

15TCAm - PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LODOS ACTIVADOS A PARTIR DE SUERO DE QUESO

ALZATE MARIN, J. C.¹; CARAVELLI A. H.¹; ZARITZKY N. E.^{1,2}

**1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).
CCT – La Plata – CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, 47 y 116
(B1900AJJ). La Plata, Argentina.**

E-mail: ing.juankal@yahoo.es (Alzate Marin, J. C.)

2. Facultad de Ingeniería, UNLP, 48 y 115 (B1900AJJ) La Plata, Argentina.

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) constituyen una buena alternativa para reemplazar a los plásticos convencionales de origen petroquímico. Los PHAs son biopolímeros sintetizados por bacterias como reserva intracelular de carbono y energía. La producción industrial de PHA se basa en el uso de cultivos puros bajo condiciones de esterilidad y fuentes de carbono puras. El uso de cultivos mixtos, como el caso de lodos activados, y el de efluentes ricos en carbono permiten reducir los costos de producción. La producción de este biopolímero usando cultivos mixtos y efluentes ricos en carbohidratos requiere 3 etapas: fermentación, selección de microorganismos y producción. La selección es comúnmente realizada en un reactor discontinuo secuencial (SBR, sequencing batch reactor), alternando disponibilidad y limitación de carbono. La producción de PHA se realiza en batch o batch alimentado, con limitación en algún nutriente.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la factibilidad de producción de PHA (escala laboratorio) por lodos activados alimentados con suero de queso, utilizando únicamente 2 etapas: selección y producción. La selección se realizó en un SBR aeróbico y la producción de PHA en batch aeróbico limitado en nitrógeno y fósforo. El PHA fue detectado por tinción con Sudan Black y FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). Se determinó la máxima acumulación de PHA del cultivo batch mediante tinción con Sudan Black acoplada a análisis de imágenes. Esta técnica permitió determinar el punto final del sistema de producción de PHA, prescindiendo de la extracción química del polímero. Se secó la biomasa obtenida en la etapa de producción. Se extrajo el PHA con cloroformo y se precipitó con etanol. El rendimiento resultó 13,2 % (gPHA/gST) con pureza de 95,4%. El PHA correspondió al co-polímero P(HB-HV, Hidroxibutirato-Hidroxivalerato) con relación molar % HB:HV: 95,4:4,6, determinada por espectrofotometría UV. Es conocido que el co-polímero P(HB-HV) se vuelve más flexible y más resistente a medida que aumenta la fracción de HV. Se sugiere realizar estudios adicionales, combinando efluentes lácteos con aquellos derivados de otras industrias, a fin de obtener un polímero con mayor contenido de HV y en consecuencia con mejores propiedades mecánicas.

