

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

Caracterización de *Halomonas titanicae* KHS3 como potencial productora de compuestos de reserva de interés biotecnológico

Ailén Natalí Rodríguez

Directora de Tesis: Dra. Karina Herrera Seitz

Co-directora de Tesis: Dra. Claudia Alicia Studdert

Laboratorio de Microbiología Molecular
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

-2025-

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento total a todas las personas e instituciones que contribuyeron a la realización de esta tesis. A la Universidad Nacional del Litoral, al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y a todas las personas que lo conforman e hicieron de este un lugar agradable de trabajo, y estuvieron a mi disposición cuando lo necesité en cada paso del camino.

A mis directoras Kari y Clau, fueron muy importantes no solo desde el lado científico y académico, sino que marcaron y acompañaron cada paso en este camino que a veces se hace sinuoso y no es tan fácil si no tenés a personas tan humanas como ustedes. ¡¡Totalmente agradecida, las quiero!!

A mis padres que fueron y son un pilar fundamental en mi vida siempre y en aquellos años de facultad cuando empezaba a dar mis primeros pasos en la ciencia, me dieron todo el apoyo y los empujones para que encontrara mi pasión y haga lo que mi corazón mande. ¡¡¡Amo la ciencia!!!

A mis hermanas, Vicky y Juuu, siempre en mi vida acompañándome en todo. Y los amores de mi vida, Dioni e Ile, llegaron para llenarnos de amor, siempre hacen que todo se calme. Los amooo!!!

A mis facu amigas, Vero y Mavi, que me acompañan desde los tiempos remotos de la facultad y me han acompañado psicológicamente a lo largo de todo este doctorado, aunque no estemos físicamente juntas, siempre están.

A cada una de las personas con las que compartí laboratorio estos años, Fer, Ro, Lu, Pame y Mariana, fue hermoso haberlas conocido y compartir fracasos, catarsis y felicidades juntos. Me llevo hermosos momentos compartidos y algunas amistades que siguen.

A las personas que he cruzado en el camino en el IAL y he compartido momentos, todos hicieron del IAL un mejor lugar, sobre todo al sector PAMI, cuantas carcajadas compartidas en la sala muda. Pero especialmente me llevo a dos grandes amigas Virgi y Caro, que fueron muy fundamentales en este proceso, hasta hace unos minutos les seque la bocha por wts, gracias totales, las quiero y juntas donde sea.

A todo el lab de cultivos celulares de la PUCV, especialmente a Álvaro y Belén, que me enseñaron tanto, pero a todos por mostrarme lo hermoso que son los chilenos y que me enamore de Chile. Hicieron que mi estancia fuera maravillosa y que aprendiera mucho.

A Cele, Ro y Angie que fueron personitas que han aparecido en mi vida en este último tiempo y aunque no parezca, han ayudado con la carga emocional que a veces nos ponemos y me han escuchado día tras día.

Casi, por último, pero no menos importante, a mi gran mamor Maxi, me aguantaste en todos mis estados, me conoces como nadie y parte de este logro también es tuyo, no es fácil convivir y aguantar a una escritora de tesis, y menos si soy yo. Sé que serás igual de feliz que yo cuando entregue el manuscrito. Te amo!

Estos últimos años no fueron nada fácil personalmente, esta tesis va dedicada especialmente a mi Abuue, donde sea que estes brindarás por esto, amabas cualquier cosa que hiciera y amabas que haga lo que tanto amo un pedacito de mi alma siempre esta con vos, Cata hubiera dado cualquier cosa por un ratito más con vos la tía siempre te tiene presente y te ama un montón.

Finalmente, al CONICET, gracias por demostrar que la ciencia de calidad y pública existe y es posible.

AGUANTE LA EDUCACIÓN PÚBLICA CARAJO!!!!!!

APORTES CIENTÍFICOS-TECNOLÓGICOS

Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados en:

Rodríguez, A. N., Escobar, M., Redersdorff, I. E., Studdert, C. A., Abraham, G. A., Cortez Tornello, P. R., & Herrera Seitz, M. K. (2024). Characterization of polyhydroxybutyrate production from *Halomonas titanicae* KHS3 and manufacturing of electrosprayed nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 141(6), e54928. <https://doi.org/10.1002/app.54928>

Redersdorff, I., Rodríguez, A., Escobar, M., Studdert, C., & Herrera Seitz, M. (2024). Rapid method for estimating polyhydroxybutyrate accumulation in bacteria using sodium hypochlorite. *BIO-PROTOCOL*, 14(1360). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5130>

Índice

Abreviaturas y símbolos.....	8
Resumen.....	10
Abstract.....	12
1. Introducción.....	14
1.1. ¿Porqué bioplásticos?.....	14
1.2. Polihidroxicanoatos.....	14
1.2.1 Generalidades.....	15
1.2.2 Ruta de biosíntesis y metabolismo de PHA.....	17
1.2.3 Métodos de extracción de PHAs a partir de células productoras.....	19
1.2.3.1 Extracción con solventes.....	20
1.2.3.2 Métodos de digestión.....	20
1.2.3.3 Disrupción Mecánica.....	21
1.2.3.4 Fluidos Supercríticos (SC).....	22
1.2.4 Características de los polímeros, aplicaciones y costos de producción.....	22
1.3 Microorganismos productores de PHAs.....	24
1.3.1 Bacterias halófilas como productoras de PHAs.....	25
1.3.1.2 <i>Halomonas titanicae</i> KHS3.....	27
1.4 Fuentes de carbono utilizadas para la producción de PHAs.....	28
1.4.1 Glicerol.....	28
1.4.2 Bagazo de cerveza.....	29
1.5 Optimización estadística de procesos fermentativos.....	30
Objetivos.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos.....	32
2. Materiales y métodos.....	33
2.1 Identificación y análisis de genes involucrados en el metabolismo de PHA.....	33
2.2 Cepa bacteriana, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	33
2.2.1 Cepa bacteriana y medios de cultivo.....	33
2.2.2 Fuentes de carbono para el crecimiento y/o acumulación de PHA.....	33
2.2.3 Condiciones de crecimiento.....	34
2.3 Sanitización del material.....	34
2.4 Cultivos en <i>batch</i> en biorreactor de tanque agitado.....	34
2.4.1 Escalado potenciométrico.....	35
2.5 Diseño experimental y optimización de la producción de biomasa y PHB.....	37
2.6 Cuantificación de glicerol.....	39
2.7 Cuantificación de amonio.....	39
2.8 Caracterización del crecimiento.....	40
2.8.1 Densidad óptica, velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d).....	40
2.8.2 Biomasa seca.....	40
2.8.3 Biomasa residual.....	40
2.8.4 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).....	40
2.9 Determinación cualitativa de la acumulación de PHAs.....	41
2.9.1 Tinción con Nile blue A.....	41
2.9.2 Tinción con Sudan Black.....	42
2.9.3 Preparación de muestras para observación por Microscopía Electrónica de Transmisión....	42
2.10 Extracción de PHAs.....	42

2.10.1 Extracción con hipoclorito de sodio.....	42
2.10.2 Extracción con cloroformo.....	43
2.10.3 Extracción con SDS.....	43
2.10.4 Extracción con etanol.....	43
2.11 Determinación cuantitativa de PHAs.....	43
2.11.1 Estimación del porcentaje de PHA con hipoclorito de sodio.....	43
2.11.2 Cuantificación de PHAs por peso seco.....	44
2.11.3 Cuantificación por ácido crotónico.....	44
2.12 Caracterización del polímero.....	45
2.12.1 Resonancia magnética nuclear de protones (1H-RMN).....	45
2.12.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	45
2.12.3 Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico.....	45
2.12.4 Caracterización del peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	46
2.13 Generación y caracterización de una mutante por interrupción del gen <i>phaC1</i>.....	46
2.13.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.....	46
2.13.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	47
2.13.3 Amplificación de un fragmento interno del gen que codifica PhaC1 (locus tag RO22_19245) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
2.13.4 Digestión enzimática de ADN y ligación.....	48
2.13.5 Preparación de células electrocompetentes, electroporación y análisis.....	48
2.13.6 Conjugación en <i>Halomonas titanicae</i> KHS3.....	49
3. Resultados.....	51
3.1 Identificación y análisis de genes involucrados en la biosíntesis de PHA.....	51
3.1.1 PHA sintasas.....	52
3.1.2 Depolimerasas.....	55
3.1.3 Fasinias.....	57
3.1.4 Regulador de la síntesis de PHA (PhaR).....	58
3.2 Producción de PHA por <i>Ht</i> KHS3: crecimiento celular, acumulación, purificación, caracterización y escalado.....	59
3.2.1 Crecimiento de <i>Ht</i> KHS3 y evaluación de la acumulación de PHA en diferentes fuentes de carbono.....	59
3.2.2 Cinética de crecimiento y acumulación de PHB por <i>Ht</i> KHS3 utilizando glucosa como única fuente de carbono.....	62
3.2.3 Caracterización del crecimiento y acumulación de PHB utilizando glicerol como única fuente de carbono.....	63
3.2.4 Movilización de PHB.....	66
3.2.5 Eficiencia de los métodos de purificación de PHB.....	68
3.2.6 Caracterización del polímero extraído.....	69
3.2.7 Producción de PHB por <i>Ht</i> KHS3 en reactor de tanque agitado bajo condiciones no estériles.....	70
3.2.7.1 Producción en reactor de 2 litros.....	71
3.2.7.2 Cambio de escala de 2 a 14 litros.....	72
3.3 Generación y caracterización de una mutante por interrupción del gen <i>phaC1</i>.....	73
3.3.1 Interrupción del gen que codifica la enzima PHA sintasa PhaC1 de <i>Ht</i> KHS3.....	73
3.3.2 Comparación del crecimiento y acumulación de PHB entre la cepa mutante <i>SF18</i> y la salvaje.....	74
3.4 Diseño experimental estadístico y optimización de la producción de biomasa y PHB....	78

3.4.1 Evaluación de factores por diseño de Plackett-Burman.....	78
3.4.2 Diseño factorial fraccionado.....	80
3.4.3 Optimización de las variables por Diseño Central Compuesto (DCC).....	83
3.5 Diseño de un proceso de producción de PHB en dos etapas.....	87
3.5.1 Etapa 1: producción de biomasa.....	88
3.5.1.1 Análisis de las variables que influyen en la producción de biomasa.....	88
3.5.1.2 Optimización de la producción de biomasa.....	90
3.5.2 Etapa 2: producción de PHB.....	94
3.5.2.1 Evaluación de variables que afectan la producción de PHB.....	94
3.5.2.2 Optimización de la producción de PHB.....	96
3.5.3 Aplicación del proceso en dos etapas utilizando fuentes de carbono alternativas.....	100
3.5.3.1 Lixiviado de relleno sanitario como fuente de carbono.....	100
3.5.3.2 Bagazo de cerveza como fuente de carbono.....	101
3.5.4 Estrategia en dos etapas para la producción del copolímero PHBV.....	102
Discusión de resultados.....	105
Conclusiones.....	113
Anexo.....	115
Bibliografía.....	127

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

% p/v	Porcentaje peso-volumen
% p/p	Porcentaje peso-peso
% v/v	Porcentaje volumen-volumen
°C	Grados Celsius
°C/min	Grados Celsius por minuto
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
ΔH _m	Entalpía de fusión
ΔH _c	Entalpía de cristalización
ΔH _{m,th}	Calor de fusión teórico para cristales de PHB
A	Absorbancia
Ác	Ácido
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico concentrado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CO ₂	Dióxido de carbono
C/N	Carbono/Nitrógeno
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
Da	Dalton
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
Fe	Hierro
FeCl ₃	Cloruro de hierro
Form.	Formadora
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
g	Gramo
H ₂ O	Agua
h	Hora
J/g	Joule por gramo
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
LB	Medio Lauria Berni
l	Litro
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
m	metro
min	Minutos

mm	Milímetro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MET	Microscopia electrónica de transmisión
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Microgramo
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
ON	<i>Over night</i>
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	polihidroxibutirato
P. ej.	Por ejemplo
Ppm	partes por millón
Prot.	Proteína
rpm	revoluciones por minuto
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protones
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
t°	Temperatura
Tm	Temperatura de fusión
Tc	Temperatura de cristalización
TGA	Análisis termogravimétrico
UV	Ultravioleta
vvm	volumen de aire por volumen de medio por minuto
x g	Fuerza centrífuga relativa
Xc	Grado de cristalinidad
YE	Extracto de levadura

RESUMEN

Halomonas titanicae KHS3 (*Ht* KHS3) es una bacteria ambiental de interés biotecnológico debido a su halotolerancia, su capacidad para sintetizar compuestos de reserva y su habilidad para metabolizar compuestos xenobióticos. Esta tesis se enfocó en identificar los genes involucrados en el metabolismo de los polihidroxiclcanoatos (PHAs), caracterizar el metabolismo asociado a la producción de poli(3-hidroxibutirato) (PHB) y desarrollar estrategias para optimizar dicha producción utilizando diversas fuentes de carbono.

En primer lugar, se identificaron y analizaron comparativamente los genes involucrados en el metabolismo del PHB en *Ht* KHS3. Para ello, se comparó su organización genética y su similitud de secuencias con las cepas de *Cupriavidus necator* (*C. necator*; anteriormente llamado *Ralstonia eutropha* y, más históricamente, *Alcaligenes eutrophus*), *Azotobacter vinelandii* (*A. vinelandii*) y *Halomonas bluephagenesis* (*Halomonas* TDO1), ampliamente estudiadas por su capacidad de producir biopolímeros. Este análisis permitió reconocer genes candidatos que codifican para β -cetotiolasa (gen *phaA*), para acetoacetyl-CoA-reductasa (gen *phaB*), para sintasas de PHA (gen *phaC1* y *phaC2*), tres para posibles fasinas (*phaP1*, *phaP2* y *phaP3*), un regulador de la síntesis de PHA (gen *phaR*), y tres genes homólogos de depolimerasas de PHB, *phaZ1*, *phaZ2* y *phaZ3*, potencialmente involucrados en la degradación del polímero.

Una vez confirmada la presencia de los genes involucrados en la producción de PHB en *Ht* KHS3, se realizó la caracterización fisiológica de la cepa mediante ensayos de crecimiento y acumulación de PHA utilizando diferentes fuentes de carbono (extracto de levadura (YE), glucosa y glicerol). Se confirmó que el material acumulado correspondía a PHB mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y se observó que *Ht* KHS3 sólo acumuló polímero al crecer en condiciones de desbalance C/N tanto en glucosa como en diversas concentraciones de glicerol y, en cambio, no acumuló PHA en presencia de extracto de levadura como única fuente de carbono. Además, se realizó una caracterización detallada del polímero producido con 3% v/v glicerol, realizando análisis de RMN, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y determinación del peso molecular. Posteriormente, se evaluó la capacidad metabólica de la cepa para crecer y acumular PHB en cultivos *batch* realizados en un reactor de 2 l con glicerol como fuente de carbono y sin esterilidad, incluyendo un escalado potenciométrico hasta 12 l, lo que permitió validar el potencial biotecnológico de *Halomonas* como plataforma de producción de PHB.

Una vez caracterizada la acumulación del polímero, se procedió a la generación de una mutante por interrupción de uno de los dos genes *phaC* presentes en el genoma, *phaC1*, para evaluar su rol en la polimerización del PHB. La mutante generada, *SF18*, fue comparada con la cepa salvaje

Ht KHS3 en términos de crecimiento y acumulación de PHB, y los resultados indicaron que el gen *phaC1* es el principal responsable de la acumulación de PHB bajo las condiciones evaluadas.

Finalmente, se aplicó diseño experimental estadístico para estudiar la influencia de los componentes del medio y las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de *Ht* KHS3 y la producción de PHB. Con esta información, se desarrolló y optimizó un proceso de producción en dos etapas: una primera etapa estéril, destinada a la producción de biomasa, y una segunda etapa no estéril destinada a la producción de PHB, con menores requerimientos de agitación. Mediante este esquema se evaluó el uso de bagazo de cerveza (BC) y lixiviado de relleno sanitario como fuentes de carbono residuales para ser consumidas durante la etapa de acumulación, resultando el bagazo una opción prometedora. Asimismo, se exploró la producción del copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) bajo este mismo esquema, alcanzando hasta un 15% de copolímero butirato/valerato, valor de incorporación de valerato que resulta muy interesante para futuros experimentos.

En conjunto, este trabajo aporta evidencia que contribuye a comprender y mejorar la producción de PHB y PHBV en *Ht* KHS3, fortaleciendo su potencial como plataforma biotecnológica para la valorización de sustratos alternativos.

ABSTRACT

Halomonas titanicae KHS3 (*Ht* KHS3) is an environmental bacterium of biotechnological interest because of its halotolerance, its ability to synthesize storage compounds, and its capacity to metabolize xenobiotic compounds. This thesis focused on identifying the genes involved in polyhydroxyalkanoate (PHA) metabolism, characterizing the metabolism associated with poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production, and developing strategies to optimize PHB production using different carbon sources.

First, the genes involved in PHB metabolism in *Ht* KHS3 were identified and comparatively analyzed. Their genetic organization and sequence similarity were compared with those of *Cupriavidus necator* (formerly *Ralstonia eutropha* and historically *Alcaligenes eutrophus*), *Azotobacter vinelandii*, and *Halomonas bluephagenesis* (*Halomonas* TDO1), which are widely studied for their ability to produce biopolymers. This analysis enabled the identification of candidate genes encoding β -ketothiolase (*phaA*), acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*), PHA synthases (*phaC1* and *phaC2*), three putative phasins (*phaP1*, *phaP2*, and *phaP3*), a regulator of PHA synthesis (*phaR*), and three genes homologous to PHB depolymerases (*phaZ1*, *phaZ2*, and *phaZ3*), potentially involved in polymer degradation.

After confirming the presence of the genes for PHA metabolism in *Ht* KHS3, the strain was physiologically characterized through growth and PHA accumulation assays using different carbon sources, including yeast extract (YE), glucose, and glycerol. The accumulated material was confirmed to be PHB by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. *Ht* KHS3 accumulated PHB only under carbon/nitrogen (C/N) imbalance conditions when grown on glucose or various glycerol concentrations, while no PHA accumulation was observed when yeast extract was used as the sole carbon source. Additionally, a detailed characterization of the polymer produced with 3% (v/v) glycerol was performed using NMR, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), and molecular weight determination.

The metabolic capacity of the strain to grow and accumulate PHB was then evaluated in batch cultures in a 2 L stirred-tank bioreactor using glycerol as the carbon source under non-sterile conditions, including a potentiometric scale-up to 12 L. These experiments validated the biotechnological potential of *Ht* KHS3 as a platform for PHB production.

After characterizing polymer accumulation, a mutant strain was generated by disrupting one of the two *phaC* genes present in the genome (*phaC1*) to evaluate its role in PHB polymerization. The resulting mutant, *SF18*, was compared with the wild-type strain *Ht* KHS3 in terms of growth and PHB accumulation. The results indicated that *phaC1* is the main gene responsible for PHB accumulation under the evaluated conditions.

Finally, a statistical experimental design was applied to study the influence of medium components and culture conditions on *Ht* KHS3 growth and PHB production.

Based on this information, a two-stage production process was developed and optimized: a first sterile stage for biomass production and a second non-sterile stage focused on PHB accumulation, with reduced agitation requirements. In this scheme, brewery spent grain and landfill leachate were evaluated as residual carbon sources for the accumulation stage, with brewery spent grain identified as a promising option. Additionally, the production of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) was explored under the same process conditions, achieving up to 15% butyrate/valerate copolymer incorporation, a highly attractive value for future studies.

Overall, this work provides evidence that advances the understanding and improvement of PHB and PHBV production in *Ht* KHS3, strengthening its potential as a biotechnological platform for the valorization of alternative substrates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿Por qué bioplásticos?

