00 | ml |
| Agua MilliQ | 1000.00 | ml |

Dispensar el medio en los recipientes de cultivo. Para volúmenes pequeños, se pueden utilizar frascos de suero o tubos Hungate. La relación de fase gaseosa a líquida debe ser de aproximadamente 10:1. Utilice una fase gaseosa que contenga aire, 50% de metano y autoclave a 121°C durante 15 minutos. Cuando el medio de cultivo se enfría, se añaden el NaHCO₃, el Na₂CO₃ y el tampón de fosfato. Los cultivos líquidos deben cultivarse con agitación.

Añadir al medio estéril de soluciones stock:

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| NaHCO ₃ (1M) | 50.0 ml/l |
| Na ₂ CO ₃ (1M) | 5.0 ml/l |

Buffer fosfato: 20.0 ml/l

| | | |
|--|--------|----|
| KH ₂ PO ₄ | 14.0 | g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 30.0 | g |
| Agua MilliQ | 1000.0 | ml |

pH: 8.5-9.0

Añadir al medio 0.5 mL de la solución de vitaminas y CaCl₂.

Elementos traza

| | | |
|--|---------|----|
| EDTA | 5.00 | g |
| CuCl ₂ x 5 H ₂ O | 0.10 | g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 2.00 | g |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.10 | g |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.02 | g |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.20 | g |
| Na ₂ MoO ₄ | 0.03 | g |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0.03 | g |
| H ₃ BO ₃ | 0.03 | g |
| Agua MilliQ | 1000.00 | ml |

ANEXO II

1179. NMS Medio metanótrofos

| | | |
|--|----------|----|
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 1.000 | g |
| CaCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.200 | g |
| Fe(III)NH ₄ -EDTA | 4.000 | mg |
| KNO ₃ | 1.000 | g |
| Elementos traza | 0.500 | ml |
| KH ₂ PO ₄ | 0.272 | g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 0.717 | g |
| Purified agar (e.g. Oxoid L28) | 12.500 | g |
| Distilled water | 1000.000 | ml |

Ajustar pH a 6.8. Autoclavar a 121°C 15 min.

Añadir al medio estéril 0.5 mL de la solución de vitaminas y CaCl₂.