1. Introducción

Los polihidroxialcanoatos (PHA) constituyen una buena alternativa para reemplazar a los plásticos convencionales de origen petroquímico pues presentan propiedades físicas similares a las de compuestos termoplásticos y elastómeros (Cavalheiro et al., 2009). Además, los PHAs son compuestos derivados de recursos renovables, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables (Steinbüchel, 2001). Los PHAs son biopolímeros sintetizados por bacterias como reserva intracelular de carbono y energía. La producción industrial de PHA se basa principalmente en el uso de cultivos puros bajo condiciones de esterilidad y empleo de fuentes de carbono puras (Serafim et al., 2008). El uso de cultivos mixtos, como el caso de lodos activados, y de efluentes ricos en carbono permiten reducir los costos de producción de PHA (Dai et al., 2007). La industria láctea, entre otras, genera aguas residuales con alto contenido de carbono. Sin embargo, no se recomienda la producción directa de PHA a partir de efluentes ricos en carbohidratos utilizando cultivos mixtos (Moralejo-Gárate et al., 2011). Al respecto, la mayoría de los estudios implementa un primer paso de fermentación, a fin de convertir los carbohidratos en ácidos grasos volátiles (AGVs), los cuales son posteriormente utilizados en la producción de PHA (Serafim et al., 2008). La síntesis de PHA es favorecida bajo condiciones alternantes de disponibilidad (“feast”) y limitación (“famine”) de carbono. Estas condiciones son logradas en reactores operados con una secuencia temporal de diferentes fases (alimentación, reacción, sedimentación y purga), denominado reactor discontinuo secuencial o reactor batch secuencial (SBR, sequencing batch reactor) (Dias et al., 2006). El proceso de producción de PHA utilizando cultivos mixtos requiere 2 o 3 etapas dependiendo del tipo de sustrato usado como materia prima. Para el caso de ácidos orgánicos se requiere una etapa de selección de microorganismos con capacidad de producir PHA seguida de una etapa de acumulación de PHA (Serafim et al., 2008). La etapa de enriquecimiento se lleva a cabo comúnmente en un SBR bajo condiciones “feast/famine”. La etapa de acumulación de PHA se realiza en un reactor batch o batch alimentado, usando la biomasa seleccionada en la fase previa (Serafim et al., 2008). Cuando se emplean sustratos ricos en carbohidratos se requiere una etapa anaeróbica fermentativa previa, como se indicó anteriormente, implicando un proceso de 3 etapas (Albuquerque et al., 2007). La cuantificación de PHA y de sus monómeros se realiza comúnmente por cromatografía gaseosa (CG) (Serafim et al., 2002). Un método alternativo permite determinar la concentración de PHA y de los monómeros hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) por espectrofotometría UV (Venkateswar Reddy et al., 2012). Debe destacarse que las propiedades mecánicas del PHA dependen de la relación de las unidades monoméricas (Zhu et al., 2013), por lo tanto resulta de gran interés determinar la composición del PHA. Sin embargo, los métodos mencionados (CG y UV) requieren la extracción del polímero mediante digestión química de la biomasa, implicando el uso de solventes, largos tiempos de tratamiento y la generación de residuos peligrosos. Por lo tanto resulta interesante la aplicación de otras técnicas. Al respecto, han sido propuestos métodos no destructivos y más simples para la detección y/o cuantificación de PHA. La tinción con Sudan Black ha permitido la detección de cepas productoras de PHA (Chen et al., 2012). La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy) es comúnmente utilizada para la detección de PHA (Amulya et al., 2014).

2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la factibilidad de producción de PHA (escala laboratorio) utilizando lodos activados alimentados con suero de queso, utilizando únicamente 2 etapas: selección de microorganismos (SBR) y producción (Batch). Como objetivos específicos se propone: a) Detectar el PHA en los cultivos por tinción con Sudan Black y FTIR, b) Monitorear la acumulación de PHA del reactor batch por análisis de imágenes, c) Extraer el PHA de la biomasa con cloroformo y determinar el rendimiento, pureza y composición monomérica del polímero.

3. Metodología

3.1 Medios de cultivo y reactores

Etapa de selección del cultivo mixto: Se empleó un SBR (2 L.) operado en forma aeróbica y alimentado con suero de queso. El medio de cultivo presentó la siguiente composición expresada en demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P): 4095 mgDQO/L, 409 mgN/L y 204 mgP/L. El SBR fue operado con una secuencia temporal de diferentes fases: reacción, sedimentación y purga del sobrenadante. Se utilizaron ciclos de 84 hs y un tiempo de residencia celular de 10 días. Se evaluó la estabilidad del SBR mediante la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de diferentes ciclos: ortofosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$, mgP/L), amonio ($\text{NH}_3\text{-N}$, mgN/L), sustrato orgánico como DQO soluble (DQO_S , mg/L) y concentración de biomasa determinada como DQO (DQO_B , mg/L). DQO_B correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO_T) y DQO_S . Esta etapa es necesaria para la selección de un cultivo mixto con capacidad de producción de PHA.

Etapa de producción de PHA: Se empleó un reactor batch aeróbico (1 L) inoculado con la biomasa procedente del SBR. El medio de cultivo contenía suero de queso, con concentraciones de N y P 20 veces inferiores a las utilizadas en la etapa de selección. Se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo del cultivo: DQO_S (mg/L); DQO_T (mg/L) y DQO_B (mg/L). La síntesis de PHA se detectó por tinción con Sudan Black y FTIR. La acumulación de PHA se monitoreo por tinción con Sudan Black acoplada a análisis de imágenes microscópicas. El rendimiento, pureza y composición monomérica del polímero (HB/HV) se determinó mediante espectrofotometría UV

3.2 Análisis de parámetros físico-químicos

Las concentraciones de ortofosfato, nitrógeno amoniacal y DQO fueron determinadas por espectrofotometría. Para determinar $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NH}_3\text{-N}$ y DQO_S se centrifugaron 35 mL del cultivo y se filtró el sobrenadante con membranas (0,45 μm). La concentración de $\text{PO}_4\text{-P}$ fue determinada luego de reaccionar con vanadato-molibdato (Método Hach N° 8114). Nitrógeno amoniacal fue medido por el método de Nessler (Método Hach N° 8038).