Los productos plásticos derivados del petróleo con propiedades como ligereza, transparencia, alta durabilidad y facilidad de procesamiento pueden producirse a muy bajo costo. En consecuencia, se utilizan de manera generalizada en prácticamente todos los aspectos de nuestra vida diaria. Durante los últimos 50 años, ha habido un aumento continuo en la demanda de plásticos, y en 2017 se estimó que la producción mundial de plásticos alcanzó aproximadamente 348 millones de toneladas. Estos polímeros son duraderos y presentan alta persistencia en el medio ambiente, lo cual es ventajoso en muchas aplicaciones (como tuberías, aeronaves, etc.), pero también favorece la acumulación de residuos plásticos en tierra y océanos. A esta problemática se suma la dependencia del petróleo como materia prima, un recurso no renovable cuya extracción y procesamiento generan un impacto ambiental significativo y contribuyen al cambio climático. Frente a esta situación, se ha intensificado la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan sustituir los plásticos convencionales por materiales biodegradables y de origen renovable. En este contexto, la biotecnología desempeña un papel central al ofrecer soluciones basadas en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos (Choi et al., 2019; Haider et al., 2019). La sustitución de los polímeros convencionales por polímeros biodegradables surge como una estrategia prometedora; sin embargo, su viabilidad económica y ecológica aún resulta motivo de debate. Los polímeros biodegradables se caracterizan por su capacidad de mineralizarse en agua, dióxido de carbono y biomasa una vez liberados al medio ambiente, lo que reduce significativamente su impacto ambiental. Estos plásticos de origen biológico ofrecen ventajas adicionales, tales como compostabilidad, potencial de reciclaje y una menor huella de carbono. En las últimas décadas, la demanda de plásticos degradables ha aumentado considerablemente, acompañada por un rápido desarrollo tecnológico que ha permitido su producción a escala industrial. Dentro de los polímeros biodegradables más utilizados, destacan el ácido poliláctico (PLA), las mezclas de almidón, el poli(butileno succinato) (PBS), el poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT, Ecoflex®) y los PHAs (Choi et al., 2019 ; Muigano et al., 2025).

1.2 Polihidroxialcanoatos

Entre las alternativas más prometedoras de polímeros biodegradables se encuentran los PHAs, una familia de biopolíésteres naturales producidos por diversas bacterias como materiales de reserva de carbono y energía. Estos compuestos han despertado gran interés científico y comercial debido a que combinan propiedades similares a las de los plásticos convencionales con biodegradabilidad, biocompatibilidad y sostenibilidad, características que los convierten en

candidatos ideales para aplicaciones industriales, médicas y ambientales. Sin embargo, la producción de PHAs a gran escala enfrenta aún limitaciones asociadas a los altos costos de fermentación y purificación, el bajo rendimiento, la susceptibilidad del polímero a la degradación, así como a la sensibilidad de las bacterias productoras frente a condiciones extremas (Anjum et al., 2016; Choi et al., 2019; McAdams et al., 2020; Tan et al., 2014).

1.2.1 Generalidades

Los PHAs son polímeros completamente biodegradables que pueden descomponerse en aproximadamente siete meses, dependiendo de su tipo y grosor, cuando se entierran en el suelo. Numerosos microorganismos presentes en la naturaleza liberan enzimas capaces de degradar los PHAs, permitiendo que se descompongan en compuestos solubles en agua, los cuales luego pueden ser utilizados como fuente de nutrición (Samrot et al., 2021). Estos polímeros son producidos por la célula bajo condiciones de estrés nutricional o en ambientes desfavorables, como un exceso de carbono acompañado de limitación de otros nutrientes esenciales (N, O, P, etc.) y son almacenados en forma de gránulos intracelulares (Jendrosseck & Pfeiffer, 2014; McAdams et al., 2020). Durante décadas, los PHAs fueron considerados principalmente compuestos de reserva, que se acumulan en condiciones de exceso de carbono y se degradan para sustentar el metabolismo celular cuando la fuente externa de carbono se agota (Obruca et al., 2020; Tan et al., 2014). Sin embargo, con el tiempo surgieron numerosas evidencias que muestran un papel biológico más complejo de los PHAs. Diversos estudios demostraron que mutantes de *Azospirillum brasilense* con el gen *phaC* delecionado, presentaron una biosíntesis deficiente de PHA (Kadouri et al., 2002; Kadouri et al., 2003a) y que la eliminación del gen *phaZ* impidió que la bacteria utilizara el PHA almacenado (Kadouri et al., 2003b). En los casos mencionados, los mutantes con defectos en el metabolismo de PHAs mostraron una sensibilidad significativamente mayor frente a diversas condiciones de estrés en comparación con la cepa salvaje. Fenómenos análogos también fueron observados en otras bacterias como *Aeromonas hydrophila* (Zhao et al., 2007), *Pseudomonas oleovorans* (Ruiz et al., 2001), *Pseudomonas extremaustralis* (Tribelli et al., 2019) o *Pseudomonas aeruginosa* (Pham, 2004). Esto confirma que los PHAs son metabolitos muy complejos y que, además de su función primaria como compuestos de reserva, también proporcionan beneficios secundarios importantes a las células bacterianas, como el aumento de la robustez y la tasa de supervivencia cuando se exponen a diversas condiciones de estrés ambientalmente relevantes (Obruca et al., 2020).

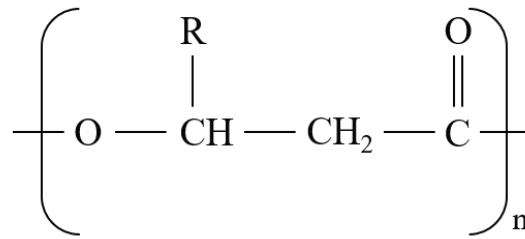
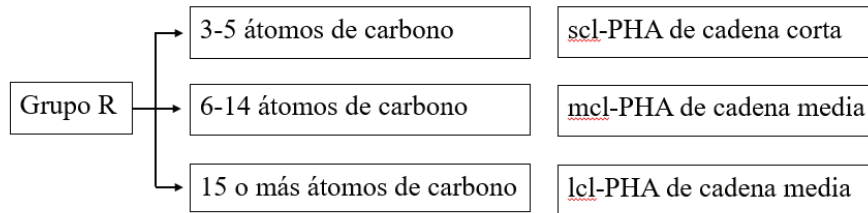
A**B**

Figura 1. Estructura general de los PHAs y su clasificación según la longitud de la cadena. Panel A. Representación química general de un monómero de PHA, donde R corresponde al grupo lateral variable. **Panel B.** Clasificación de los PHAs según el número de átomos de carbono del grupo R.

Una molécula de PHA está compuesta típicamente por entre 600 y 35.000 unidades monoméricas de ácidos grasos (R)-hidroxilados. Cada unidad monomérica posee un grupo lateral R, que suele ser un grupo alquilo saturado (Figura 1A). Según el número total de átomos de carbono presentes en el monómero, que dependerá del grupo R lateral presente, los PHAs se clasifican en: PHAs de cadena corta (scl-PHA, por sus siglas en inglés) compuesto por monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, PHAs de cadena media (mcl-PHA) contienen monómeros de 6 a 14 átomos de carbono, y PHAs de cadena larga (lcl-PHA) con monómeros de 15 o más átomos de carbono (Figura 1B).

Los PHAs se acumulan en el citoplasma en forma de gránulos insolubles en agua (Figura 2), cuyo número por célula y tamaño dependen de las diferentes especies y de las condiciones de cultivo (Jendrosseck & Pfeiffer, 2014). Estas inclusiones están constituidas aproximadamente por un 98% (p/p) de PHA, rodeadas por un 2% de proteínas asociadas a los gránulos (GAPs), ya sean proteínas estructurales o enzimas que forman parte del metabolismo de los PHAs (Maestro & Sanz, 2017). Aunque algunos estudios afirman que los gránulos están rodeados por una capa de fosfolípidos (Das et al., 1997; Reusch, 1989), otros consideran que no hay fosfolípidos presentes alrededor del gránulo (Stubbe & Tian, 2003; Stubbe et al., 2005). Ambas posturas se basan en consideraciones teóricas y en datos experimentales obtenidos a partir de gránulos del microorganismo modelo para el estudio de PHA, *C. necator*. En este contexto, varios modelos de cómo se forman los gránulos y su constitución están aún bajo discusión (Jendrosseck & Pfeiffer, 2014). El modelo de micela asume que la enzima polihidroxibutirato sintasa (PHB sintasa) comienza a producir el polímero hidrofóbico de poli(3-hidroxibutirato) (PHB). Dada la hidrofobicidad del PHB en un entorno acuoso, las cadenas poliméricas nacientes se agregan y forman estructuras similares a

micelas en el citoplasma, con moléculas de PhaC parcialmente hidrofílicas situadas en la superficie del polímero (Figura 2A). Posteriormente, proteínas llamadas fasinas y otras GAPs se adhieren a los gránulos en crecimiento. El modelo de gemación asume que la PHB sintasa está localizada en la membrana citoplasmática, y que la cadena de PHB hidrofóbica en crecimiento se libera dentro de la bicapa de la membrana, lo que conduce a la formación de gránulos dentro de la membrana citoplasmática. Una vez que los gránulos de PHB han alcanzado un tamaño específico, éstos se desprenden y las fasinas y otras GAPs se unen a los gránulos (Figura 2B). El tercer modelo, el modelo de andamiaje, asume que la PHB sintasa de los gránulos de PHB nacientes está unida a una molécula de andamiaje aún desconocida dentro de la célula (Figura 2C).

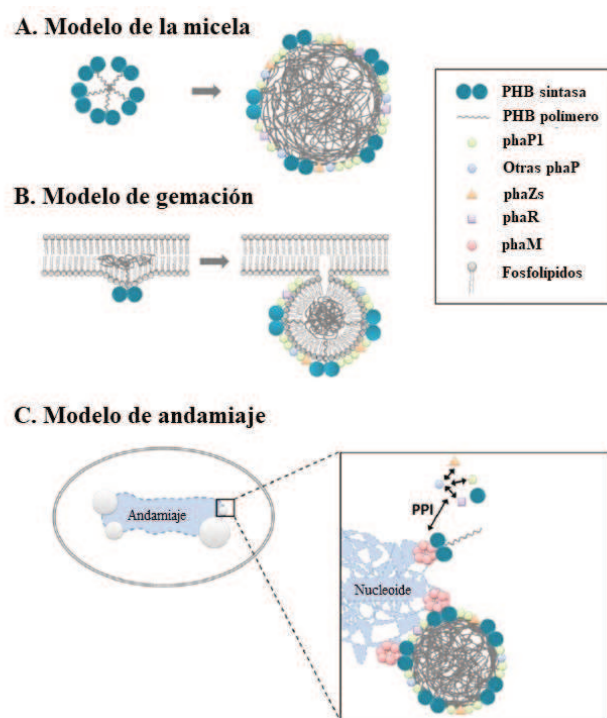


Figura 2. Modelos de formación de gránulos de PHB en bacterias. Se muestran los tres modelos propuestos hasta el momento de formación de gránulos. **A.** Modelo de la micela. **B.** Modelo de gemación. **C.** Modelo de andamiaje. En el recuadro se indica qué representa cada forma. Imagen adaptada de Jendrosseck & Pfeiffer, 2014.

Nota. PPI: interacción proteína-proteína.

1.2.2 Ruta de biosíntesis y metabolismo de los PHAs

Las rutas biosintéticas de los PHAs están estrechamente vinculadas con las rutas metabólicas centrales de la bacteria, como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, la síntesis de ácidos grasos de *novo*, el catabolismo de aminoácidos, el ciclo de Calvin y la vía de la serina (Tan et al., 2014). Todas estas rutas comparten intermediarios comunes con la ruta de biosíntesis de PHA, siendo la ruta del acetil-coenzima A (acetil-CoA) la más relevante. La

mayoría de los procariotas sintetizan PHAs formados por monómeros de cadena corta, derivados principalmente de precursores como acetil-CoA o propionil-CoA. La vía clásica y mayormente estudiada comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA catalizada por la enzima β -ketotiolasa (gen *phaA*) lo que da lugar a la formación de acetoacetyl-CoA, que luego es reducido a (R)-3-hidroxiacetyl-CoA, por la acetoacetyl-CoA-reductasa (gen *phaB*) específica para configuración R. El (R)-3-hidroxiacetyl-CoA (u otro 3-hidroxiacetyl-CoA) es el sustrato de la PHA sintasa (gen *phaC*) y precursor directo de la síntesis de PHB (Figura 3A).

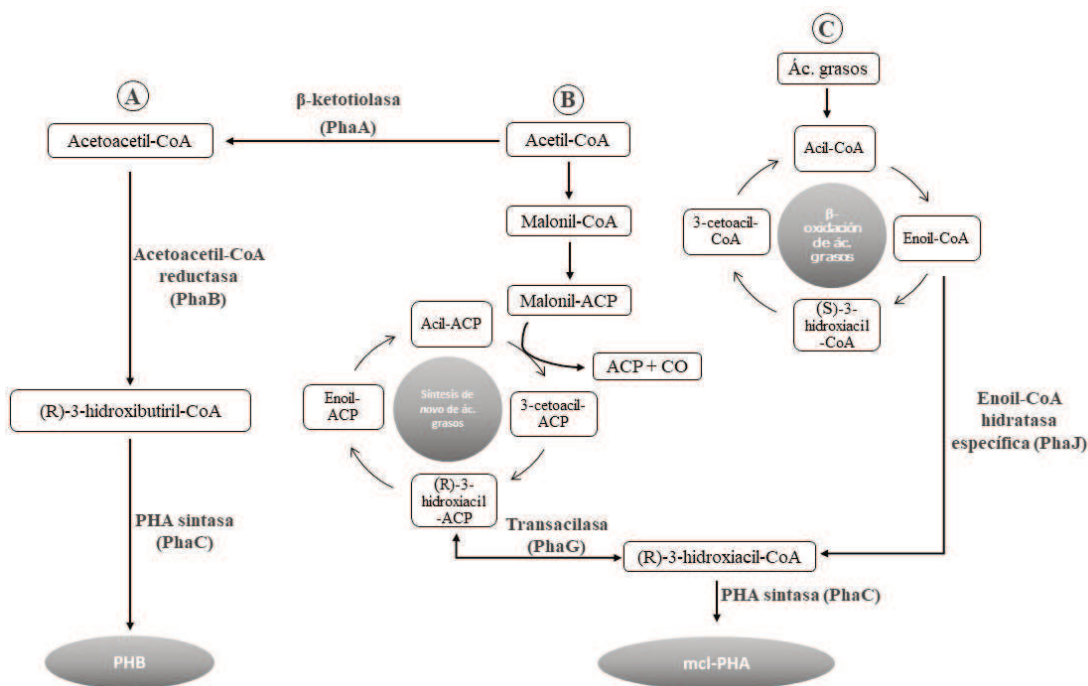


Figura 3. Rutas metabólicas de biosíntesis de PHAs. El esquema muestra las tres rutas principales para la síntesis de monómeros precursores de PHAs. **A.** Ruta de biosíntesis de clase I produce PHAs de cadena corta. **B y C.** Ruta de biosíntesis de clase II sintetiza PHAs de cadena media a partir de la síntesis de ácidos grasos de *novo* (B) o de la β -oxidación de ácidos grasos (C). Imagen adaptada de Rehm, 2006.

Esta ruta de síntesis de PHA corresponde a la ruta biosintética de clase I (Rehm, 2003). En microorganismos bien estudiados como *C. necator*, los principales genes del metabolismo de PHA (*phaA*, *phaB* y *phaC*) se encuentran co-localizados y organizados en un operón, *phaCAB* (Rehm, 2003). La segunda clase principal de biopolíesteres está compuesta por ácidos grasos (R)-3-hidroxi de cadena media y es producida principalmente por *Pseudomonas* (Anjum et al., 2016; Maestro & Sanz, 2017). Estos PHAs se sintetizan a partir de la conversión de intermediarios del metabolismo de ácidos grasos en (R)-3-hidroxiacetyl-CoA. Se han descrito dos rutas: cuando los intermediarios provienen de la biosíntesis de ácidos grasos de *novo*, la transacilasa PhaG desvía los [(R)-3-hidroxiacetyl-ACP] hacia la biosíntesis de PHA. Esta enzima transfiere el grupo acilo desde la proteína portadora de acilos (ACP) a la coenzima A, generando el (R)-3-hidroxiacetyl-CoA, sustrato directo de la PHA sintasa (Figura 3B). Por otro lado, si la fuente de carbono se

oxida a través de la vía de β -oxidación de ácidos grasos, la enoil-CoA hidratasa específica (gen *phaJ*) cataliza la conversión de enoil-CoA a (R)-3-hidroxiacil-CoA (Figura 3C). En ambas vías, el (R)-3-hidroxiacil-CoA resultante es el sustrato de la PHA sintasa y es el precursor directo en la biosíntesis de PHAs de cadena media. Los genes *phaG* y *phaJ* que codifican las enzimas correspondientes no están co-localizados con la sintasa, pero suelen estar co-regulados (Rehm., 2006).

1.2.3 Métodos de extracción de PHAs a partir de las células productoras

Como ya se mencionó, los PHAs son productos intracelulares que deben liberarse de las células a fin de utilizarlos como bioplásticos. En algunos casos, la extracción puede realizarse directamente sobre las células mediante métodos biológicos, químicos o físicos; sin embargo, en muchos microorganismos se requiere la aplicación de procedimientos de pretratamiento que debilitan la firmeza de la pared y de la envoltura celular, facilitando así los pasos principales posteriores que deben aplicarse a las células para liberar los gránulos de PHA (Figura 4, Pretratamiento). Estos pretratamientos suelen desarrollarse para microorganismos específicos y no pueden generalizarse, ya que dependen de las características particulares de cada cepa. Entre los pretratamientos más comunes se encuentra el tratamiento térmico que actúa desnaturalizando proteínas y desestabilizando la membrana externa. También se utilizan agentes químicos, como hidróxido de sodio o cloruro de sodio, los cuales reducen la resistencia de la pared celular y mejoran la eficiencia de los procesos de ruptura. Asimismo, se han ensayado métodos físicos, como ciclos de congelamiento y descongelamiento, que provocan la ruptura mecánica de las células por la formación de cristales de hielo. Sin embargo, no se han reportado aplicaciones de estos pretratamientos a escala industrial (MadKour et al., 2013).

Los métodos empleados para extraer el PHA suelen implicar la lisis de la pared y/o membrana celular, la solubilización y purificación del polímero, y su posterior precipitación. Entre los más utilizados se encuentran la extracción con disolventes, los métodos de digestión química y los procedimientos basados en enzimas (Figura 4A-C); estos pueden representar hasta un 50% o más del costo total de producción. Cada método permite la separación y recuperación de un polímero con características físico-químicas particulares, que presentan distintos grados de similitud con los observados en los gránulos nativos, dependiendo del método empleado (MadKour et al., 2013).

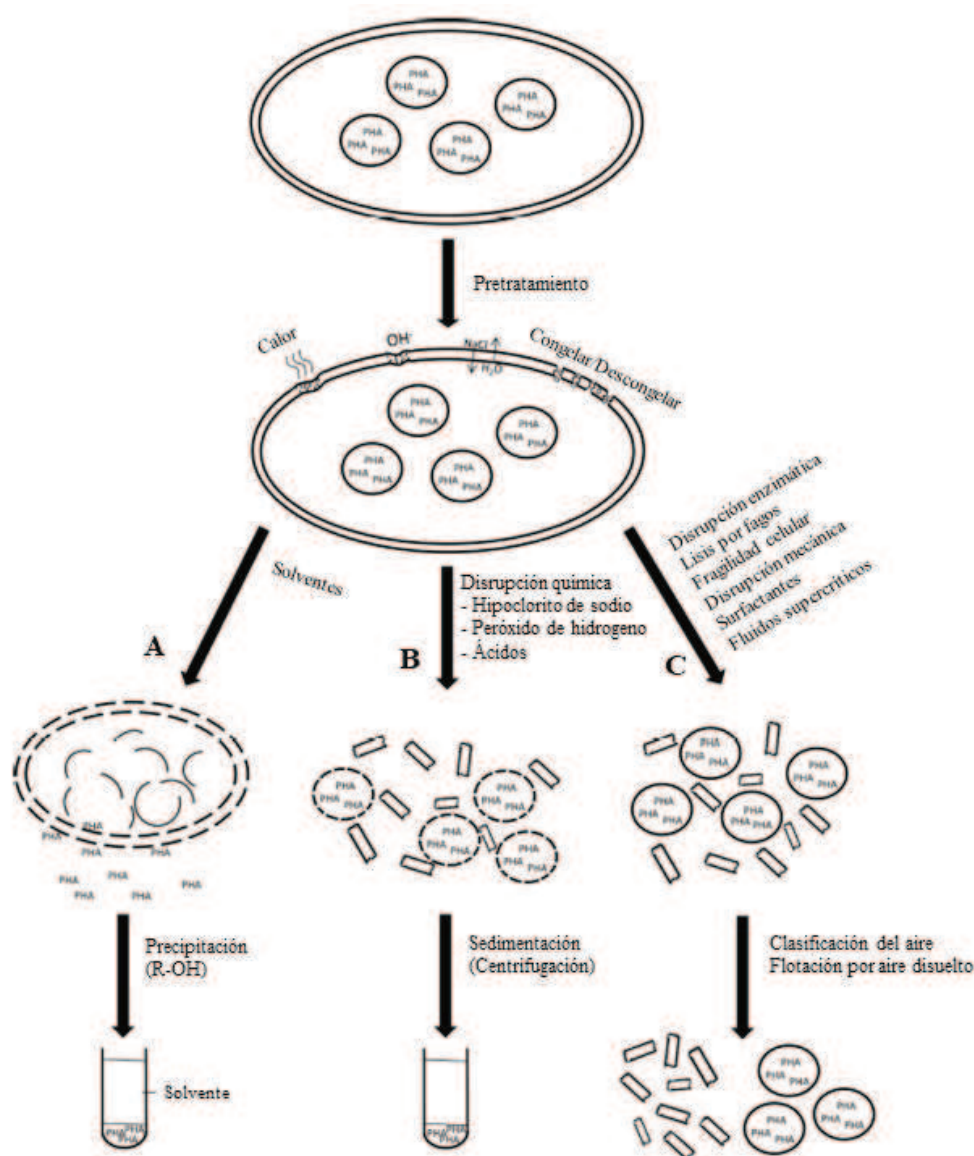


Figura 4. Esquema general de los métodos de extracción y recuperación de PHA. El material celular puede ser sometido primero a un pretratamiento (calor, congelar/descongelar, NaCl, H₂O₂) antes de la extracción. A partir de allí, se distinguen tres enfoques principales: **A.** Extracción con solventes, seguida de precipitación para aislar los gránulos de PHA. **B.** Disrupción química, empleando agentes como hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno o ácidos, seguida de sedimentación/centrifugación. **C.** Disrupción mecánica, enzimática o biológica, incluyendo lisis por fagos, fragilidad celular, surfactantes y fluidos supercríticos, seguida de clarificación por aire o flotación por aire disuelto. Imagen adaptada de Madkour et al., 2013.

1.2.3.1 Extracción con solventes

La extracción con solventes orgánicos es el método más antiguo y ampliamente utilizado para la recuperación de PHA a partir de biomasa microbiana. Este proceso consiste en volver permeables las células para solubilizar y liberar los gránulos de PHA (Figura 4A), que luego se precipitan mediante el uso de un antisolvente en el que el PHA no sea soluble (Ibrahim et al., 2009), o mediante evaporación del solvente formando una fina capa de PHA (Ashby et al., 2005). Entre los solventes más empleados se encuentran el cloroformo, etanol, metanol, hexano y 1,2-

dicloroetano. Su principal ventaja es la obtención de polímeros con alta pureza y peso molecular; sin embargo, presenta desventajas asociadas al alto costo operativo y al impacto ambiental negativo por el uso de solventes tóxicos. Algunas estrategias, como la reutilización de disolventes residuales provenientes de otros procesos industriales, han demostrado reducir estos efectos y mejorar la sostenibilidad del método (Madkour et al., 2013; Samrot et al., 2021; Tan et al., 2014). García et al. (2019) evidencian que la extracción con etanol empleando hipoclorito de sodio como pretratamiento constituye un método seguro para recuperar bioplásticos, reemplazando al cloroformo por solventes no halogenados, como el etanol y la acetona.

1.2.3.2 Métodos de digestión

El método de digestión constituye una alternativa bien establecida a la extracción con disolventes para la recuperación de PHA, dado el impacto ambiental negativo de este último. Cuando una célula es lisada, mediante actividad química o enzimática, los gránulos de PHA se liberan, y la masa celular no perteneciente al PHA (hidrofílica) se transforma en un material soluble en agua que se puede separar por centrifugación. Existen dos tipos de digestión:

- Digestión química: mediante el uso de diversos surfactantes, como dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton X-100, palmitoil carnitina, betaína o hipoclorito de sodio, este último empleado como un agente oxidante fuerte (Figura 4B). La extracción con SDS es una alternativa más simple y menos tóxica que la extracción con solventes orgánicos (Park et al., 2021); el SDS se incorpora en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática de la envoltura celular desintegrándola. No obstante, esta técnica requiere de grandes volúmenes de agua para eliminar los restos celulares, lo que limita su aplicación a gran escala (Samrot et al., 2021; Tan et al., 2014). La extracción con hipoclorito de sodio permite la separación del polímero, el cual puede recuperarse posteriormente por centrifugación. Este método se basa en que el hipoclorito degrada, en concentraciones apropiadas, de manera más o menos selectiva todos los componentes celulares poliméricos no pertenecientes al PHA, mientras que el PHA resiste en gran medida el ataque químico del hipoclorito. El PHA, que no se disuelve en hipoclorito de sodio y permanece sólido, puede separarse fácilmente mediante filtración o centrifugación. En general, este proceso es fácil de manejar y, con algunas precauciones, también es aplicable a gran escala. Para su aplicación a gran escala, debe considerarse que la digestión de la biomasa con hipoclorito es altamente exotérmica y requiere control de la generación de calor. Si bien esta técnica es simple y efectiva, los polímeros obtenidos suelen presentar masas moleculares más bajas que las obtenidas extrayendo con

cloroformo, por ejemplo, debido a la degradación parcial del polímero (Samrot et al., 2021; Tan et al., 2014).

- Digestión enzimática: este método emplea diversas enzimas, como proteasas, nucleasas, lisozima y lipasas, que ejercen efectos hidrolíticos sobre proteínas y otros polímeros de la masa celular bacteriana, iniciando así la lisis celular. También se ha reportado el uso de enzimas como bromelina y pancreatina. En algunos casos, este procedimiento se complementa con un pretratamiento para favorecer la acción enzimática principal. El PHA liberado se separa luego por filtración y se extrae mediante un solvente adecuado (Figura 4C). La digestión enzimática minimiza la degradación del polímero alcanzando purezas de hasta el 90%. En comparación con la extracción con disolventes y la digestión química, este método es más seguro en términos operativos, reduce el riesgo para la salud y presenta una menor huella ambiental. No obstante, su aplicación a gran escala continúa limitada por el alto costo de las enzimas (Madkour et al., 2013; Tan et al., 2014).

1.2.3.3 Disrupción Mecánica

El método mecánico rompe los componentes de la pared celular mediante fuerza física, para recuperar componentes intracelulares como el PHA sin necesidad de solventes, siendo prometedor a escala industrial. El principio detrás de la molienda con perlas (*bead milling*) se basa en la fuerza de corte, impacto y transferencia de energía de las perlas al material celular, independientemente de la concentración de biomasa. La complejidad de los parámetros, la necesidad de múltiples etapas y el tiempo requerido limitan su uso a escala industrial y suelen utilizarse a escala de laboratorio. La homogeneización a alta presión es otro método mecánico que consiste en una bomba de desplazamiento positivo impulsada por aire, que empuja la suspensión celular a alta presión a través de dos ranuras paralelas (Samrot et al., 2013). Este método se emplea para el tratamiento de biomasa a gran escala, y su rendimiento depende directamente de la concentración celular, presentando una eficiencia reducida cuando se trabaja a bajas concentraciones (Madkour et al., 2013).

1.2.3.4 Fluidos Supercríticos (SC)

El dióxido de carbono (CO₂) en estado SC presenta baja viscosidad y alta densidad, por lo que es un disolvente de extracción adecuado para los PHAs. Por ejemplo, el CO₂, a 74 bar y 31 °C, se difunde a través de las células y solubiliza el PHA. Este método es rápido, ecológico y relativamente económico, por lo que se aplica a escala industrial, especialmente en aplicaciones biomédicas; sin embargo, su uso industrial se ve limitado por los altos costos de mantenimiento del equipo (Samrot et al., 2021).

Existen otros métodos como la fragilidad celular, clarificación por aire, flotación por aire disuelto y la liberación espontánea de los gránulos de PHA, que son menos estudiados y aplicados. Existe una gran variedad de métodos disponibles, y la elección final depende en gran medida del organismo del que se aisló el PHA, del método de liberación empleado y del tipo de PHA. Además, depende de la aplicación final del PHA producido (Madkour et al., 2013).

1.2.4 Características de los polímeros, aplicaciones y costos de producción

Las propiedades químicas y físicas de los PHAs varían considerablemente según la composición de sus monómeros. Generalmente, los polímeros se caracterizan utilizando parámetros como hidrofobicidad, temperatura de fusión (T_m), temperatura de transición vítrea (T_g) y grado de cristalinidad (X_c). La familia de los PHAs exhibe una amplia variedad de propiedades mecánicas, que van desde materiales duros y cristalinos hasta elásticos. Los biopolímeros de cadena corta como el PHB, son rígidos, frágiles y presentan un alto grado de cristalinidad (entre 60 y 80%), mientras que los PHAs de cadena media son flexibles y elásticos, con baja cristalinidad ($\approx 25\%$), baja resistencia a la tracción, alta elongación hasta la rotura, baja temperatura de fusión y una T_g inferior a la temperatura ambiente (Anjum et al., 2016; Samrot et al., 2021).

El PHB es el PHA más ampliamente estudiado y se utiliza como referencia para explicar las propiedades de otros PHAs. El PHB es altamente cristalino debido a su estereoregularidad, insoluble en agua y relativamente resistente a la degradación hidrolítica. Presenta buenas propiedades termoplásticas, aunque su resistencia mecánica (como el módulo de Young y la resistencia a la tracción) es inferior a la de polímeros derivados del petróleo, como el polipropileno (PP). En su forma homopolimérica, el PHB es frágil y rígido. Para mejorar las propiedades físicas del polímero se puede incrementar el peso molecular o incorporar diferentes monómeros como el 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxipropionato (3HP) y 4-hidroxibutirato (4HB) en la cadena polimérica. Esta estrategia permite formar copolímeros con mejores propiedades mecánicas y térmicas, como la cristalinidad, el punto de fusión, la rigidez y la tenacidad. El copolímero más ampliamente estudiado es el PHBV, que está compuesto por los monómeros diferentes 3HB y 3HV distribuidos de manera irregular a lo largo de la cadena de polímero, lo que le otorga propiedades fisicoquímicas particulares. En comparación con el PHB, el PHBV presenta una menor cristalinidad y punto de fusión, menor rigidez, mayor elongación a la rotura y, en consecuencia, mayor flexibilidad y resistencia al impacto. Estas características lo convierten en una alternativa prometedora para reemplazar al polipropileno en envases de un solo uso y otros materiales descartables. El contenido molar de 3HV en el copolímero puede variar entre 0 y 30% y constituye un factor determinante de sus propiedades, ya que influye de manera significativa en la flexibilidad y la extensibilidad del material. En particular, PHBV con contenidos superiores al 20% molar de unidades de 3HV puede

emplearse para la fabricación de películas y fibras con diferentes grados de elasticidad, mediante el control de las condiciones de procesamiento (Anjum et al., 2016; Catalán et al., 2018).

Para el año 2016, Anjum reportó la comercialización de diversas variedades de PHAs, entre ellas:

- Biopol®: copolímero PHBV, termoplástico. Se utiliza en envases, botellas de champú, artículos desechables, suturas quirúrgicas, clavos y utensilios, parches médicos, tejidos y recubrimientos de pañales.
- Nodax®: es un copolímero de PHB y una cantidad relativamente pequeña de monómeros de cadena media, incluyendo 3HHx, 3-hidroxi octanoato (3HO) y 3-hidroxidecanoato (3HD). Disponible como espumas, fibras, películas, látex y no tejidos.
- PolDegra®: poliéster-uretano compuesto por dos bloques de polímeros con propiedades físicas y mecánicas diferenciadas.
- Biogreen®: PHB desarrollado por Mitsubishi Gas Chemicals a partir de metanol.

Los PHAs industriales se emplean en el empaque y en artículos desechables, como películas, bolsas, botellas de champú, vasos, cartones, utensilios, pañales y productos de higiene femenina. También se utilizan en medicina y farmacología, incluyendo ingeniería de tejidos, placas óseas, suturas, apósitos, injertos vasculares, *stents* cardiovasculares, implantes, liberación controlada de fármacos y tratamientos dentales. En el área agrícola, se aplican como películas de acolchado, herbicidas, insecticidas e inoculantes bacterianos para mejorar la fijación de nitrógeno en plantas. El PHBV destaca por su propiedad de barrera al gas, útil en envases de alimentos y botellas plásticas para bebidas. La combinación de biodegradabilidad, versatilidad y propiedades físicas hace que los PHAs sean materiales ideales para aplicaciones médicas, industriales y agrícolas, con un alto potencial en la transición hacia una economía más sostenible (Anjum et al., 2020).

La comercialización y la industrialización a gran escala de los PHAs están limitadas debido a sus altos costos de producción, lo que se traduce en precios superiores en comparación con los polímeros derivados del petróleo. Mientras que el precio de polímeros como el polipropileno o el polietileno (PE) ronda los US\$1,32–1,92/kg, se estima que el costo de los PHAs es cuatro veces mayor, oscilando entre US\$4,96–6,06/kg. Aunque varias empresas han industrializado la producción de PHA, aún existen problemas importantes que deben abordarse para reducir el costo total de producción. Las principales razones de su alto costo son: el precio elevado de los sustratos de alta pureza, como la glucosa, la producción en modos de cultivo discontinuo por lotes y por lotes alimentados (*fed-batch*), y la gran cantidad de disolventes y/o mano de obra requeridos en los procesos de recuperación y purificación (Johnston et al., 2018; Kourmentza et al., 2017).

1.3 Microorganismos productores de PHAs

La capacidad de bioacumular PHA está ampliamente distribuida entre los dominios *Bacteria* y *Archaea*, encontrándose microorganismos productores de PHA en más de 70 géneros de ambos dominios. Hasta la fecha, la mayoría de las bacterias productoras de PHA son Gram-negativas (Tan et al., 2014). La cepa bacteriana silvestre más utilizada y estudiada para la producción industrial de PHB, PHBV y poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (P3HB4HB) ha sido *C. necator*. Según los reportes disponibles para el año 2009 (Tabla 1), *C. necator* y *Escherichia coli* (*E. coli*) recombinante constituyen, y continuarán siendo, cepas industriales clave para la producción de al menos estos tres tipos de PHAs, debido a la simplicidad de sus requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la producción de PHA a escala piloto y a gran escala. Se muestran las principales cepas bacterianas salvajes e industriales reportadas para la producción de diferentes tipos de PHA. Tabla adaptada de Chen, 2009.

Nota: t/a = toneladas por año; *vgb* = gen que codifica la hemoglobina de *Vitreoscilla*; *phaCAB* = genes de síntesis de PHB que codifican para la β -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB sintasa; 1,4-BD = 1,4-butanodiol; PHBHHx=poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato); *phaC_{Ac}* = gen de la PHA sintasa *phaC* de *Aeromonas caviae* (*Ac*); *phbAB* = codifica para la β -cetotiolasa y la acetoacetyl-CoA reductasa.

Cepa	Manipulación del ADN	Tipo de PHA y escala (t/a)	Fuente de carbono	Biomasa seca (g.l ⁻¹)	PHA final (% Peso seco)	Compañía
<i>C. necator</i>	No	PHB (10)	Glucosa	>200	>80%	Tianjin North. Food, China
<i>A. latus</i>	No	PHB (10-300)	Glucosa o Sacarosa	>60	>75	Chemie Linz, bTf, Austria Biomers, Germany
<i>E. coli</i>	<i>phaCAB</i> + <i>vgb</i>	PHB (10)	Glucosa	>150	>80%	Jiang Su Nan Tian, China
<i>C. necator</i>	No	PHBV (300-2000)	Glucosa+ propionato	>160	>75%	ICI, UK
<i>C. necator</i>	No	P3HB4HB (>10000)	Glucosa + 1,4-BD	>100	>75%	Metabolix, USA
<i>E. coli</i>	<i>phaCAB</i>	P3HB4HB (>10000)	Glucosa + 1,4-BD	>100	>75%	Tianjin Green Biosci. China
<i>C. necator</i>	<i>phaC_{Ac}</i>	PHBHHx (1)	Ác. grasos	>100	>80%	P&G, Kaneka, Japan
<i>A. hydrophila</i>	No	PHBHHx (1)	Ác. láurico	<50	<50%	P&G, Jiangmen Biotech Ctr, China
<i>A. hydrophila</i>	<i>phbAB</i> + <i>vgb</i>	PHBHHx (0,1)	Ác. láurico	~50	>50%	Shandong Lukang, ETH, Switzerland
<i>P. putida</i> <i>P. oleovorans</i>	No	mcl-PHA (0,1)	Ác. grasos	~45	>60%	
<i>Bacillus spp.</i>	No	PHB (5)	Sacarosa	>90	>50%	Biocycles, Brazil

Además de estos microorganismos, para ese mismo año también se reportaron diversas cepas silvestres utilizadas en la producción a escala piloto e industrial de diferentes tipos de PHAs, entre las que destacan *Alcaligenes latus* (*A. latus*), *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*), *Pseudomonas putida* (*P. putida*), *Pseudomonas oleovorans* (*P. oleovorans*) y especies del género *Bacillus*. Estas presentan rendimientos variables según las condiciones de cultivo y el tipo de sustrato empleado (Chen, 2009; Tabla 1). Otras cepas estudiadas a escala de laboratorio son *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Halomonas* sp., *Haloferax* sp., *Methylobacterium* sp.; *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas* sp., *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans*, cianobacterias y *Chromobacterium* sp. (Anjum et al., 2016).

1.3.1 Bacterias halófilas como productoras de PHA

Los microorganismos halófilos han despertado un interés creciente en la producción de PHA debido a su capacidad distintiva de crecer en ambientes de alta salinidad, lo que reduce significativamente el riesgo de contaminación microbiana durante los procesos de fermentación. En particular, los miembros del género *Halomonas* son conocidos como productores de PHA, actuando como auténticas “fábricas celulares” capaces de generar biopolímeros de alto rendimiento. Estas bacterias poseen la capacidad única de valorizar una amplia gama de fuentes de carbono debido a su versatilidad metabólica, lo que las convierte en candidatas prometedoras para la producción sostenible de PHA. Además, las especies de *Halomonas* presentan un gran potencial para sistemas de producción futuros, pudiendo incluso reemplazar a microorganismos ampliamente utilizados como *C. necator* y *E. coli*. Su capacidad de crecer en condiciones de alta salinidad permite cultivarlas sin requerimientos estrictos de esterilidad, lo que posiciona a *Halomonas* como un agente estratégico para la producción de PHA a gran escala, ofreciendo la ventaja de reducir costos, minimizar riesgos de contaminación y permitir el uso de sustratos no convencionales, contribuyendo así a superar los principales cuellos de botella de la industria de bioplásticos (González-Rojo et al., 2024; Muigano et al., 2025).

Las bacterias del género *Halomonas*, pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*, comprenden microorganismos Gram-negativos halófilos o halotolerantes capaces de crecer en un amplio rango de pH (6,0–11,0) y concentraciones salinas (0–15 % de NaCl). Su notable adaptación a ambientes hipersalinos se debe a la acumulación de solutos compatibles, como la ectoína, que les confiere una elevada tolerancia osmótica. Estas bacterias presentan una destacada versatilidad metabólica, lo que ha permitido su aplicación en la producción de bioproductos de interés industrial, como PHA, ectoína y enzimas. En las últimas dos o tres décadas, *Halomonas* ha cobrado gran relevancia como plataforma microbiana alternativa. Los primeros reportes sobre la producción de PHA por este género surgieron a inicios de los años 2000, destacando a *Halomonas boliviensis* (*H.*

boliviensis) y, posteriormente, *Halomonas* TD01, aislada de un lago salino en China, como cepas modelo por su alta eficiencia productiva. *Halomonas* TD01 ha revolucionado el campo al demostrar su capacidad para crecer en condiciones no estériles y en medios basados en agua de mar o efluentes salinos, reduciendo significativamente los costos de fermentación. Además, su flexibilidad metabólica le permite aprovechar diversas fuentes de carbono, como glucosa, glicerol y residuos agrícolas, y alcanzar altos niveles de acumulación de PHA, incluyendo homopolímeros y copolímeros con mejores propiedades mecánicas. La manipulación genética de especies de *Halomonas* es más compleja que en organismos modelo como *E. coli* y *P. putida*, ya que los métodos convencionales de transformación química y electroporación resultan poco eficientes o inviables en *Halomonas*. Por ello, la conjugación ha sido históricamente la principal estrategia para introducir material genético. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado herramientas que han ampliado significativamente las posibilidades de ingeniería en *Halomonas*, incluyendo la implementación de sistemas de edición como CRISPR/Cas. Estos avances han permitido optimizar el rendimiento celular, modificar la composición de los polímeros y generar nuevos tipos de PHA. En conjunto, los avances logrados posicionan a *Halomonas* como un sistema biotecnológico prometedor para la producción sostenible de bioplásticos, integrando eficiencia productiva, reducción de costos y aprovechamiento de recursos renovables (Muigano et al., 2025).

1.3.1.2 *Halomonas titanicae* KHS3

Ht KHS3 es una cepa bacteriana aislada del agua del Puerto de Mar del Plata, por su capacidad de crecer utilizando gasoil como única fuente de carbono y por responder quimiotácticamente a dicho sustrato (D'Ippólito et al., 2011). Este bacilo es móvil debido a flagelos peritricos (Figura 5) y muestra fuerte respuesta quimiotáctica hacia diversos compuestos que puede metabolizar, como glucosa, glicerol, citrato, salicilato y fenantreno (Gasperotti et al., 2018).