3.3 Detección, cuantificación y composición del PHA

Los gránulos intracelulares de PHA del SBR y batch fueron detectados por tinción con Sudan Black y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

En el reactor batch, a diferentes tiempos de cultivo, se determinó la acumulación de PHA (A_{PHA}) en los lodos activados mediante el análisis de imágenes microscópicas. Se tomaron dos muestras y se procedió a la tinción de los preparados microscópicos con Sudan Black. Los preparados fueron observados por microscopía de contraste de fases (1000X) usando un microscopio Leica con cámara fotográfica. Para cada preparado microscópico, se tomaban 10-20 microfotografías. Las imágenes microscópicas fueron analizadas con el software Image-Pro Plus 6.0. Se determinó el área ocupada por los gránulos intracelulares de PHA de los flóculos de lodos activados (A_G , μm^2), el área total de dichos flóculos (A_T , μm^2) y su relación $A_{PHA} = A_G/A_T$.

Los espectros IR del polímero fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Perkin–Elmer Spectrum One (Perkin–Elmer Inc., Boston, MA, USA). Se tomaron muestras a 0 y 48 hs del reactor batch de producción. Una vez alcanzada la máxima producción de PHA determinada por análisis de imágenes se procedió a la extracción del polímero siguiendo los siguientes pasos:

- 1- Secado de la biomasa en estufa de vacío hasta peso constante (gST/L).
- 2- Extracción del polímero con cloroformo.
- 3- Eliminación de los restos celulares por filtración.
- 4- Eliminación del solvente a temp. ambiente y estufa de vacío hasta peso constante.
- 5- Determinación de peso seco, concentración y composición de PHA.
- 6- Disolución del material extraído (extracto) en cloroformo.
- 7- Precipitación del polímero con etanol y eliminación del sobrenadante.
- 8- Secado del polímero en estufa de vacío hasta peso constante.
- 9- Determinación de peso seco, concentración y composición de PHA.

Se determinó el rendimiento, pureza y composición monomérica del PHA para las diferentes etapas del proceso de recuperación del polímero: extracción y precipitación. La composición monomérica del PHA (HB y HV) se determinó por espectrofotometría UV. El contenido de PHA de las muestras se determinó a partir de la suma de HB y HV. El rendimiento para las dos etapas se determinó a partir del cociente entre la cantidad de PHA y la biomasa seca y se expresó en forma porcentual ($100 \cdot \text{gPHA/gST}$). La pureza del biopolímero correspondió al cociente entre el contenido de PHA y el material obtenido en las dos etapas del proceso de recuperación.

4. Resultados

4.1 Reactor batch secuencial (SBR)

El SBR presentó un típico ciclo Feast/Famine. En la primera fase (Feast, 24 hs) se produjo el consumo total de la fuente de carbono externa. Asociado al consumo de sustrato se observó un incremento gradual de la biomasa microbiana, alcanzando una concentración que duplicó el valor medido al inicio del ciclo. Durante el tiempo restante del ciclo (fase “Famine”), la concentración de biomasa decayó ligeramente (Figura 1).

El decaimiento de la biomasa puso de manifiesto la ocurrencia de fenómenos de mantenimiento celular a expensas del consumo de sustancias de reserva intracelular.

Se observó la acumulación de PHA, por tinción y observación microscópica, durante la fase “Feast” de los ciclos del SBR. De esta manera, pudo afirmarse que el aumento de biomasa determinado mediante DQO fue atribuido no solamente al crecimiento o multiplicación celular sino también a la síntesis y almacenamiento de PHA.