La cepa fue inicialmente identificada como *Halomonas* sp. a partir del análisis de la secuencia del gen ARN ribosomal 16S, cuyo alineamiento mostró un 99% de similitud con *Halomonas titanicae* S6-2-2 y *Halomonas* sp. MBEE15 (D'Ippólito et al., 2011). Posteriormente, la secuenciación completa del genoma de *Halomonas* sp. KHS3 permitió realizar una comparación exhaustiva con los genomas de otras especies del género *Halomonas*. El cálculo de la identidad promedio de nucleótidos evidenció los valores de similitud más elevados con *Halomonas* sp. 19A GOM-1509 y *Halomonas titanicae* BH1, alcanzando 97,52 % y 97,22 %, respectivamente. Estos resultados permitieron su reclasificación taxonómica dentro de la especie *Halomonas titanicae* (Gasperotti et al., 2018).

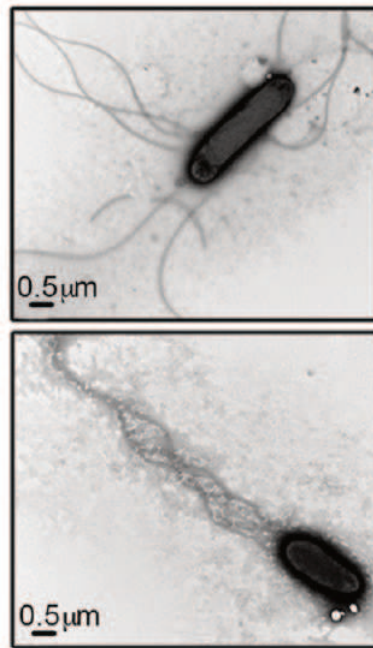


Figura 5. Células de *Ht KHS3*. Imágenes de esta cepa obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Dos tipos de disposición de flagelos se observaron: desordenados (arriba) o formando un haz (abajo). Imagen tomada de Gasperotti et al. (2018).

1.4 Fuentes de carbono utilizadas en la producción de PHA

La glucosa es una de las fuentes de carbono más estudiadas para la acumulación de PHA en diferentes microorganismos (Liu et al., 2021; Tan et al., 2014; Tohme et al., 2018; Van-Thuoc et al., 2007; Zhou et al., 2012), ya que es una fuente de energía y carbono disponible rápidamente. Como se mencionó anteriormente, muchos de los PHA comerciales se producen utilizando glucosa como fuente de carbono (Chen et al., 2009; Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Sin embargo, fuentes de carbono alternativas también se utilizan para la producción de PHA, incluyendo azúcares como fructosa, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa; n-alcanos como hexano, octano y dodecano; ácidos alifáticos como ácido acético, propiónico, butírico, valérico, láurico y oleico; alcoholes como metanol, etanol, octanol, glicerol; y gases como metano y dióxido de carbono (Tan et al., 2014). Uno de los principales factores que contribuyen a los altos costos de producción de PHA son los sustratos de alta pureza, los cuales pueden representar hasta el 45% del costo total. Por esta razón, en las últimas décadas la investigación se ha centrado en reducir los altos costos mediante la exploración de materias primas renovables y el desarrollo de bioprocesos para la valorización de corrientes de desecho y subproductos. Dado que cada tipo de desecho o subproducto presenta una composición diferente y compleja, la selección del microorganismo adecuado es fundamental (Kourmetza et al., 2017). Si bien se han reportado diversas fuentes de carbono derivadas de desechos para la producción de PHA a escala de laboratorio, su escalamiento industrial aún no ha sido exitoso. En la práctica, las materias primas

más empleadas continúan siendo azúcares puros como glucosa y sacarosa. Entre las fuentes de desecho identificadas como alternativas económicas de carbono se incluyen: aceite de freír usado, residuos de vinagre, grasas residuales, desechos alimentarios, residuos agrícolas, aguas residuales domésticas e industriales, efluentes de molinos de aceite vegetal, glicerol crudo procedente de la producción de biodiésel, desechos plásticos, gas de vertedero, residuos del procesamiento de productos lácteos, bagazo de caña de azúcar, entre otros (Tan et al., 2014).

1.4.1 Glicerol

El glicerol es un polialcohol de cadena de tres carbonos, cuya estructura química contiene tres grupos hidroxilo ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$). La presencia de estos grupos alcohólicos, tanto primarios como secundarios, confiere a la molécula un alto grado de reactividad, lo que permite su transformación en una amplia variedad de derivados, como ésteres, aminas y aldehídos. Esta versatilidad química hace del glicerol un sustrato de interés en procesos biotecnológicos e industriales, incluyendo su utilización en la producción de biopolímeros como los PHA.

El glicerol crudo es el principal subproducto de la industria de biodiésel y, por lo tanto, constituye una fuente de carbono abundante y de bajo costo para la obtención de compuestos y materiales de origen biológico. Es generado a partir de la transesterificación de grasas y aceites vegetales o animales. Para una producción anual de 150 millones de galones por año, se genera una cantidad de 50 millones de kg de glicerol crudo, con un contenido de glicerol del 85%. Aunque el glicerol puro es una materia prima industrial importante, con aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética y tabacalera, el glicerol crudo procedente del biodiésel tiene un valor relativamente bajo debido a la presencia de impurezas (como metanol, sales y ácidos grasos). Los productores de biodiésel a gran escala refinan su glicerol crudo y lo redirigen a mercados de otras industrias. El tratamiento general suele basarse en filtración, adición de productos químicos y destilación fraccionada al vacío para obtener distintos grados comerciales. Para su uso en alimentos, cosméticos y fármacos, se requieren pasos adicionales de purificación para eliminar las impurezas residuales. La purificación hasta este nivel es costosa y a menudo no resulta económicamente viable para plantas de tamaño pequeño o mediano. Una vez considerado un subproducto valioso, el glicerol crudo se está convirtiendo rápidamente en un “residuo” con un costo asociado de disposición. Por ello, resulta muy importante encontrar alternativas ambientalmente sostenibles para el glicerol de desecho. Se ha propuesto la implementación de biorrefinerías que coproduzcan productos de alto valor junto con biocombustibles como una solución a este problema (Cavalheiro et al., 2009; Tanadchangsang & Yu, 2012). En este contexto, el uso de glicerol crudo como sustrato para la producción de PHA aparece como una estrategia atractiva, dado que evita los elevados costos vinculados a su purificación previa.

1.4.2 Bagazo de cerveza

La cerveza es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, y el aumento en la demanda de los consumidores implica un incremento gradual en su producción, lo que a su vez genera un aumento en los residuos generados durante su elaboración. El residuo más abundante es el bagazo de malta (grano cervecero gastado), obtenido tras el filtrado y prensado del mosto resultante de la sacarificación del grano de cebada malteada. Se estima que, por cada hectolitro de cerveza, se generan aproximadamente 20 kg de bagazo, lo que representa una elevada disponibilidad de este residuo. En 2021, la producción mundial de cerveza alcanzó aproximadamente 1,86 mil millones de hectolitros, lo que se traduce en alrededor de 37,2 millones de toneladas de bagazo. Tradicionalmente, este residuo se destina a la alimentación animal, incineración o compostaje, debido a su bajo costo. Sin embargo, considerando las posibilidades de valorización, como la producción de etanol de segunda generación, la fermentación anaerobia para biogás o la producción de compuestos de valor agregado, resulta fundamental desarrollar técnicas que permitan su aprovechamiento de manera eficiente. La composición química del bagazo presenta una alta variabilidad, dependiente del proceso de producción, las materias primas y la tecnología empleada, lo que requiere un análisis específico para cada caso. En términos generales, se estima que, en base seca, el bagazo de cerveza es rico en proteínas (15–25%) y en materia lignocelulósica (70%), incluyendo compuestos fenólicos. Además, contiene cenizas (2–4,5%), lípidos (3,9–18%) y compuestos extraíbles de interés biotecnológico, tales como vitaminas, aminoácidos y otros compuestos fenólicos. Cabe destacar que el bagazo obtenido industrialmente presenta un alto contenido de humedad, que varía entre 70 y 85% (Castro-Criado, 2023; Tschoeke et al., 2023). Dada su abundancia, bajo costo y composición rica en carbohidratos fermentables, el bagazo de cerveza se perfila como un sustrato atractivo para procesos biotecnológicos, incluyendo la producción de PHA, ofreciendo una alternativa sostenible para valorizar un residuo de gran escala.

1.5 Optimización estadística de procesos fermentativos

Tradicionalmente, las fermentaciones se optimizaban variando un componente a la vez, un enfoque que consume mucho tiempo y asume que el efecto de cada variable del proceso es independiente de los efectos de las demás (Nygaard et al., 2019). En los últimos años, este enfoque ha sido reemplazado por métodos estadísticos de optimización que consideran la interacción entre las variables y su efecto sobre la respuesta del proceso. En la mayoría de los casos, esta interacción se representa mediante una superficie de respuesta asociada al diseño experimental. La metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es una técnica estadística que permite evaluar la importancia relativa de las variables independientes, sus posibles interacciones y determinar las condiciones óptimas para obtener respuestas deseables (Anderson-Cook et al., 2009). Este enfoque evita la optimización individual, costosa y prolongada, ya que mediante el análisis de regresión estadística y la RSM es posible determinar simultáneamente los

efectos de múltiples variables de proceso sobre la variable de respuesta, así como medir la significancia de cada una de ellas. En los procesos de fermentación microbiana para la obtención de PHA, la RSM se utiliza para definir la composición del medio de cultivo que proporciona una productividad óptima de estos biopolímeros (Nygaard et al., 2019; Pokój et al., 2019; Zaldívar Carrillo et al., 2018).

Este proyecto de tesis se centrará en la caracterización de *Ht KHS3* como productora de PHA, incluyendo la identificación de genes involucrados en su síntesis y regulación, la evaluación de su crecimiento y acumulación frente a distintas fuentes de carbono, y la caracterización del polímero producido. Además, se estudiará la producción en biorreactor de tanque agitado, se analizará el papel del gen *phaC1* mediante una mutante, y se utilizará diseño experimental estadístico para optimizar las condiciones de cultivo y lograr una producción eficiente de PHB con menores requerimientos, orientada a la reducción de costos de producción.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar la cepa ambiental *Halomonas titanicae* KHS3 en cuanto a la producción y acumulación de compuestos de reserva con potencial biotecnológico como polihidroxialcanoatos (PHB o PHBV).

Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de *Ht KHS3* de crecer a expensas de distintas fuentes de carbono y de producir y acumular polihidroxialcanoatos en distintas condiciones nutricionales.
2. Estudiar los genes responsables de la síntesis de PHAs y su regulación, a través de la generación y caracterización de mutantes en genes específicos.
3. Estudiar las características del polímero acumulado en distintas condiciones de crecimiento, en la cepa salvaje y en mutantes dirigidos a modificar sus propiedades.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Identificación y análisis de genes involucrados en el metabolismo de PHA

Para el análisis y búsqueda de los posibles genes involucrados en la biosíntesis de PHA en *Ht* KHS3 se utilizó el servidor Integrated Microbial Genomes (IMG) (<https://img.jgi.doe.gov/>) en el cual se encuentra cargado el genoma de *Ht* KHS3 y los de *Halomonas* TD01, *C. necator* y *A. vinelandii*.

El alineamiento de secuencias se realizó mediante el programa Clustal Omega (Multiple Sequence Alignment) (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

2.2 Cepa bacteriana, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

2.2.1 Cepa bacteriana y medios de cultivo

En esta tesis se trabajó con la cepa *Ht* KHS3 (Gasperotti et al., 2015). El *stock* de la cepa se mantuvo a -80°C con 15% v/v de glicerol a partir de un cultivo saturado en medio LB-2.

Para el crecimiento y mantenimiento de la cepa desde el *stock* se utilizó el medio sólido LB-2 agar: 1% p/v triptona (Difco), 0,5% p/v extracto de levadura (YE, por sus siglas en inglés *yeast extract*) (Difco), 2% NaCl (Baker) y 1,2% agar (Difco).

Para el crecimiento y acumulación de PHA se utilizó el medio mínimo H1-2: 11,2 g/l K₂HPO₄ (Merck), 4,8 g/l KH₂PO₄ (Merck), 2 g/l (NH₄)₂SO₄ (Merck), 1 mM MgSO₄ (Applichem), 1,85 µM FeCl₃ (Fluka), 20 g/l NaCl y la fuente de carbono indicada en cada experimento.

Para el crecimiento de la cepa para inóculo de reactor se utilizó LB-6: medio Luria-Bertani modificado (1% p/v triptona y 0,5% p/v de YE, 6% p/v NaCl).

2.2.2 Fuentes de carbono para el crecimiento y/o acumulación de PHA

Las fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento de *Ht* KHS3 y para la acumulación de PHA fueron: extracto de levadura (YE) 0,25% p/v, glucosa 1% p/v (Merck), fenantreno 10 µg/ml y glicerol comercial (Cicarelli) y de reactor (provisto por el Dr. Querini del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)), en distintas concentraciones.

Para la acumulación del copolímero PHBV se utilizó ácido propiónico (Merck) como precursor. Este compuesto se preparó como una solución *stock* acuosa estéril 1 M y se adicionó al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración final de 0,02% p/v.

Para el estudio de sustratos residuales como fuentes de carbono se emplearon bagazo de cerveza y lixiviado de relleno sanitario.

Bagazo de cerveza: fue obtenido de diferentes cervecerías artesanales de la región litoral. Para su incorporación al medio de cultivo se realizó una extracción de nutrientes a partir del grano de malta. Para ello, 76 gramos de grano se colocaron en un vaso de precipitado y se cubrieron con 100 ml de una solución de NaCl al 2% p/v. El recipiente se tapó con papel de aluminio y se llevó a ebullición a 100°C en baño térmico durante 2,5 h. Posteriormente, los granos se filtraron con un colador. El líquido resultante, con sólidos en suspensión, se dejó sedimentar; la fase líquida se recuperó mediante pipeteo y se filtró a través de papel de filtro.

Lixiviado de relleno sanitario: fue provisto por el Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Previamente a su uso se filtró.

Todas las fuentes de carbono, una vez preparadas, fueron esterilizadas en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de sobrepresión.

2.2.3 Condiciones de crecimiento

Los cultivos se incubaron en frascos Erlenmeyer a 28°C con agitación orbital a 200 rpm.

Para generar condiciones de limitación de nitrógeno, la cepa se cultivó en medio mínimo H1-2 completo inoculado a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) inicial de 0,02 hasta la fase exponencial, DO_{600} aproximada de 0,5. En este punto las células se centrifugaron a 2400 x g por 10 minutos y se resuspendieron en medio H1-2 fresco con fuente de carbono y sin $(NH_4)_2SO_4$. Las células suspendidas se dividieron en dos fracciones: a una fracción se le adicionó sulfato de amonio para completar el medio H1-2 estándar (control) y a la otra fracción se la dejó sin adición de nitrógeno.

2.3 Sanitización del material

La sanitización del material se llevó a cabo en aquellos ensayos en los que se trabajó sin condiciones de esterilidad. Para ello, se lavó el material y se adicionó una cantidad de hipoclorito de sodio al 1% p/v equivalente a la mitad de su volumen. Se cubrió con papel de aluminio y se dejó en reposo 1 h. El hipoclorito usado se descartó en un bidón para su posterior reutilización y el material se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, se rociaron bien las paredes del material con alcohol al 70% v/v, se lo dejó actuar durante 5 minutos y se desechó el alcohol. Finalmente, se dejó evaporar el alcohol para posterior utilización del material.

2.4 Cultivos en *batch* en biorreactor de tanque agitado

Se hicieron cultivos en *batch* en un reactor tanque agitado de 2 y 14 litros que no fueron esterilizados, y en su lugar el reactor fue previamente sanitizado. Se utilizó medio mínimo H1 al que se agregaron 60 g/l de NaCl. Se mantuvo la temperatura del cultivo a 28°C y se inyectó un flujo de aire a 0,48 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto).

2.4.1 Escalado potenciométrico

Se realizó un escalado de 2 a 14 litros mediante la técnica de escalado de potencia por unidad de volumen constante (P/V ctte).

En primer lugar, se calculó la potencia gaseada utilizada en el reactor de 2 litros a partir de la ecuación 1.

$$Pg = \alpha \times \left(\frac{P_0^2 \times N \times D^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad (1)$$

donde:

P_0 = potencia volumétrica del reactor

N = velocidad del agitador

D : diámetro del impulsor del reactor de 2 litros.

Por lo tanto, para poder calcular la potencia gaseada se necesitó calcular la potencia volumétrica (P_0) a partir de la ecuación 2.

$$P_0 = N_p \times \rho \times N^3 \times D_i^5 \quad (2)$$

Dicha ecuación es válida para sistemas de un solo impulsor. En la práctica se utilizan varios impulsores en el mismo eje. Para sistemas de múltiples impulsores, la situación es más compleja, pero como primera aproximación se multiplica el número de potencia por la cantidad de impulsores. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que puede ser una sobrestimación de la potencia, ya que el consumo de potencia aumenta menos que de manera proporcional al número de impulsores.

N_p : es el número de potencia que en reactores de tanque agitado sólo depende del tipo de impulsor, en este caso para las turbinas Rushton el valor de N_p es 5,5 por dos turbinas 11 (Chisti & Moo-Young, 1999).

ρ : densidad del medio se considera de $1000 \frac{kg}{m^3}$ como la del agua.

N: agitación en revoluciones por segundo (rps). Se utilizaron 400 rpm; $\frac{400 \text{ revoluciones}}{60 \text{ segundos}} = 6,67 \text{ rps}$.

D: diámetro del impulsor en metros; 0,05 m.

Con estos valores se hizo el cálculo de la potencia volumétrica:

$$Po = 11 \times 1000 \frac{kg}{m^3} \times (6,67 \text{ rps})^3 \times (0,05 \frac{m}{seg})^5$$

$$Po = 1,02 \frac{kg \times m^2}{seg^3}$$

Este valor de potencia se multiplicó por el factor de corrección 0,898.

$$1,02 \frac{kg \times m^2}{seg^3} \times 0,898 = 0,92 \frac{kg \times m^2}{seg^3}$$

Con este valor de potencia se calculó la potencia gaseada del reactor de 2 litros con la ecuación 2.

$$P_0: 0,92 \frac{kg \times m^2}{seg^3}.$$

$$\alpha = 1,224$$

$$\beta = 0,432$$

$$Q = \text{flujo de aire en } \frac{m^3}{seg}. \text{ Se utilizó un flujo de } 0,58 \frac{litro}{min} \rightarrow \frac{0,58}{1000} = 0,00059 \frac{m^3}{min} \rightarrow \frac{0,00059}{60 \text{ seg}} = 9,83 \times 10^{-6} \frac{m^3}{seg}.$$

$$N: 6,67 \text{ rps}$$

$$D: 0,05 \text{ m}$$

Reemplazando estos valores en la ecuación 1:

$$Pg: 1,224 \left(\frac{(0,92 \frac{kg \times m^2}{seg^3})^2 \times 6,67 \text{ rps} \times (0,05 \text{ m})^3}{9,667 \times 10^{-6} \frac{m^3}{seg}} \right)^{0,432}$$

$$Pg = 0,87 \frac{kg \times m^2}{seg^3}$$

Teniendo la potencia volumétrica y la potencia gaseada del reactor de 2 litros, con la misma fórmula (ecuación 1) pero ahora considerando diámetro de la turbina del reactor de 14 litros (0,074 m) se despejó N.

$$N = \frac{Q^{0,56} \left(\sqrt{\frac{P_g}{\alpha}} \right)}{P_0^2 \times D^3}$$

$$N = \frac{(9,667 \times 10^{-6} \frac{m^3}{seg})^{0,56} \left(\sqrt{\frac{0,92 \frac{kg \times m^2}{seg^3}}{1,224}} \right)}{(1,02 \frac{kg \times m^2}{seg^3})^2 \times 0,074^3}$$

$$N = 1,67 \text{ rps} \rightarrow N = 123 \text{ rpm}$$

De esta manera se calculó cuántas rpm se necesitan en el reactor de 14 litros para tener la misma potencia que en el reactor de 2 litros.

2.5 Diseño experimental y optimización de la producción de biomasa y PHB

Este trabajo de diseño experimental se realizó con el asesoramiento y colaboración de la Dra. Vanina Márquez, del Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL).

Para evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento sobre la producción de biomasa y PHB, se aplicó diseño experimental estadístico utilizando el programa Design Expert®. En primer lugar, se seleccionaron las variables independientes a estudiar y se definieron sus niveles de ensayo. Posteriormente, se determinó el diseño experimental más adecuado en función del número de variables y del objetivo planteado en cada caso (ensayos de *screening* u optimización de la producción de biomasa y/o PHB). Las variables y sus niveles fueron introducidos en el programa, el cual generó automáticamente la matriz experimental con las distintas combinaciones de factores a evaluar. De acuerdo con el número total de ensayos propuestos por el diseño, los experimentos se organizaron en uno o dos bloques experimentales con el fin de facilitar su ejecución y minimizar posibles variaciones externas. A modo de ejemplo, en la Tabla 2 se presenta la matriz experimental correspondiente al primer diseño de *screening* realizado.

Las distintas condiciones se prepararon en frascos Erlenmeyer de 100 ml adicionando los componentes indicados, se disolvieron en agua destilada y se llevaron a volumen final. Posteriormente, se ajustó el pH (con NaOH o HCl) y los medios se esterilizaron por calor húmedo a 121°C y 1 atmósfera de sobrepresión. En todos los experimentos los medios de cultivo se

inocularon con un cultivo saturado de *Ht* KHS3 en H1-2 0,5% p/v de glicerol como fuente de carbono a una DO₆₀₀ inicial de 0,02. Los cultivos se incubaron a la temperatura y agitación correspondientes para cada diseño experimental. En los tiempos establecidos, se determinaron DO₆₀₀, biomasa seca y contenido de PHB (como porcentaje de peso seco o estimación con hipoclorito de sodio), según correspondiera. Una vez colectados los resultados, se determinaron los efectos significativos de cada variable mediante el análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 2. Matriz del diseño Plackett-Burman. Se muestra la matriz generada por el programa al introducir las variables independientes y sus correspondientes niveles a estudiar. La primera columna muestra los 12 erlenmeyers/corridos con la concentración/condición de cada variable en cada uno de ellos.

Erlenmeyer	Glicerol g/l	Amonio g/l	NaCl g/l	Mg mM	Fosfatos	Fe μM	Volumen ml	pH	Tiempo h
1	20	0,5	30	0,5	1	3,7	100	6,5	7
2	50	3	30	0,5	-1	3,7	40	7,5	4
3	20	0,5	7,5	3	-1	3,7	100	7,5	4
4	50	3	7,5	0,5	-1	3,7	100	6,5	7
5	50	3	7,5	3	1	0,9	100	6,5	4
6	50	0,5	30	3	-1	0,9	100	7,5	7
7	20	0,5	7,5	0,5	-1	0,9	40	6,5	4
8	20	3	7,5	3	1	3,7	40	7,5	7
9	50	0,5	7,5	0,5	1	0,9	40	7,5	7
10	20	3	30	0,5	1	0,9	100	7,5	4
11	50	0,5	30	3	1	3,7	40	6,5	4
12	20	3	30	3	-1	0,9	40	6,5	7

Las matrices de cada uno de los diseños experimentales (*screening*, optimización y validación de la respuesta), junto con las variables evaluadas, las combinaciones específicas de dichas variables y los resultados obtenidos (DO₆₀₀, concentración de biomasa en g/l, concentración de polímero seco en g/l y porcentaje de acumulación de polímero estimado, según cada caso), se detallan en las Tablas A1 a A9 del Anexo.

En conjunto, se llevaron a cabo distintos análisis que se describen aquí en líneas generales y luego se desarrollan en forma detallada en la sección de Resultados. En el primer diseño experimental se llevó a cabo un estudio del efecto de diferentes variables independientes sobre la producción de biomasa y PHB. Para ello, se implementó un diseño de *screening* de Plackett-Burman, seguido de un diseño factorial fraccionado con el fin de analizar tanto el efecto principal de las variables

como sus posibles interacciones. Finalmente, las variables seleccionadas fueron optimizadas mediante un diseño central compuesto, cuya validez fue corroborada experimentalmente.

Finalizado ese estudio, se planteó un esquema de producción en dos etapas.

- **Primera etapa: Producción de biomasa.** Se analizó el efecto de las variables sobre la producción de biomasa mediante un diseño factorial fraccionado, se llevó a cabo la optimización utilizando un diseño central compuesto y, finalmente, se validaron experimentalmente las condiciones óptimas.
- **Segunda etapa: Acumulación de PHB.** Se estudió la influencia de las variables sobre la producción de PHB mediante un diseño factorial fraccionado. La optimización se realizó mediante un diseño Box-Behnken y posteriormente se validaron experimentalmente las condiciones óptimas.

2.6 Cuantificación de glicerol

La concentración de glicerol remanente en el medio de cultivo se determinó con el *kit* comercial TG color (GPO/APA AA) de laboratorios Wiener (*kit* enzimático para la determinación de triglicéridos en suero o plasma). Se basa en la conversión de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos mediante una lipoproteína lipasa. El glicerol se convierte mediante una serie de reacciones químicas en quinonimina roja, la cual se puede cuantificar por su absorción espectrofotométrica a 505 nm.

Para la curva de calibración se prepararon soluciones de glicerol comercial (Cicarelli) entre 0,003 y 0,005 % p/v. Para determinar el glicerol remanente en el medio de cultivo se colectaron muestras centrifugando el medio a 9700 x g por 10 minutos, y los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su utilización. Se hicieron las diluciones correspondientes en agua destilada para ajustar a la curva de calibración.

El procedimiento se adaptó a microplacas de 96 pocillos. Se colocaron 10 µl de muestra o de solución patrón según corresponda en cada pocillo y 200 µl del reactivo provisto por el *kit* diluido 1/3. Luego de incubar la placa durante 10 minutos a 37°C, se midió la absorbancia a 505 nm. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

2.7 Cuantificación de amonio

La concentración de amonio remanente en el medio de cultivo se determinó con el *kit* comercial Uremia de laboratorios Wiener. Este *kit* se utiliza para detectar urea en suero, plasma y orina. El amoníaco presente en la muestra reacciona con fenol e hipoclorito en medio alcalino produciendo

azul de indofenol que se determina colorimétricamente. De esta manera se puede cuantificar de manera indirecta el amonio presente en la muestra.

Para la curva de calibración se prepararon soluciones de sulfato de amonio entre 0,15 y 2,5 μM . Para determinar el amonio remanente en el medio de cultivo se colectaron muestras centrifugando el medio a 9700 x g por 10 minutos, y los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su utilización. Se hicieron las diluciones correspondientes en agua destilada para ajustar a la curva de calibración.

El procedimiento se adaptó a microplacas de 96 pocillos. Se colocaron 10 μl de muestra o solución patrón, según corresponda, en cada pocillo, 100 μl del reactivo A y 100 μl del reactivo B, ambos provistos por el *kit*. Luego de incubar la placa durante 10 minutos a 30°C , se midió la absorbancia a 540 nm. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

2.8 Caracterización del crecimiento

2.8.1 Densidad óptica, velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d)

Se siguió el crecimiento de *Ht KHS3* mediante la determinación de la DO_{600} en distintos tiempos. Se graficó el logaritmo natural (LN) de la DO_{600} vs. el tiempo (h). Se determinó la pendiente de la recta correspondiente a la fase de crecimiento exponencial, que representa la velocidad de crecimiento. El tiempo de duplicación se calculó como:

$$t_d = \frac{\text{LN } \text{DO}}{\mu} \quad (3)$$

2.8.2 Biomasa seca

El peso seco celular se determinó mediante la técnica gravimétrica. 20 ml de cultivo se centrifugaron a 7600 x g, a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el *pellet* celular se lavó tres veces con agua destilada. Los *pellets* de biomasa se secaron hasta peso constante en estufa a 105°C o por liofilización o en SpeedVac a temperatura ambiente. Se calcularon los gramos de biomasa producidos por litro de cultivo.

2.8.3 Biomasa residual

La biomasa residual corresponde a la fracción de biomasa celular excluyendo el polímero acumulado. Se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Biomasa}_{\text{residual}}(\text{g/l}) = \text{Biomasa}_{\text{total}}(\text{g/l}) - \text{PHB}_{\text{seco}}(\text{g/l}) \quad (4)$$

2.8.4 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC)

Para caracterizar el crecimiento de *Ht* KHS3 bajo determinadas condiciones, se determinó UFC/ml de cultivo aplicando un protocolo estandarizado y estricto para la preparación de las diluciones.

1. Se homogeneizó el cultivo durante 2 minutos en *shaker* a 300 rpm.
2. Se realizó una solución 1/10 con 90 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9%) y 10 ml de cultivo en frasco Erlenmeyer de 250 ml. La suspensión se homogeneizó en *shaker* durante 2 minutos a 300 rpm.
3. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas 1/10 en tubos de ensayo con 9 ml de solución fisiológica y 1 ml de la suspensión del cultivo. Luego de preparar cada dilución, se homogeneizó con *vórtex* a potencia máxima durante 30 segundos, con un *stop* a los 15 segundos para asegurar una mayor homogeneización de la mezcla.
4. Se sembraron 3 gotas de 10 µl de cada dilución en placas de LB-2 agar, por triplicado. Las placas se incubaron en estufa a 30°C por 48 h.
5. Se contaron las colonias y se calcularon las UFC/ml de cultivo teniendo en cuenta el volumen de las gotas y la dilución correspondiente.

$$UFC/ml = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \cdot \text{inversa de la dilución}}{\text{volumen sembrado (ml)}} \quad (5)$$

2.9 Determinación cualitativa de la acumulación de PHAs

2.9.1 Tinción con Nile blue A

Se utilizó el colorante Nile blue A (Sigma, N5632), y la tinción se realizó según la metodología descrita por Ostle y Holt (1982).

Para observación microscópica, las células se cosecharon a partir del cultivo por centrifugación a 2400 x g por 5 minutos y se resuspendieron en medio mínimo H1-2 sin fuente de carbono. Se colocó una gota de la suspensión bacteriana en un portaobjetos y se fijaron las células por calor. Se colocó una gota de una solución acuosa de Nile Blue A al 1% p/v sobre las células fijadas y se dejó actuar 10 minutos. Luego se lavó con agua destilada y etanol al 96% v/v para remover el exceso de colorante. Esta preparación se observó bajo el microscopio óptico de epifluorescencia Nikon EclipseTi E200 con el objetivo de inmersión 100X y un filtro de fluorescencia cromática con excitación D436/20 y emisión 620/20 nm.

Para observar el cultivo bajo lupa de fluorescencia, a 50 µl de una suspensión de células de DO₆₀₀ de 10 en agua destilada se le agregaron 50 µl de una solución 0,02% Nile Blue A. La suspensión resultante se observó en lupa (Leica 20 DFC 7000T) utilizando el filtro DSRed para excitación y

emisión. Se fotografiaron tubos de 1,5 ml con las muestras de cada cultivo con el software Leica Application Suite V4.

2.9.2 Tinción con Sudan Black

Se preparó una solución de Sudan Black al 0,25% p/v en alcohol 70% v/v (Burdon et al., 1941; Hartman, 1940). Se colocó una gota de la suspensión bacteriana en un portaobjetos y las células se fijaron por calor. Las células fijadas se cubrieron con una gota de la solución de Sudan Black durante 1 minuto. Luego se lavó con agua destilada y etanol al 96% v/v para remover el exceso de colorante. Esta preparación se observó bajo el microscopio óptico con el objetivo de inmersión 100X.

Para la tinción de colonias aisladas con Sudan Black, se preparó una solución al 0,3 % p/v. La solución se añadió a las placas con colonias aisladas y se incubó durante 30 minutos. Posteriormente, las placas se enjuagaron con etanol.

2.9.3 Preparación de muestras para observación por Microscopía Electrónica de Transmisión

Se cosecharon células mediante centrifugación a 2400 x g durante 10 minutos, con el fin de obtener un *pellet* aproximado de 50 µl de volumen. El *pellet* se lavó tres veces con *buffer* fosfato salino (PBS) y luego se fijó con glutaraldehído al 2,5% en PBS y se incubó durante 4 h en hielo. Las células se cosecharon nuevamente por centrifugación y se lavaron una vez con PBS, luego se resuspendieron en *buffer* fresco y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento y observación como se describe en Nygaard et al. (2019). El procesamiento de la muestra, observación y registro de imágenes fueron realizados en LANAIS-MIE, Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

2.10 Extracción de PHAs

2.10.1 Extracción con hipoclorito de sodio

La extracción del polímero por esta metodología se optimizó para cultivos de *Ht* KHS3, basándose en la técnica descrita por Williamson & Wilkinson et al. (1958). El método se basa en la resistencia del PHA al tratamiento con una solución alcalina de hipoclorito de sodio, mientras que el material celular se digiere completamente. El polímero puede recuperarse de la suspensión mediante centrifugación. Dado que la eficiencia del proceso depende de la concentración celular, el tratamiento con hipoclorito se realizó sobre muestras con DO₆₀₀ no mayores a 4 unidades; en caso de ser necesario, las muestras fueron previamente diluidas. A la muestra de cultivo a analizar se le adicionó solución de hipoclorito de sodio comercial (5,5% p/v) hasta alcanzar una concentración final de 1% p/v. Las muestras se incubaron 1 h a 37°C y, posteriormente, el polímero se recuperó por centrifugación a 9700 x g a 4°C por 10 minutos. El *pellet* de PHA se

lavó dos veces con agua destilada y una con etanol al 96%, y finalmente se secó en estufa a 65°C hasta peso constante.

2.10.2 Extracción con cloroformo

Esta técnica se basa en la solubilización del polímero en cloroformo y su posterior separación por precipitación o evaporación del solvente (Madkour et al., 2013). Se utilizó la técnica descrita por Ashby et al., 2005. La biomasa liofilizada se pesó y se colocó en cloroformo a una relación célula:cloroformo de 1:100 p/v. La mezcla se incubó a 30°C con agitación orbital a 200 rpm por 12 h. Posteriormente se filtró con papel Whatman n°1 en un equipo de filtración al vacío constituido por embudo de Büchner, kitasato y bomba de vacío. En el filtro quedan retenidos los restos de biomasa. La solución de PHA en cloroformo se vertió en una placa de Petri y el solvente se eliminó por evaporación bajo campana durante toda la noche.

2.10.3 Extracción con SDS

Para la extracción se resuspendió la biomasa liofilizada en una solución de SDS al 5% p/v a una relación detergente:célula de 2,5:1 p/p. La mezcla se incubó en baño térmico a 60°C durante 3 h. El polímero se cosechó por centrifugación a 9700 x g durante 10 minutos y se lavó cinco veces con agua destilada para la completa eliminación de los restos celulares y del detergente. Finalmente, el *pellet* se congeló a -20°C para su posterior liofilización.

2.10.4 Extracción con etanol

Se utilizó la técnica descrita en García et al., (2019). La biomasa húmeda se resuspendió en etanol 96% en una relación de 300 mg de biomasa:10 ml de etanol. Luego, se colocó en agitación magnética a 77°C durante 30 min. El polímero se cosechó por centrifugación a 11360 x g por 10 min. El *pellet* del polímero se resuspendió en una mezcla de etanol:acetona 1:1 v/v y se dejó 1 hora a temperatura ambiente. El polímero se cosechó por centrifugación a 11360 x g durante 10 minutos. Finalmente, el *pellet* se congeló a -20°C para su posterior liofilización.

2.11 Determinación cuantitativa de PHA

2.11.1 Estimación del porcentaje de PHA con hipoclorito de sodio

Para estimar el contenido de PHAs se adaptó la técnica con hipoclorito de sodio descrita en métodos de extracción (Williamson & Wilkinson, 1958). Dado que el hipoclorito de sodio digiere el material celular, con excepción del polímero, la turbidez resultante tras el tratamiento se correlaciona con la cantidad de PHA presente.

Se tomó una muestra del cultivo a evaluar y se cosecharon las células por centrifugación a 9700 x g a 4°C por 5 minutos. Se resuspendieron en medio mínimo H1-2 sin fuente de carbono a una

DO₆₀₀ de 2. Esta suspensión celular se dividió en dos fracciones: a una fracción se le adicionó hipoclorito de sodio 5,5% p/v hasta una concentración final de 1% p/v y a la otra fracción se le adicionó el equivalente en volumen de agua (control). Ambas muestras se incubaron en estufa a 37°C por 30 minutos y se midió su DO₆₀₀. El porcentaje de acumulación se estimó como:

$$\left(\frac{DO_{600} \text{ muestra con hipoclorito}}{DO_{600} \text{ muestra control}} \right) * 100 \quad (6)$$

Las estimaciones realizadas por este método mostraron una muy buena correlación con las determinaciones cuantitativas de peso seco y ácido crotónico (Redersdorff et al., 2023). Por su facilidad y rapidez, fue el método elegido para el seguimiento de la producción de PHAs a lo largo de las curvas de crecimiento.

2.11.2 Cuantificación de PHA por peso seco

El porcentaje de acumulación se calculó a partir de la relación entre la biomasa seca (g/l de cultivo) y la cantidad de PHB seco obtenido (g/l de cultivo).

$$\left(\frac{PHB \text{ seco } \left(\frac{g}{l} \right)}{Biomasa \text{ seca } \left(\frac{g}{l} \right)} \right) * 100 \quad (7)$$

2.11.3 Cuantificación por ácido crotónico

Se utilizó el método descrito por Slepecky & Law, 1960. Esta técnica se basa en la conversión cuantitativa de PHB a ácido crotónico mediante una hidrólisis en ácido sulfúrico. El ácido crotónico tiene un máximo de absorbancia en ultravioleta (UV) a 235 nm que permite su cuantificación. En esta tesis se adaptó la técnica a la cuantificación de PHB producido por *Ht* KHS3.

El estándar utilizado para construir la curva de calibración fue un PHB obtenido previamente disuelto en cloroformo a una concentración de 1 µg/µl. Para la curva de calibración se utilizaron entre 5 y 50 µg de polímero.

Para la digestión de las muestras a analizar se tomó una muestra de 0,5 ml de cultivo, se le adicionó 0,18 ml de hipoclorito de sodio comercial al 5,5% p/v y 0,32 ml de agua destilada (1% p/v de hipoclorito de sodio final). Las muestras se incubaron a 37°C por 1 h en estufa. El polímero se cosechó por centrifugación a 9700 x g por 10 minutos. Se hicieron dos lavados con agua destilada y un lavado con etanol al 96%, y el *pellet* se secó en estufa a 105°C durante 1 h 30 minutos. El polímero así obtenido se disolvió en 100 µl de cloroformo. Para determinar el contenido de PHB en estas muestras se colocaron entre 2 y 50 µl de la solución en tubos de vidrio.

Una vez transferidos el estándar y las muestras a tubos de ensayo, se dejó evaporar el cloroformo, se adicionaron 5 ml de $\text{H}_2\text{SO}_{4(c)}$ y se llevó a ebullición en baño húmedo (100°C) durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 235 nm en cubeta de cuarzo.

2.12 Caracterización del polímero

2.12.1 Resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN)

La estructura química del polímero producido por *Ht* KHS3 se determinó por ^1H -RMN. Se disolvieron 15 mg de la muestra en cloroformo deuterado (CDCl_3) para análisis de ^1H -RMN. Los espectros se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance II de 300 MHz utilizando CDCl_3 como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm empleando el pico residual del solvente como referencia (7,27 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se informan en Hertz (Hz). Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de RMN del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) - CCT Santa Fe.

2.12.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Se registraron espectros FTIR con modo de reflectancia total atenuada (ATR) (Nicolet 6700, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) en un rango de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 2 cm^{-1} . Esta caracterización se realizó en el Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (UNMDP –CONICET), Buenos Aires, Argentina, por el Dr. Gustavo Abraham y el Dr. Pablo Cortez Tornello.

2.12.3 Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico

Las propiedades térmicas de las muestras de PHB se determinaron mediante DSC y TGA. Las corridas de DSC se realizaron en un calorímetro DSC (Perkin Elmer Inc., Modelo Pyris 1) de -15 a 200°C y en modo frío hasta la temperatura inicial, a una velocidad de calentamiento/enfriamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ bajo atmósfera de nitrógeno. La señal registrada proporcionó la temperatura de fusión y la entalpía de fusión obtenida de la integración del pico de fusión endotérmico (ΔH_m), la temperatura de cristalización (T_c) y su correspondiente entalpía de cristalización (ΔH_c). El grado de cristalinidad se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$X_c (\%) = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_{m,th}} \right) * 100 \quad (8)$$

donde $\Delta H_{m,th}$ es el calor de fusión teórico para cristales de PHB puro con 100% de cristalinidad informado previamente por Barham et al. (1984) como 146 J/g .

Se realizaron 16 mediciones de TGA en un analizador termogravimétrico (instrumento TA, modelo Q-500, New Castle, DE, EE. UU.). Se calentaron muestras de 10 ± 1 mg a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ en el rango de temperatura de 20 a 700°C bajo purga de nitrógeno. Esta caracterización se realizó en el Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (UNMdP –CONICET), Buenos Aires, Argentina, por el Dr. Gustavo Abraham y el Dr. Pablo Cortez Tornello.