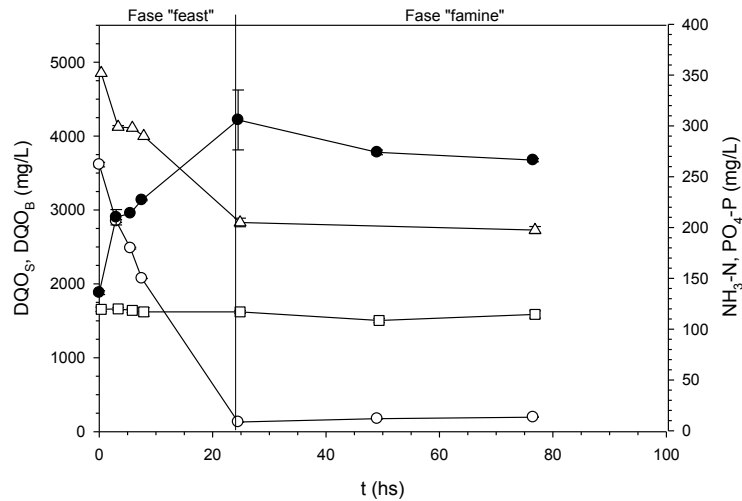


Figura 1. Parámetros químicos de un ciclo de operación del SBR. (○) DQO soluble (DQO_S, mg/L); (●) DQO de biomasa (DQO_B, mg/L); (Δ) Nitrógeno amoniacal (N-NH₃, mg/L); (□) Ortofosfato (P-PO₄³⁻, mg/L). Desvío estándar indicado por barras verticales.

4.2 Reactor discontinuo: Detección de PHA por tinción con Sudan Black y FT-IR. Cuantificación por análisis de imágenes.

En el reactor batch se observó la acumulación de PHA por tinción con Sudan Black y observación microscópica. En la Figura 2 se presentan los espectros de absorción FT-IR al inicio y final del cultivo batch. Ambas curvas presentan un pico a una longitud de onda de 1736 cm⁻¹ correspondiente a la vibración del grupo funcional éster C=O del PHA. Se puede observar que la altura del pico fue mayor a 48 hs de cultivo, asociado a un mayor contenido de PHA, respecto al inicio del proceso batch. Este resultado se atribuyó a la síntesis y acumulación de PHA durante el cultivo. La técnica espectroscópica permitió confirmar la presencia de PHA intracelular detectada por tinción con Sudan Black.

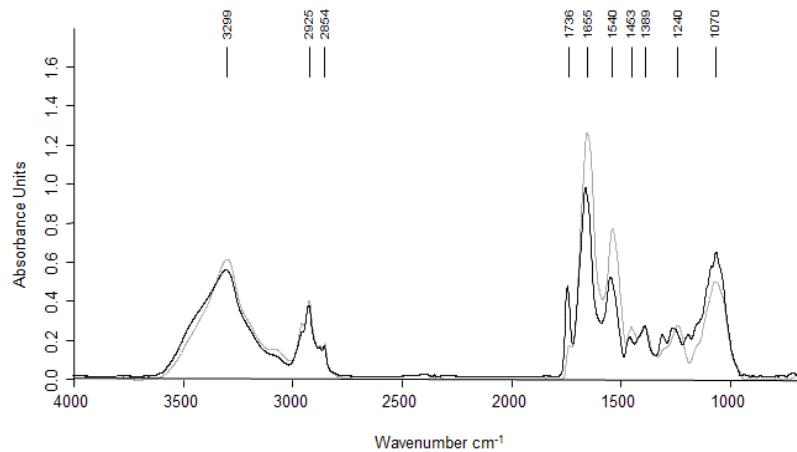


Figura 2. Espectros FT-IR a diferentes tiempos de operación del reactor batch. Línea color gris: T= 0 hs. Línea color negro: T= 48 hs.

Se requirieron aproximadamente 48 hs para la remoción del 90% del sustrato orgánico inicial. La concentración de biomasa aumentó hasta las 24 hs de cultivo; posteriormente el consumo de sustrato no implicó un incremento significativo de biomasa. A las 24 hs de cultivo se determinó una acumulación de PHA (A_{PHA}) de $30,0 \pm 7,7$ mediante análisis de imágenes. Luego de 48 hs se determinó un valor máximo de A_{PHA} de $37,8 \pm 12,8$ el cual no fue significativamente diferente del valor estimado a las 24 hs. Este nivel de acumulación implicó un incremento de 5,5 veces respecto del contenido de PHA medido al inicio del batch.