2.12.4 Caracterización del peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC)

El peso molecular es una característica muy importante ya que determina las propiedades físicoquímicas del polímero. Este depende mucho de las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas del microorganismo que lo produce (Bugnicourt et al., 2014).

Para la determinación de la distribución del peso molecular mediante GPC se utilizó un cromatógrafo (Waters) equipado con una bomba (Waters 515 HPLC pump), un detector de índice de refracción (Waters 2414) y un *set* de cuatro columnas PLGel® de $10\ \mu\text{m}$ con tamaños de poro de 10^6 , 10^5 , 10^4 y $500\ \text{\AA}$ a 25°C . Se prepararon soluciones de las muestras de 4-5 mg/ml en cloroformo de grado cromatográfico. Como no todas las muestras se disolvieron, incluso calentándolas a 45°C , se las dejó toda la noche y luego se las filtró con membrana de poliamida de $0,2\ \mu\text{m}$. Se eluyeron muestras de $200\ \mu\text{l}$ con un flujo de $1\ \text{ml}/\text{min}$. La curva de calibración se realizó con estándares de poliestireno (Polymer Laboratories Ltd., Reino Unido) con pesos moleculares de: $2,56 \times 10^6$; $8,42 \times 10^5$; $3,2 \times 10^5$; $1,48 \times 10^5$; 59.500; 28.500; 10.850; 930 y 580 Da. La distribución del peso molecular y los pesos moleculares promedio de las muestras se obtuvieron utilizando las constantes de Mark-Houwink de poliestireno y PHB en cloroformo a 25°C , $K_{\text{PS}}=4,9 \times 10^{-5}\ \text{dl/g}$, $K_{\text{PHB}}=1,18 \times 10^{-4}\ \text{dl/g}$, $\alpha_{\text{PS}}=0,794$ y $\alpha_{\text{PHB}}=0,78$. Se realizaron duplicados de cada muestra y se obtuvo la distribución de peso molecular de cada una empleando el software Empower Pro®. Estas determinaciones se llevaron a cabo en PLAPIQUI, CONICET, Bahía Blanca, Buenos Aires.

2.13 Generación y caracterización de una mutante por interrupción del gen *phaC1*

2.13.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Para la generación de la cepa mutante se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *Ht* KHS3, correspondiente a la cepa salvaje; *SF18*, mutante generada en este trabajo; y *E. coli* S17-1 λpir , empleada como cepa hospedadora del plásmido derivado de pSEVA212S y utilizada como dadora en los ensayos de conjugación con *Ht* KHS3, debido a la presencia de los genes *tra*, que codifican los factores necesarios para dicho proceso.

El plásmido pSEVA212S (SEVA: Standard European Vector Architecture) fue utilizado como vector suicida para generar la mutante por interrupción del gen *phaC*. El plásmido contiene un

origen de replicación R6K que es dependiente de la proteína λ pir, un origen de transferencia (OriT), un gen que le confiere resistencia a kanamicina (Km^R) y un sitio de múltiple clonado (SMC).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este capítulo. Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados con los sitios de restricción subrayados.

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción	Sitio de hibridación
nAR3F	5'- ACTG <u>CTGCAGC</u> CACTGGCTATTGTGGCAGCGC- 3'	PstI	nt 236-255 <i>phaC1</i>
nAR2R	5'- ACTAG <u>TGACCC</u> AGGAGATCAGGAACACCG- 3'	SalI	nt 847-867 <i>phaC1</i>
SF13F	5'- GTAAAACGACGGCCAGT- 3'	-	flanqueando SMC pSEVA212S
SF13R	5'- GCGGATAACAATTTACACAGG- 3'	-	flanqueando SMC pSEVA212S

2.13.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

E. coli se cultivó en LB: triptona (Difco) 1% p/v, YE (Difco) 0,5% p/v, NaCl (Baker) 0,5% p/v. Se incubó a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm.

Ht KHS3 o la mutante derivada se cultivaron en medio mínimo LB-2 o H1-2 descritos en la sección 2.2.1. Para los diferentes experimentos el medio se suplementó con 0,25% p/v YE, 1% p/v glucosa y 0,25% v/v, 1,5% v/v, 3% v/v o 4% v/v de glicerol.

Los cultivos líquidos fueron incubados a 28 °C con 200 rpm de agitación y los sólidos en estufa a 32 °C. Para la selección de las cepas conjugantes, se utilizó citrato de sodio (Biopack) 0,2 % p/v como fuente de carbono.

Para la selección de la inserción del plásmido se agregó al medio kanamicina (Km, Genbiotech) 50 µg/ml. Para medio sólido se suplementó con agar (Difco) 1,2% p/v.

2.13.3 Amplificación de un fragmento interno del gen que codifica PhaC1 (*locus tag* RO22_19245) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Un fragmento interno del gen que codifica para una de las proteínas PHA sintasa, PhaC1, se amplificó por PCR utilizando como molde ADN genómico purificado de la cepa salvaje y los cebadores nAR2 y nAR3 (Tabla 3).

La mezcla de reacción de PCR contenía: templado (ADN genómico diluido 1/50), Taq (PB-L Productos Bio-lógicos) 1,5 U, dNTPs (PB-L Productos Bio-lógicos) 0,5 mM, MgCl₂ (PB-L Productos Bio-lógicos) 3 mM, 0,4 µM de cada oligonucleótido (Tabla 3) y *buffer* 1X de reacción (PB-L Productos Bio-lógicos).

Los ciclos de PCR fueron: (95 °C, 2 min) x 1; (95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 50 s) x 29; (72 °C, 5 min) x 1, en el termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad). El producto fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa 1% m/v en *buffer* TBE 1X: Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, SigmaAldrich) 89 mM, ácido bórico (Genbiotech) 89 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, SigmaAldrich) 2 mM.

Para confirmar la inserción del plásmido recombinante se realizaron reacciones de PCR a partir de colonias aisladas, para ello se tomó una colonia con un palillo estéril y se suspendió en 50 µl de agua ultrapura. La suspensión se hirvió durante 15 minutos y la mezcla resultante se utilizó como templado (ADN molde) para la PCR.

2.13.4 Digestión enzimática de ADN y ligación

Tanto el producto de amplificación (previamente purificado con el *kit* comercial EasyPure Quick Gel Extraction Kit de Transgenbiotech) como el vector suicida pSEVA212S (obtenido con el *kit* comercial EasyPure Plasmid MiniPrep Kit) fueron digeridos con las enzimas PstI (Thermo Fisher) y SalI (Thermo Fisher). Las reacciones fueron realizadas en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los productos de la digestión fueron purificados nuevamente y se cuantificaron en gel de agarosa por comparación con marcadores de peso molecular de masa conocida.

El producto de amplificación y el vector digeridos se ligaron con T4 ADN ligasa (Promega) empleando una relación 3:1 inserto:vector en *buffer* provisto por el fabricante en un volumen final de 20 µl. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. Luego se incubó 2 h a temperatura ambiente y se inactivó la ligasa a 70°C 10 min.

2.13.5 Preparación de células electrocompetentes, electroporación y análisis

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* S17 λ pir, 25 ml de LB líquido se inocularon al 1% v/v con un cultivo saturado y se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm durante 2 o 3 h, hasta una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Luego el cultivo se incubó 1 h en baño de hielo. Las células se cosecharon a 1900 x g durante 15 minutos y se resuspendieron en agua ultrapura,

estéril y fría. Este paso se repitió dos veces. En el último lavado, el *pellet* de células se resuspendió en 150 µl de glicerol estéril y frío al 10% v/v.

Se colocaron 50 µl de células electrocompetentes más 2 µl de la mezcla de ligación en una cubeta de electroporación estéril. Se le dio un pulso de electricidad (Ec_2) en electroporador Biorad, inmediatamente se adicionó 1 ml de LB frío y luego se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, las células transformadas se seleccionaron en placas de LB agar con kanamicina. Se analizaron las colonias crecidas en antibiótico a partir de PCR de colonia con los oligonucleótidos nAR3 y SF13F, nAR2 y SF13R (Tabla 3). El plásmido recombinante se purificó a partir de transformantes candidatas utilizando un *kit* comercial y se envió a secuenciar para confirmar la presencia del inserto. La construcción obtenida se denominó pAR1.

2.13.6 Conjugación en *Halomonas titanicae* KHS3

Para interrumpir el gen *phaC1* en *Halomonas* se realizó una conjugación biparental con *E. coli* S17 λ pir transformada con pAR1 (cepa dadora) y *Ht* KHS3 (cepa aceptora). La conjugación se realizó por estría directa. Para ello se obtuvieron colonias aisladas de ambas cepas en placas de agar LB-2 y LB, respectivamente. Luego, se prepararon placas de Petri con medio agar H1-2 0,2 % p/v citrato de sodio como fuente de carbono y con kanamicina (50 µg/ml). Se dividió la placa en tres partes y se realizaron estrías de: 1) la cepa dadora sola, 2) la cepa aceptora sola y 3) de la cepa aceptora sobre la cepa dadora, en la misma placa (Figura 6). La placa se incubó en estufa a 32°C durante 48-72 h.

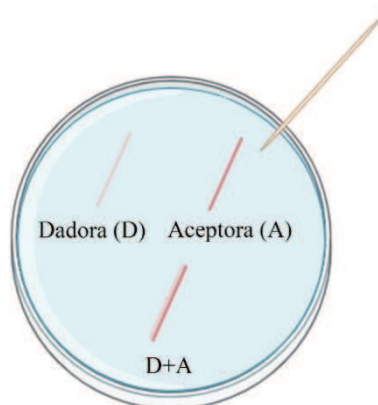


Figura 6. Conjugación por superposición de estrías. Esquema representativo de la placa de Petri con medio H1-2 suplementado con 0,2% p/v de citrato de sodio y kanamicina. Se observan las estrías correspondientes a la cepa dadora y a la aceptora. Solo se espera crecimiento en las zonas donde ambas cepas entran en contacto, ya que únicamente los conjugantes son capaces de crecer en presencia de citrato y kanamicina.

E. coli es incapaz de crecer utilizando citrato como fuente de carbono, mientras que *Ht* KHS3 es capaz de desarrollarse en esas condiciones. Por lo tanto, las bacterias que crecieron en la estría de conjugación representan células de *Ht* KHS3 que integraron en su cromosoma, por recombinación

homóloga, el plásmido que les otorgó resistencia al antibiótico. A partir de esa estría se realizaron sucesivos repiques empleando el mismo medio de selección para obtener colonias aisladas. Finalmente, en las bacterias obtenidas se confirmó la presencia de secuencias provenientes del plásmido por PCR de colonia empleando cebadores específicos.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación y análisis de genes involucrados en la biosíntesis de PHA

En el laboratorio se cuenta con la secuencia genómica de *Halomonas titanicae* KHS3 (Gaspertotti et al., 2015), lo que permitió realizar una búsqueda de genes potencialmente involucrados en la síntesis de PHA. Como resultado, se identificaron homólogos de 11 genes que codifican enzimas asociadas a la ruta biosintética de PHB (Tabla 4). Entre ellos, se encuentran genes que codifican para β -cetotilasa (gen *phaA*), para acetoacetyl-CoA-reductasa (gen *phaB*), dos genes para sintasas de PHA (*phaC1* y *phaC2*), tres genes que codificarían posibles fasinas (*phaP1*, *phaP2* y *phaP3*), un regulador de la síntesis de PHA (gen *phaR*), y tres genes para posibles depolimerasas (*phaZ1*, *phaZ2* y *phaZ3*) posiblemente involucrados en la degradación del polímero.

Tabla 4. Genes que codifican proteínas potencialmente involucradas en el metabolismo de PHA de *Ht* KHS3. Se muestra el número de *locus tag* de los genes que codifican las proteínas según la base de datos IMG.

Proteína	Gen	Locus tag IMG	Masa molecular predicha (kDa)	Péptido señal	Motivo <i>lipase box</i>
Acetil-coA transferasa	<i>phaA</i>	RO22_23520	41	No	N/A
3-oxoacil [ACP] reductasa	<i>phaB</i>	RO22_05450	27	No	N/A
Polihidroxialcanoato sintasa	<i>phaC1</i>	RO22_19245	69	No	SYCVGG
	<i>phaC2</i>	RO22_11910	65	No	GYCLGG
Polihidroxialcanoato depolimerasa	<i>phaZ1</i>	RO22_00820	39	Si	GVSSGG
	<i>phaZ2</i>	RO22_22835	32	No	GMSSGG
	<i>phaZ3</i>	RO22_13815	94	No	GNCQAG
Fasinas	<i>phaP1</i>	RO22_19240	16	No	N/A
	<i>phaP2</i>	RO22_13410	14	No	
	<i>phaP3</i>	RO22_16760	13	No	
Regulador de la síntesis de PHA	<i>phaR</i>	RO22_08880	20	No	N/A

Esta primera búsqueda reveló que los genes analizados se encuentran distribuidos en diferentes regiones del genoma de *Ht* KHS3 (Figura 7B). Una excepción es el caso de los genes *phaC1* y *phaP1*, que se localizan adyacentes, formando un posible operón. En la cepa *Halomonas* TD01, se describió una organización génica muy similar a la observada en *Ht* KHS3 con *phaC1* y *phaP1* como únicos genes adyacentes entre sí. Sin embargo, en *Halomonas* TD01 se identificó una secuencia promotora independiente para *phaC1*, lo que sugiere una regulación separada de estos genes vecinos (Cai et al., 2011). De manera análoga, el análisis de posibles secuencias promotoras en *Ht* KHS3 también indica que *phaP1* y *phaC1* estarían bajo el control de promotores independientes (Figura 7C). Esta organización génica contrasta con la observada en otras cepas

acumuladoras de PHA, que suelen presentar los genes del metabolismo de PHA asociados en grupos o *clusters*, como ocurre en *C. necator* (Figura 7A) (Rehm, 2003). En cambio, la distribución dispersa de los genes de la síntesis de PHA parece ser una característica común dentro del género *Halomonas*, dado que se ha reportado un patrón similar en otras cepas del mismo género (Cai et al., 2011). Luego de este análisis preliminar, se realizó una caracterización más detallada de la secuencia de las proteínas involucradas en la ruta biosintética del PHB.

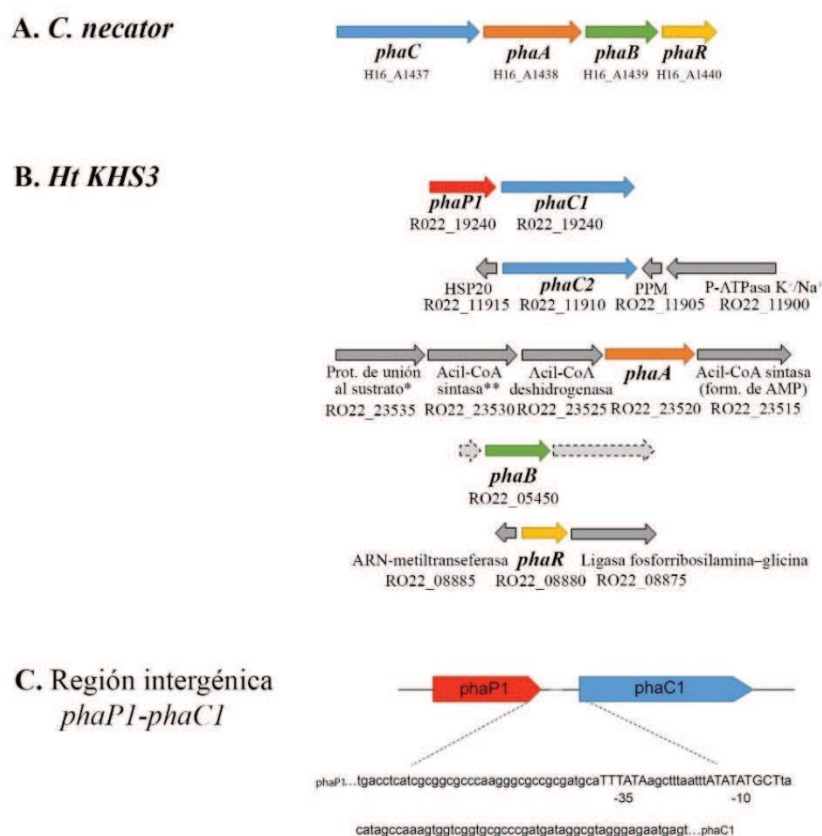


Figura 7. Representación esquemática de los genes relacionados con PHA. A. Organización génica del clúster *phaCAB* de *C. necator*, donde los genes *phaC*, *phaA*, *phaB* y *phaR* se encuentran agrupados en un mismo operón. B. Organización de los genes asociados al metabolismo de PHA en *Ht KHS3*. Solo *phaP1* y *phaC1* se encuentran adyacentes entre sí en el genoma. Se muestran los demás genes involucrados en el metabolismo de PHA (flechas en color) y los genes adyacentes. Los *locus tag* están indicados debajo del nombre de cada gen; las flechas en gris oscuro indican genes no directamente relacionados con el metabolismo de PHA; las flechas en gris claro con bordes de línea discontinua indican proteínas hipotéticas. La anotación fue tomada tal como aparece en el servidor IMG. C. Secuencia de la región intergénica entre *phaP1* y *phaC1* de *Ht KHS3* (118 pb) mostrando las cajas promotoras predichas -35 y -10 (letras en mayúsculas) según el análisis BPROM (Softberry, Solovyev et al., 2011). HSP20: proteína de choque térmico. PPM: proteína putativa de membrana. P-ATPasa K⁺/Na⁺: ATPasa tipo P de flujo de potasio/sodio. *Prot. De unión al sustrato: proteína de unión al sustrato del sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada. **Acil-CoA sintasa de ácidos grasos.

3.1.1 PHA sintasas

Las PHA sintasas son las enzimas clave en la biosíntesis del polímero, ya que catalizan la incorporación de los monómeros a la cadena en crecimiento. En función de su estructura primaria, especificidad de sustrato y composición de subunidades, estas enzimas se clasifican en 4 clases

principales. Las sintasas de clase I y II están formadas por un solo tipo de subunidad (PhaC), con masas moleculares entre 61 kDa y 73 kDa. Las sintasas de clase I, como en *C. necator*, polimerizan monómeros de cadena corta (3-5 átomos de carbono), mientras que las de clase II, como en *P. aeruginosa*, incorporan monómeros de cadena media (6-14 átomos de carbono). Las sintasas de clase III, presentes por ejemplo en *Allochromatium vinosum*, están compuestas por dos subunidades distintas: PhaC, de aproximadamente 40 kDa, con un 21–28% de similitud en su secuencia respecto a las sintasas de clase I y II, y PhaE, también alrededor de 40 kDa, pero sin similitud con otras PHA sintasas. Finalmente, las sintasas de clase IV, como las de *Bacillus megaterium*, se asemejan a las de clase III, pero la subunidad PhaE es reemplazada por PhaR de aproximadamente 20 kDa. Tanto las sintasas de clase III como las de clase IV sintetizan preferentemente PHA de cadena corta. Los múltiples alineamientos de sus estructuras primarias revelan la presencia del motivo *lipase box* (consenso GX[S/C]XG), en el que el residuo de serina típico de las lipasas está reemplazado por una cisteína. Además, el análisis estructural evidencia la presencia de un dominio de α/β -hidrolasa en la región C-terminal. El residuo Cys-319 del motivo *lipase box*, junto con la histidina conservada His-508 y el Asp-480, presumiblemente conforman la tríada catalítica, altamente conservada en todas las PHA sintasas y esencial para su actividad enzimática.

Se comparó la secuencia polipeptídica de las dos presuntas sintasas identificadas en el genoma de *Ht* KHS3 con las de sintasas bien caracterizadas de *C. necator*, *A. vinelandii* y *Halomonas* TD01. El alineamiento de secuencias muestra que, a pesar de las diferencias en identidad entre las sintasas de diferentes especies (Tabla 5), tanto el motivo *lipase box* como la tríada catalítica se encuentran altamente conservados (Figura 8). Cabe destacar que la sintasa PhaC2 de *Halomonas* sp. TD01 no fue incluida en el alineamiento mostrado en la Figura 8 debido a su baja identidad con el resto de las sintasas analizadas. El motivo clásico tipo *lipase box* GxCxGG está conservado en ambas sintasas de *C. necator*, en PhaC2 de *Ht* KHS3 y en la sintasa de *A. vinelandii*. En cambio, PhaC1 de *Ht* KHS3 y de *Halomonas* TD01 presentan una variante del motivo, SxCxGG, en la cual la primera glicina es reemplazada por una serina, sustitución previamente reportada por Cai et al. (2011). Por su parte, PhaC2 de *Halomonas* TD01 conserva el motivo *lipase box* con una variante adicional (GxCxAG), donde la segunda glicina del motivo clásico está reemplazada por una alanina; esta sintasa presenta además un mayor tamaño (~92 kDa) y baja identidad con las sintasas de clase I (Cai et al., 2011). En el alineamiento se identificaron los tres residuos correspondientes a la tríada catalítica, cisteína, aspartato e histidina, conservados en todas las sintasas analizadas. La cisteína se localiza dentro del motivo *lipase box*, mientras que los residuos correspondientes a aspartato e histidina se identifican en regiones conservadas de la secuencia.