4.3 Cuantificación y caracterización del PHA por espectrofotometría UV

Una vez que se alcanzó la máxima acumulación del polímero, se extrajo la biomasa del reactor batch. La misma fue secada y se extrajo el PHA con cloroformo.

El rendimiento del polímero extraído resultó: 16,5 % (gPHA/gST). La pureza obtenida fue 86,4%. Luego de la etapa de precipitación se logró un grado de pureza de 95,4%; no obstante, el rendimiento se redujo hasta 13,2 % (gPHA/gST). El PHA correspondió al co-polímero P(HB-HV): 95,4% de HB y 4,6% de HV (mol:mol), según se determinó por espectrofotometría UV. Es conocido que la incorporación de otros monómeros diferentes al HB en los co-polímeros de PHA incrementa su flexibilidad y aplicabilidad. Particularmente, el co-polímero P(HB-HV) se vuelve más flexible y más resistente a medida que la fracción molar de 3HV aumenta (Zhu et al., 2013). Sobre la base de este análisis, resulta interesante realizar estudios adicionales a fin de incrementar el contenido de HV del co-polímero. Para ello, una buena estrategia podría basarse en la combinación de efluentes lácteos con aquellos derivados de otras industrias. Además, resulta interesante optimizar los parámetros operativos de las etapas de selección y enriquecimiento a fin de incrementar la productividad y rendimiento del polímero.

5. Conclusiones

Un efluente sintético basado en suero de queso permitió la selección de un cultivo mixto con capacidad de producción de PHA en SBR sin el requerimiento de una etapa fermentativa previa. El cultivo seleccionado fue capaz de acumular PHA en sistema

aeróbico batch. El PHA fue detectado por tinción con Sudan Black, confirmándose su presencia por FT-IR. La máxima acumulación de PHA fue lograda luego de 48 hs de cultivo según se determinó por tinción con Sudan Black acoplada a análisis de imágenes. Esta técnica permitió determinar el punto final del sistema batch de producción sin el requerimiento de una etapa de extracción química del polímero. El PHA fue extraído con cloroformo y precipitado con etanol. El PHA resultó ser un copolímero P(HB-HV), con fracción molar de HV de 4,6%. El rendimiento del polímero fue de 13,2 % (gPHA/gST) con una pureza de 95,4%. Se sugiere la realización de estudios adicionales, basados en la combinación de efluentes lácteos con aguas residuales de otras actividades industriales, a fin de enriquecer la fracción de HV en el co-polímero P(HB-HV).

6. Bibliografía

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, 130: 411–421.
- Amulya, K.; Venkateswar Reddy, M.; Venkata Mohan, S. (2014). Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 158: 336–342.
- Cavalheiro, J.; de Almeida, M.; Grandfils, C.; da Fonseca, M. M. R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44: 509–515.
- Chen, B. -Y.; Shiau, T. -J.; Wei, Y. -H.; Chen, W. -M.; Yu, B. -H.; Yen, C. -Y.; Hsueh, C. -C. (2012). Feasibility study of polyhydroxyalkanoate production for materials recycling using naturally occurring pollutant degraders. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43: 455–458.
- Dai, Y.; Yuan, Z.; Jack, K.; Keller, J. (2007). Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *J. Biotechnol.*, 129: 489–497.
- Moralejo-Gárate, H.; Mar'Atusalihat, E.; Kleerebezem, R.; van Loosdrecht, M. C. M. (2011) Microbial community engineering for biopolymer production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92: 631-639.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Albuquerque, M. G. E.; Reis, M. A. M. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 615–628.
- Steinbüchel, A. (2001). Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol. Biosci.*, 1: 1-24.
- Venkateswar Reddy, M.; Nikhil, G. N.; Venkata Mohan S.; Swamy, Y. V.; Sarma, P. N. (2012). *Pseudomonas otitidis* as a potential biocatalyst for polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis using synthetic wastewater and acidogenic effluents. *Bioresource Technology*, 123: 471–479.
- Zhu, C.; Chiu, S.; Nakas, J. P.; Nomura, C. T. (2013). Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry. *Journal of Applied Polymer Science*, 130: 1-13.