PhaC2 Ht KHS3	PDAKPCIAPLPQDRFRDPAWRYFPY-NLLYQGFLQQQWWHNAITGPRGLSPHHEQAVE	133
PhaC2 <i>C. necator</i>	PTAAEPFSDLSQDRFADAGWDWPY-RCWRDAFMRNEAFWESLTQDIDGLSRHHQHIVA	146
PhaC1 Ht KHS3	EQITPLITPAKSDRRFKDEAWTQNPHYMAIMQOYLLFSQMVEELVENLSGLDETKQRNLM	150
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	EQVTPLVTPAKGDRRFKDEAWTQEPYLAIMQOYLLFSQMVEELLESDDLDPQQRNLA	157
PhaC1 <i>C. necator</i>	EGKAEA-TGPLHRRFAGDAWRNLPYRFAAAFYLLNARALTELADAV-EADAKTRQRIR	145
PhaC <i>A. vinelandii</i>	--LSRK-PFSFTDKRFASDNWSSPLF-GSLAAYYLLNSRYMMELEELKIEDEKPRQRLY	126
	::* . *	:: . . :
PhaC2 Ht KHS3	FGARQWLDFVSPSNFLNTPTVLKKTTFESAGNLIQGLQHYCEDIQNHYLKG---RSAG	189
PhaC2 <i>C. necator</i>	FCARQWLDDLAPGNVWMMNPTIARTASSTFGANFLQGAHHWLQDASELLSKVPGLPAGRP	206
PhaC1 Ht KHS3	FYARQLVNAMAPTNTFITTPNEVMRRITETRGQNLVDGLARLRDLGNSGEGINV--RMTD	208
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	FYARQLVSAMSPTNFVSTNPEVMRCTLTRGQNLVDGLRLREDLANSAEGINV--RMTD	215
PhaC1 <i>C. necator</i>	FAISQWVDAMSANFLATNPEAQRLLIESGGESLRAGVRNMEDLTRG----KI--SQTD	199
PhaC <i>A. vinelandii</i>	YLVEQALAAASAPSNFASNPDALEALVKSNGVSLFNGMLHLASDLKEG---KL--RQCD	180
	: * : : * * . ** . . : * . : * . . * .	
PhaC2 Ht KHS3	AEKYVVGKNVAITPGKVIYRNHLVELIQYTPTT--EEVHAAPMLIVPAWIMKYIYLDLSP	247
PhaC2 <i>C. necator</i>	AEFLPGRDVARTPGKVVFERNALIELIYAPALGANTVWREPVLIVPSWIMRYIYLDLKP	266
PhaC1 Ht KHS3	RAAFGVGENIAVTPGSVVYENELIQIYPTT--EKTFTKTPLLMVPWPINKYIYLDLRE	266
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	RSAGVGVDNIATVPGAVVYENELIQIYPTT--EKTFTKTPLLIVPWPINKYIYLDLRE	273
PhaC1 <i>C. necator</i>	ESAFEVGRNVAVTEGAVVFENEYFQLLYQKPLT--DKVHARPLLMVPPCINKYIYLDLQ	257
PhaC <i>A. vinelandii</i>	SGDFQVGRDVATTPGDIVFENELFQLIYRPLS--EKQYQRPLIVPPSINKYIYLDLQ	238
	: * : : : * * . : * : * . : * : * : * : * : *	
PhaC2 Ht KHS3	HNSLVRYLVDHGHTVFMISWRNPTSEDCDIGMDDYRQQGIMASLDIEHLFPSQKIHAVG	307
PhaC2 <i>C. necator</i>	EDSLVRYLVESGHTVFMISWKNPDASARDFGLDYLEAGLLTAINTVHARCDGAHVHAA	326
PhaC1 Ht KHS3	DNSMVKWLVDQGHITVFLISWRNPGEQDVTWADYMQGPISAEIAEQAGCKSVNLLS	326
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	DNSLVKWMVDQGHITVFLISWRNPGEQDITWADYMQGPISAMEAEQAGCKSVNLLS	333
PhaC1 <i>C. necator</i>	ESSLVRHVVEQGHITVFLVSWRNPDSMAGSTWDDYIEHAAIRAEVARDISGQDKINVLG	317
PhaC <i>A. vinelandii</i>	ENSLVRYALEQGHQVFLVSWRNFDSACAGKTWDFIQDAAIKAVTRAISGGQPLNCVG	298
	..*:* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PhaC2 Ht KHS3	YCLGGTLLAITASAMARNS-DNRLASMTLFAAQTDFREAGELMLFIDEKQLAFLEDLMWA	366
PhaC2 <i>C. necator</i>	YCLGGTLLATGAAMLARDAAGGPLASMTLFASETDFHDPGELGLFDKSSLATLDALMWS	386
PhaC1 Ht KHS3	YCVGGTLLTASTVAYLTSTRRGKVKSVTYMATLQDFRDPGDIQVFLNERVVEGIEQLEA	386
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	YCVGGTLLTASTVAYLTSTRRGKVKSVTYMATLQDFRDPGDIQVFLNERVVEGIENTLEM	393
PhaC1 <i>C. necator</i>	FCVGGTIVSTALAVLAARGEHP-AASVTLLTLLDFADTGILDFVDEGHVQLREATLGG	376
PhaC <i>A. vinelandii</i>	FCVGGTLLTALAVLEAQGSKDHISSLTLLATFLDYSDTGIVNVFVDEQFVTQRETTIGG	358
	:*:**: : : * * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PhaC2 Ht KHS3	-----QGILDTKQMSGVFQILRSNDLIWSRVVNEYLLGTRQPIINDLLAWNADATRMPIYM	421
PhaC2 <i>C. necator</i>	-----QGYLDGPQMKSAFQMLNAQDLIWSRVVNEYLLGQRLRANDLVSWNRDITRLPYRL	441
PhaC1 Ht KHS3	-----KGYLDGRSMAYTFNLLRENDLFWSFYINNYLKGETPAAFDLYWNTDGTNLTAGT	441
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	-----KGYLDGRSMAYTFNLLRENDLFWSFYINNYLKGEIPAAFDLYWNTDGTNLTAGT	448
PhaC1 <i>C. necator</i>	GAGAPCALLRGLELANTFSFLRPNDLVNYYVDNYLKGNTVPVFDLLFWNGDATNLPGPW	436
PhaC <i>A. vinelandii</i>	-KGPPVGLFRGQDMGNTFSLLRPNELWNNYTVDKYLKGQKPRTLDMLEFWNNDSNLPGPM	417
	* : . : * * . : * * . : * * * : * : * * . :	
PhaC2 Ht KHS3	HSEYLRNLFNLNDLA-EGRLRVDGRPIALSDIPIFCVGTEDHVPWRSTYRLHLI-A	479
PhaC2 <i>C. necator</i>	HSECLHKLFLGNELA-TGKLCVGGQPVALSDDLPLFVVGTEHVPWRSTYRLHLI-T	499
PhaC1 Ht KHS3	HAWYLRHMYLENLRVPEGGIELDGVKIDLRKVSAPSYFISTKEDHIAKWNSTYYGALLPK	501
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	HAWYLRHMYLENLRVPEGGIELDGVKIDLRKISAPCYFVSTKEDHIAKWNSTYYGALLPK	508
PhaC1 <i>C. necator</i>	YCWLRYHTYLQNELKVPGLTVCVGPVLDASIDVPTIYGSREDHIVPWTAAAYSTALLA	496
PhaC <i>A. vinelandii</i>	YCWLRYHTYLQNDLK-SGDLECCGVRLDLSKIKAPTYLLGTQDDHIVPWSAYNTSNLLS	476
	: * : : * * * : : : : * : : * : * : * : *	
PhaC2 Ht KHS3	DAPEITFLTSGGHNAGIISPPEQSHRRHYRVATAFEGDSYIDPDTWLKRTAIPKGSWWAA	539
PhaC2 <i>C. necator</i>	K-AELTFLTSGGHNAGIVSEPGHPGRRYHVHTRLPAPPYLSPEQFLNVAVYRDGSSWWPA	558
PhaC1 Ht KHS3	GP--VTFVLGGSGHAGIVNPPHKNKYSYWTNDTLPE----SHEEWLASATAQEGSSWWPH	555
PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	GP--VTFVLGGSGHAGIVNPPHKNKYGYWTNDALPE----THDAWQEGSTFNEGSSWWPH	562
PhaC1 <i>C. necator</i>	NK--LRFVLGASCHTAGVINPPAKNKRSHWTNDALPE----SPQQWLAGAIEHHGSSWWPD	550
PhaC <i>A. vinelandii</i>	GK--IRFVLGASCHTAGVINPPAQNKRYHTNEQTPA----DPDIWMTAEKKPGSSWWND	530
	: . . * * : . : : . : : : : . * * * *	

Figura 8. Comparación de PHA sintasas de *Ht KHS3* con sintasas de otros microorganismos. Se alinearon las dos sintasas de *Ht KHS3* con las sintasas de *C. necator*, *Halomonas* TD01 y *A. vinelandii*. En rojo se muestra el motivo *lipase box* conservado en todas las especies. Los aminoácidos componentes de la triada catalítica se indican con el recuadro azul.

Los genes de PHA sintasas de *Ht KHS3* corresponden a los *locus tag* RO22_19245 y RO22_11910. El gen *phaC1* (RO22_19245) se encuentra adyacente a un gen que codifica una posible fasina (RO22_19240). Ambas enzimas han sido clasificadas, por la base de datos IMG, como sintasas de clase I. El alineamiento entre ambas sintasas de *Ht KHS3* reveló un 35,59% de identidad (Tabla 5), lo que representa un nivel moderado de similitud, y sugiere que podrían haber divergido funcionalmente, posiblemente procesando diferentes sustratos o actuando en condiciones celulares distintas. En contraste, PhaC1 de *Ht KHS3* mostró una alta identidad

(85,67%) con PhaC1 de la cepa *Halomonas* TD01, lo que indica una fuerte conservación evolutiva y que ambas enzimas probablemente sintetizan el mismo tipo de polímero. Además, esta enzima presentó una identidad moderada con la sintasa de *A. vinelandii* (38,57%) y con PhaC1 de *C. necator* (42,75%). En cuanto a PhaC2 de *Ht* KHS3, el análisis de identidad mostró una similitud moderada solo con PhaC2 de *C. necator* (47%), lo que podría indicar cierta conservación funcional entre ambas enzimas. Sin embargo, presentó valores de identidad más bajos con las demás sintasas.

Tabla 5. Identidad entre las enzimas PhaC1 y PhaC2 de *Ht* KHS3 y otras sintasas caracterizadas. Se muestra el porcentaje de identidad entre sintasas al alinear las dos de *Ht* KHS3 con las ya estudiadas sintasas de *C. necator*, HTD01, *Chromobacterium* y *A. vinelandii*.

	PhaC1 <i>Ht</i> KHS3	PhaC2 <i>Ht</i> KHS3	PhaC1 <i>Halomonas</i> TD01	PhaC2 <i>Halomonas</i> TD01	PhaC1 <i>C. necátor</i>	PhaC2 <i>C. necátor</i>	PhaC <i>A. vinelandii</i>
PhaC1 <i>Ht</i> KHS3	100%	35,59%	85,67%	20,63%	42,75%	31,07%	38,57%
PhaC2 <i>Ht</i> KHS3	35,59%	100%	36,75%	36,33%	32,85%	47,06%	31,03%

3.1.2 Depolimerasas

Los PHAs pueden ser catabolizados por depolimerasas intracelulares o extracelulares. Las depolimerasas intracelulares hidrolizan gránulos nativos de PHA que contienen el polímero en su estado amorfo, y su actividad se induce cuando las bacterias requieren carbono y disponen de otros nutrientes esenciales. Los monómeros y la energía liberados durante esta degradación pueden reutilizarse para sustentar el crecimiento celular (Jendrosseck & Handrick, 2002; York et al., 2003). Por su parte, las depolimerasas extracelulares son secretadas al medio por las bacterias para degradar gránulos de PHA liberados tras la muerte celular, los cuales presentan polímero desnaturalizado y parcialmente cristalino. Generalmente, estas enzimas extracelulares poseen un péptido señal en el extremo N-terminal de 25 a 38 aminoácidos. Ambos tipos de depolimerasas poseen un dominio catalítico con motivo *lipase box* (consenso GxSxGG) (York et al., 2003).

En un análisis preliminar del genoma de *Ht* KHS3, se identificaron dos genes con potencial para codificar depolimerasas. Estos genes se alinearon mediante Clustal Omega con depolimerasas ya bien estudiadas de *C. necator*, de *Halomonas* TD01 y de *A. vinelandii*. El alineamiento muestra que, a pesar de la baja identidad de secuencia en general, el motivo *lipase box* y la tríada catalítica (S, D, H) se encuentran conservados en todos los genes analizados (Figura 9). La proteína PhaZ1 codificada por el gen *phaZ1 locus tag* RO22_0820 en *Ht* KHS3 y anotada en la base de datos IMG como proteína hipotética con péptido señal, presenta un 70% de similitud con la depolimerasa extracelular de *Halomonas* TD01 (gen *phaZ3, locus tag* GME_09851), lo que sugiere que corresponde a una depolimerasa extracelular. Por otro lado, la depolimerasa PhaZ2

codificada por el gen RO22_22835 y anotada como depolimerasa de PHA, carece de péptido señal, por lo que podría tratarse de una depolimerasa intracelular, y muestra un 86% de similitud con la depolimerasa intracelular de *Halomonas* TD01 (gen *phaZ2*, locus tag GME 16832).

PhaZ1 Ht KHS3	-----MTSTPSSNIHSLAQALVCLGLCTPLLAQAETDSEPEDLPAL-----	41
PhaZ3 Halomonas TD01	-----MRSAA-ETCTLEAALL-----GSAAVHAEADVPDLPAL-----	37
PhaZ Avin 34810	LRDWGLTVAADRHGFIIVAPSVSGYDELAPNCWGFWDGQ-RHEGRGEADLLRIAQAV	132
PhaZ2 Ht KHS3	DRSGGWSTLADESGIALLYPKQRKT--NNPISSFNWFKSGD-SRRGGGEPLSIRHMIKQV	110
PhaZ2 Halomonas TD01	DLGSGWSALADECGIALLYPEQRQS--NNPISSFNWFKSGD-SRRGEGEPLSIRHMIKQV	111
PhaZ1 Halomonas TD01	AAGTNMNQVAEVQQFCVLYPAQPVS--ANNSKCNWFKAEQ-QQRDGGEPSSILAGMTRQI	190
PhaZ Avin_33500	AAGTRMNEFAEKEPCLVLYPAQSTA--ANCSKCNWFWNPSPD-QCADQGEPSSILAGMTRDV	233
* : : :		
PhaZ1 Ht KHS3	----SAASEQASVVGVSSGGYMATQLAVAWPERFSGLGVLAAFPWSCAQGSLSLALNQCM	97
PhaZ3 Halomonas TD01	----SAASDRASVVGVSSGGYMAQLAVAWPERFSGVGVLAAGPWSCAQGALSLSLQCM	93
PhaZ Avin 34810	EARYRTDPARRYIAGISSGGAMSVAIAHNEYWAAAAVAGLPYGEEARAVSSA--ACP	190
PhaZ2 Ht KHS3	VDDHAIDSTRVFVTGVSSGGAMTSVMLATYPEVFAGGAILAGLPYRSADNLIEAM--VRM	168
PhaZ2 Halomonas TD01	VDDHEIDPGRVFITGVSSGGAMTSVMLATYPEVFAGGAILAGLPYRSADNLMEAV--VRM	169
PhaZ1 Halomonas TD01	IDTHGLDASRVYVAGISAGAAAMATTLMATYDPLFAAVGVHSGLPHGVAKSLPDAL--GAM	248
PhaZ Avin_33500	AACYKVDPRRIYVAGISAGAMATTMAMTYDPLFAAAGIHSGLPHAAAHDLPSAF--AAM	291
: : * : * : : : : * :		
PhaZ1 Ht KHS3	MTRRGA--PSLDELEARRQRYIELEQVSGSTEALSQRLAYLWHGEEDEVVEPQLGDLLAEQ	155
PhaZ3 Halomonas TD01	STRRGL--PSLDELDRRRERYESLEQVGERDALSQRLAYVWHGDEDDTVSPELGSLLAEQ	151
PhaZ Avin 34810	LSNASL--HGVERVVADM-----RAELDDPYPIPLLVIQNDNDCTVVAGAGRRRLDA	240
PhaZ2 Ht KHS3	KGYGGPSDHRDLALVR-G-----ASTFDGPW-PTISVWHGGSDSTVDNANADSIVRQ	218
PhaZ2 Halomonas TD01	KGFGGPSDSKLDLVR-G-----ASTFDGPW-PTISVWHGGSDATVDHNSNADSIVRQ	219
PhaZ1 Halomonas TD01	QGGTGPLGNSGKKP-G-T-----E--WASE--VPAILFHGDDEATVHPNNADRVAQA	294
PhaZ Avin_33500	QQGAKCAGRQTTSV-G-N-----NRAPARP--VPIIVFHGDDEATVHPNGNDQVIAQ	339
: : * * : :		
PhaZ1 Ht KHS3	WQQWLASPDQLRVAR-----	170
PhaZ3 Halomonas TD01	WQRWLASSEQLRFVR-----	166
PhaZ Avin 34810	HLKAF--GSAPFDTTTPAGTLAVQRRCPVFGDDDYGCRHEIHTADGNSASRSLVETLYYQ	297
PhaZ2 Ht KHS3	WQQIHKVEG-----PP-----TRVE--QVAGFP-RQVWC----NADRQEVIEEYI--	256
PhaZ2 Halomonas TD01	WQKVHKVEG-----PP-----TRVE--EVDGFP-RQVWS----NPDKREVIEEYI--	257
PhaZ1 Halomonas TD01	YDASRP-----AGGANKPTVEKGKAA--NGHAYT-RTTHH----DAAGKPCLEQWK--	338
PhaZ Avin_33500	FSPTASHPAAPKPTGANPSAKVERGQVP--NGHAYT-RTVYR----HPSGSPHVEQWT--	390
* * : : :		
PhaZ1 Ht KHS3	-----SENAGHGWPRIPLPSEAAPGPQEWGDCRQGGGSFLLSCDDDIAGEMLDWLY-	220
PhaZ3 HTD01	-----SENTCHGWPIKLPKQANASPQTFGGCRQGGGSHVLACDENVAGDMLSWLY-	216
PhaZ Avin 34810	GPLETPAENDIDRCHYWGGEHG-----REGPYALRPGSPHPDILWYFFAR	343
PhaZ2 Ht KHS3	-----IEGMCHGTPIMAGGDEGLG-----EADKYMLEVGISSTRHIAHFWGL	298
PhaZ2 HTD01	-----IEGMCHGTPIMTDGEGLG-----EEDKYMLEVGISSTRHIAHFWGL	299
PhaZ1 HTD01	-----IHGAGHAWSGGS-----ARGSYTDPKGPDATQEMLRFFMQ	373
PhaZ Avin_33500	-----IHGAGHAWSGGS-----THGSYTDPRGPDATKEMLRFFLA	425
* * : : :		

Figura 9. Comparación de las depolimerasas PhaZ de *Ht KHS3* con las de otros microorganismos. Se alinearon dos de las potenciales PhaZ de *Ht KHS3* con las de *Halomonas* TD01 y de *A. vinelandii*. En rojo se muestra el motivo *lipase box* y el recuadro azul indica la tríada catalítica conservada en todas las especies. El péptido señal identificado según la base de datos IMG se resalta en rosa.

En *A. vinelandii* se describió una depolimerasa asociada al gránulo de PHB, de aproximadamente 101 kDa, denominada PhbZ1 (locus tag AVIN_03910), que, a diferencia de las depolimerasas descritas anteriormente, presenta el motivo *lipase box* GxCxAG, cuya cisteína central forma parte de la tríada catalítica (C-D-H). Esta proteína muestra un 48 % de identidad con una proteína no caracterizada anotada como sintasa de PHA en *C. necator* (locus tag H16_A0671) y un 44 % de identidad con una depolimerasa putativa de esta misma especie (locus tag H16_B1632), mientras que presenta una baja similitud de secuencia con la principal depolimerasa de *C. necator* (locus tag H16_A1150). PhbZ1 participa en la movilización del PHB mediante la producción de hidroxibutiril-CoA y constituye la principal depolimerasa activa durante la fase estacionaria en

biorreactores; su inactivación permite la obtención de un PHB de alto peso molecular y distribución uniforme (Adaya et al., 2018). Con el objetivo de identificar una proteína homóloga en *Ht* KHS3, se realizó un análisis BLAST, que permitió detectar otra potencial depolimerasa previamente no identificada (gen *phaZ3*, *locus tag* RO22_13815), de tamaño similar a PhbZ1. Este gen se encuentra anotado en la base de datos IMG como una proteína de función desconocida. Si bien la proteína identificada presenta una baja similitud de secuencia con PhbZ1 de *A. vinelandii* (38,1 %), el análisis de la secuencia revela la conservación del motivo *lipase box* y de los residuos de la tríada catalítica, lo que sugiere una posible función depolimerasa.

3.1.3 Fasinas

Las fasinas son pequeñas proteínas anfifílicas que se unen a la superficie del gránulo de PHA formando una interfase entre el interior hidrofóbico de los gránulos de PHA y el citoplasma hidrofílico para evitar la coalescencia granular (Kutram-Muniasamy & Pérez-Guevara, 2018; Pfeiffer & Jendrosseck, 2012; Zhao et al., 2017). Estas proteínas representan entre el 3 y el 5% del total de proteínas celulares (Potter, 2002). Aunque la función de la mayoría de las fasinas aún no se ha caracterizado completamente, se sabe que algunas están involucradas en la regulación de la forma, el tamaño y el número de gránulos de PHA (Kutram-Muniasamy & Pérez-Guevara, 2018). Si bien las fasinas generalmente muestran un bajo grado de conservación de secuencia, poseen un motivo de secuencia característico denominado “*phasin 2 motif*”, que incluye un alto porcentaje de α -hélice y regiones de interacción tipo *coiled-coil* (Pfeiffer & Jendrosseck, 2012; Zhao et al., 2017).

En este análisis se comparó la secuencia de las tres posibles fasinas de *Ht* KHS3 con las fasinas ya caracterizadas de *C. necator* y de *Halomonas* TD01 (Figura 10). A pesar de la baja identidad en general, todas presentan el dominio característico de fasina (*phasin 2 motif*). La similitud de secuencias con las fasinas de *C. necator* fue muy baja (<24%). Por el contrario, se observó una alta identidad con las fasinas de *Halomonas* TD01. PhaP1 de *Ht* KHS3 mostró un 89,71% de identidad con PhaP1 de *Halomonas* TD01. PhaP2 presentó un 83,87% de identidad con su homólogo de *Halomonas* TD01. Y, por último, PhaP3 mostró un 84,75% de similitud con PhaP3 de *Halomonas* TD01.

PhaP2	<i>C. necator</i>	----MTQWTAEEQCTKAQMAGLEAMAGLTNKNVLEGFEKVMDDLNLQTMKMTLAHNREGVMKA	56
PhaP4	<i>C. necator</i>	----MTQWSPEQFIKVMAGIEALTGLTGKAFEGFEKLELNLQAMKTALADSREGARKA	56
PhaP1	<i>C. necator</i>	-----MILTPEQVAAAQKANLETLFGLTTKAFEGVEKLVELNLQVVKTSFAEGVDNAKKA	55
PhaP3	<i>C. necator</i>	----MSPFMPPEQFAAVQKSSNLQLFALTNNMAFDGFKLTELNLQAVRTTLAGEQGNI EAV	56
PhaP1	<i>Ht KHS3</i>	MQDNMMDAFNAQT-KQM---FEPMRKINSMLNNMEKMTQYQLEAMKRYSQMGTERIRSA	56
PhaP1	<i>Halomonas TD01</i>	MQDKMMDAFSTQT-RQM---FEPMRKMNSMLNNMEKMTQYQLEAMKRYSQMGTERIRSA	56
PhaP3	<i>Ht KHS3</i>	-MNKATEKTTQQFESVF---VSPMRSYTLTALDYYDQLVSAQLDAARAYSDMAIAQARTW	56
PhaP3	<i>Halomonas TD01</i>	-MNKAAEKSTQQFESVF---VSPMRSYTLAALDYYQVVSQMDAARAYSDMTIAQARTW	56
PhaP2	<i>Ht KHS3</i>	MRTLNTNEMTQQFDNMF---MAPVRAYMALS IDYSEKMINAQMDASKAYADTGIAQMRQM	57
PhaP2	<i>Halomonas TD01</i>	MQTFNTNEMTQQFDNMF---MAPVRAYMTLS IDYSEKMLNAQLDANKSYVDTGIAQMRQL	57
		* : :: :: : . : : . :	
PhaP2	<i>C. necator</i>	LSVQNPQELI---ELQIELFQPAADKVLEYRRQLHDILAATRAEFEKIAEVQYTTSTKGQL	113
PhaP4	<i>C. necator</i>	LSAKDPQELV---ELQIALFQPAADNVLAYRRQLYDILAATRAEFKVAEVQYTAGKQGL	113
PhaP1	<i>C. necator</i>	LSAKDAQELL---AIQAAVQPVAEKTLAYTRHLYEIASETQSEFTKVAAEQLAEGSKNV	112
PhaP3	<i>C. necator</i>	LAGKDLREVF---AVQGNLAQPAAEKAVAYARHVEIASNTQVELTKAVEGQYEQHNRRV	113
PhaP1	<i>Ht KHS3</i>	TEIQDAESLRDFGTQKQAEEMNELSQMQEDARVMSEMSLQFKSEMEKMFSEA-----	108
PhaP1	<i>Halomonas TD01</i>	TEINDAESLRDFSTKQAEEMNELSQMQEDARVMGEMSLQFKSEMEKLFSEA-----	108
PhaP3	<i>Ht KHS3</i>	LDVKDPDSFKKAMETQOKTAGEFMERVKGDTKEKVTISIGQSFAQDSQKMAEET-----	108
PhaP3	<i>Halomonas TD01</i>	LDVKDADSFKKAMESQOKTASDLMERMKGDSEKVTISIQNFMQESQKMAEET-----	108
PhaP2	<i>Ht KHS3</i>	MEVKDAEGLRSYMEGQQKVAKELAERVKGDTDKVVS LQQDFIQKSQKITEDN-----	109
PhaP2	<i>Halomonas TD01</i>	MSVKDANGLRSYMEGQQKVAKELAERVKGADKAVALLQQDFLQKQGKLTEDN-----	109
		:: . * : : : . *	
PhaP2	<i>C. necator</i>	QGLIDSAVSNAPSGS-TAPLAAWQEAVKATTALYESMQSTAKQAVEVAENSFNTAAAAAS	172
PhaP4	<i>C. necator</i>	HDFLGSVVSQTPSGAAAPLAAWQEAVSATTLYESMQTTAKQAVQAAESSFNTAAQVAS	173
PhaP1	<i>C. necator</i>	QALVENLAKNAPAGSE-STVAIVKSAISAANNAYESVQKATKQAVEIAETNFQAAATAAT	171
PhaP3	<i>C. necator</i>	QAFVDNFVKNAAPAGSE-AITALLQSSVAAASSTFQSFQDAAKQTAEVAKANFAKTAAAS	172
PhaP1	<i>Ht KHS3</i>	-----GQQMSEQAKAA-----T	120
PhaP1	<i>Halomonas TD01</i>	-----GQKMGEQATSA-----T	120
PhaP3	<i>Ht KHS3</i>	-----TKKAVETAKQ-----	118
PhaP3	<i>Halomonas TD01</i>	-----TKKAVETAKQ-----	118
PhaP2	<i>Ht KHS3</i>	-----VKQAQTAASKL-----N	121
PhaP2	<i>Halomonas TD01</i>	-----VKQAQAAASKM-----S	121
		:: *	

Figura 10. Comparación de las fasinas de *Ht KHS3* con las de otros microorganismos. Se alinearon las tres potenciales PhaP de *Ht KHS3* con las de *Halomonas TD01* y de *C. necator*. En gris se resalta el *phasin 2 motif* característico de estas enzimas.

3.1.4 Regulador de la síntesis de PHA (PhaR)

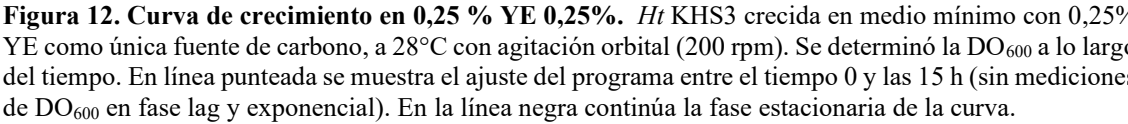
El gen *PhaR* (*locus tag* RO22_08880) codifica una proteína reguladora de la síntesis de PHA. Estudios realizados en *C. necator* demostraron que PhaR regula su propia expresión y la de las fasinas que recubren los gránulos. Esta proteína se une tanto a los gránulos de PHA como a regiones ubicadas aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *phaP* y *phaR* (Maehara et al., 2002; Pötter et al., 2002; York et al., 2002). El dominio de unión al ADN de estos reguladores se encuentra en el extremo N-terminal. Se comparó la secuencia de los reguladores de síntesis de PHA de *Ht KHS3*, *Halomonas TD01*, *C. necator* y *A. vinelandii*; el gen *phaR* de *Ht KHS3* tiene un alto porcentaje de identidad con el de *Halomonas TD01* (87,01%) y una baja identidad con el de *C. necator* y el de *A. vinelandii* (37,16% y 39,33%, respectivamente). El dominio de unión al ADN se encuentra conservado en los 4 microorganismos (Figura 11).

Figura 11. Comparación del regulador PhaR de *Ht KHS3* con los de otros microorganismos. Se alineó el regulador de *Ht KHS3* con los de *Halomonas* TD01, *A. vinelandii* y *C. necator*. El dominio de unión a ADN se indica en color crema.

3.2.1 Crecimiento de *Ht* KHS3 y evaluación de la acumulación de PHA en diferentes fuentes de carbono

Al igual que muchas cepas del género *Halomonas*, *Ht KHS3* puede crecer a expensas de diferentes fuentes de carbono y energía, incluidos hidrocarburos aromáticos. Como se mencionó anteriormente, *Ht KHS3* cuenta con los genes necesarios para la síntesis de PHA. Con el objetivo de corroborar la capacidad de *Ht KHS3* de acumular PHA, se cultivó en medio mínimo H1-2 (medio estándar con 2 g/l (NH₄)₂SO₄) líquido o sólido en presencia de diferentes fuentes de carbono y se evaluó el crecimiento y la acumulación de PHA tiñendo las células crecidas en las distintas condiciones, con Sudan Black y Nile Blue A.

Como se observa en la Figura 12, *Ht* KHS3 fue capaz de crecer sin inconvenientes en 0,25% p/v YE, una fuente de carbono completa, rica en vitaminas, aminoácidos y azúcares, alcanzando la fase exponencial tardía a las 15 h, con un t_d de 3,23 h.



Al entrar en fase estacionaria a las 18 h de cultivo, se tiñeron las células con Sudan Black y se observaron al microscopio (Figura 13A, panel superior). Se observó una coloración fucsia dada por la tinción del citoplasma con fucsina sin evidencia de acumulación de PHA. En la Figura 13A, panel inferior, se muestra una placa de H1-2 0,25% YE en la que se observan colonias aisladas que no mostraron la coloración negra esperada cuando hay acumulación de PHA. Por otra parte, al teñir las células con Nile Blue A (Figura 14A) y observarlas al microscopio, tampoco se observó fluorescencia, confirmando que *Ht* KHS3 no acumula PHA cuando crece en YE como única fuente de carbono.

Las células de *Ht* KHS3 crecidas en medio mínimo H1-2 con 1% p/v de glucosa o 3% v/v de glicerol, teñidas con Nile blue A y observadas bajo el microscopio, a diferencia de lo observado en YE 0,25%, mostraron largas células con puntos fluorescentes en ambas fuentes de carbono (Figura 14BC, paneles superiores), evidenciando acumulación de PHA en estas condiciones. Además, y al contrario de lo que se vio en YE, al teñir con Sudan Black células y colonias de *Ht* KHS3 crecidas en glucosa se observó una coloración negra debida a los gránulos de PHA (Figura 13B).

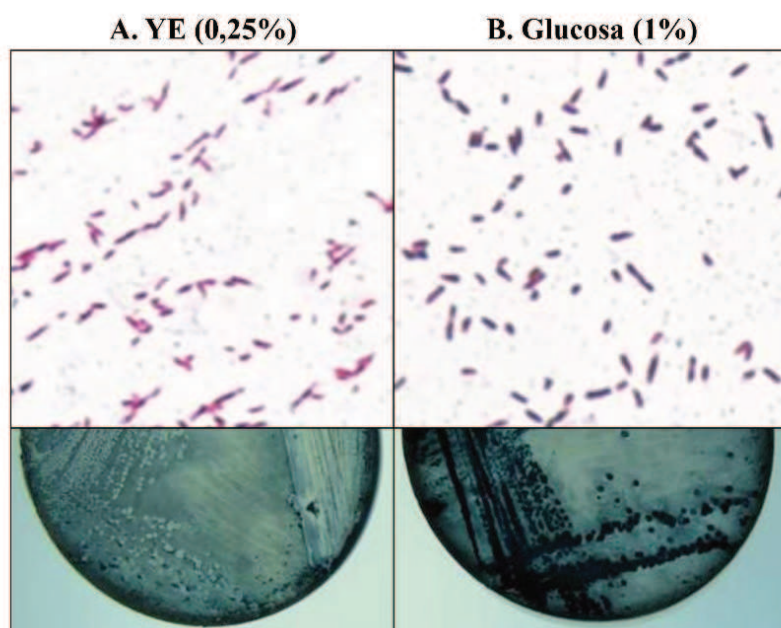


Figura 13. Acumulación de PHA en *Ht* KHS3 mediante tinción con Sudan Black. En el panel superior se muestran células cultivadas en medio líquido mínimo H1-2, teñidas con Sudan Black y Fucsina, observadas bajo el microscopio óptico. En el panel inferior se muestran colonias crecidas en medio mínimo H1-2 agar teñidas con Sudan Black. **A:** 0,25% p/v de YE como fuente de carbono. **B:** 1% p/v de glucosa como fuente de carbono.

Para complementar los resultados de las tinciones, se prepararon células para observación por microscopía electrónica de transmisión crecidas tanto en la condición de acumulación (glucosa/glicerol) como de no-acumulación (YE). En las imágenes de TEM de células cultivadas en extracto de levadura 0,25% p/v no se observan gránulos en el interior celular. En

contraposición, al cultivarlas en glicerol 3% v/v, se observaron varios gránulos de PHA por célula ocupando gran parte del volumen celular (Figura 14A-B, parte inferior).

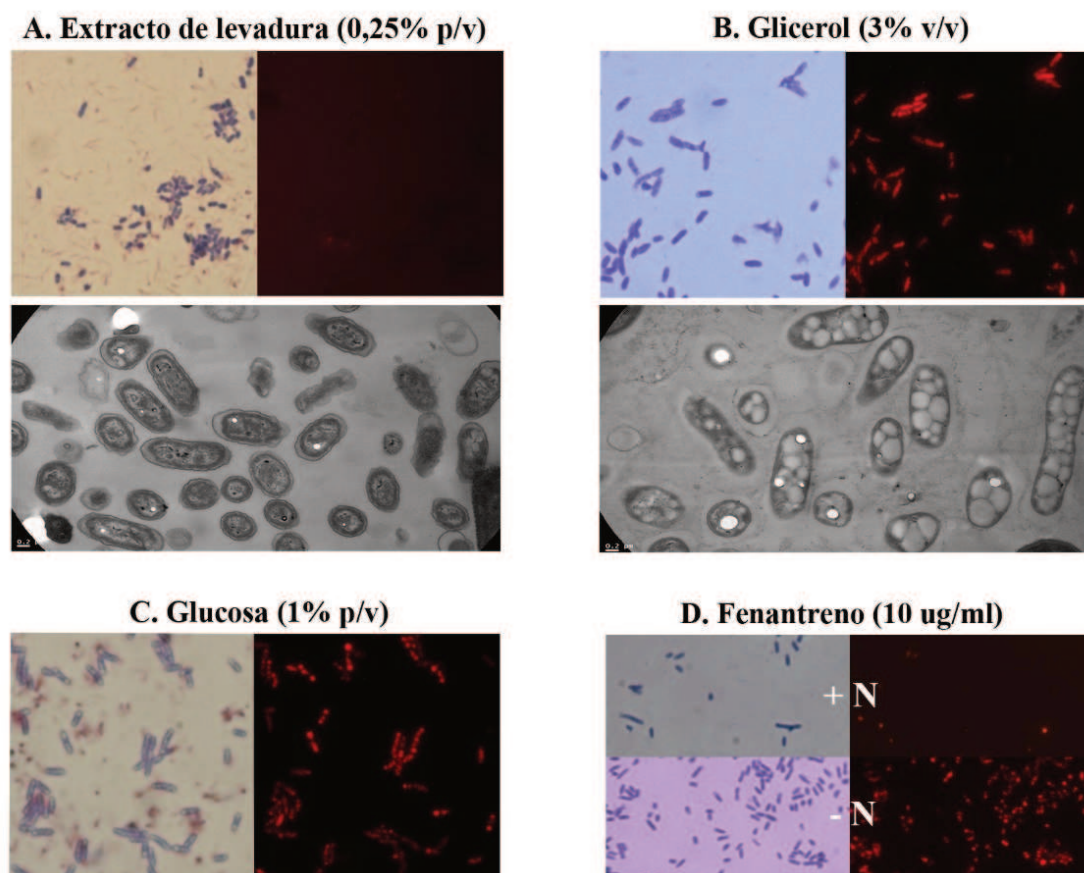


Figura 14. Visualización de gránulos de PHA mediante microscopía de epifluorescencia (tinción con Nile Blue A) y microscopía electrónica de transmisión. Se cultivaron células de *Ht KHS3* para estudiar la acumulación de PHA en un medio mínimo H1-2 suplementado con diferentes fuentes de carbono. Los gránulos de PHA fueron teñidos con Nile Blue A para su observación por epifluorescencia y las muestras destinadas a TEM fueron preparadas según la sección 2.9.3 de Materiales y Métodos. **Panel A:** Extracto de levadura 0,25% p/v. Arriba, microscopía óptica: izquierda, luz visible; derecha, epifluorescencia (RFP). Abajo, TEM. **Panel B:** glicerol 3% v/v. Arriba, microscopía óptica: izquierda, luz visible; derecha, epifluorescencia (RFP). Abajo, TEM. **Panel C:** glucosa 3% p/v. Izquierda, microscopía óptica; derecha, epifluorescencia (RFP). **Panel D:** 10 µg/mL de fenantreno. Arriba, condición del medio con nitrógeno (+N). Abajo, condición de limitación de nitrógeno (-N). Izquierda, microscopía óptica; derecha, epifluorescencia (RFP). Para la epifluorescencia óptica, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E200 con un objetivo de inmersión 100x.

Ht KHS3 se aisló inicialmente debido a su capacidad de crecer y responder quimiotácticamente a hidrocarburos aromáticos (Corti Monzón et al., 2018; D'Ippólito, de Castro, & Herrera Seitz, 2011). Por este motivo se evaluó la acumulación de PHA en células de *Ht KHS3* crecidas en fenantreno como única fuente de carbono. Cuando se usó H1-2 con 10 µg/ml de fenantreno, se detectaron muy pocos puntos fluorescentes correspondientes a acumulación de PHA al teñir las células con Nile Blue A (Figura 14D, condición +N). Sin embargo, cuando la cepa se cultivó en H1-2 con 10 µg/ml de fenantreno y se la privó de fuente de nitrógeno en fase exponencial, se detectó un aumento significativo en la acumulación de PHA. Aunque las células eran mucho más

pequeñas que las cultivadas con glucosa o glicerol, se puede observar una fuerte fluorescencia (Figura 14D, condición -N). El estudio más detallado de hidrocarburos aromáticos como fuente de carbono para la síntesis de PHA por *Ht* KHS3 es abordado en el marco de otra tesis doctoral.

Para evaluar la identidad del polímero acumulado por *Ht* KHS3 a partir de glucosa y glicerol como fuente de carbono, se determinó la estructura química mediante análisis de resonancia magnética nuclear (Figura 15). Los espectros obtenidos presentaron un multiplete de 5,26 ppm (señal 2) indicando la presencia del protón metilo (-CH) en la posición 3; dos dobletes a 2,61 ppm ($J = 15,4; 7,2$ Hz) y 2,47 ppm ($J = 15,4; 5,8$ Hz) que se asignan a los protones diasterótopos de metileno en la posición 2 (-CH₂) (señal 3); y finalmente, los protones de metilo en la posición 4, que dan un doblete de 1,28 ppm ($J = 6,0$ Hz) (señal 1). Estos picos son consistentes con la estructura del 3-hidroxibutirato, lo que confirma que el polímero acumulado en las condiciones de nuestros experimentos es poli-(3)-hidroxibutirato.

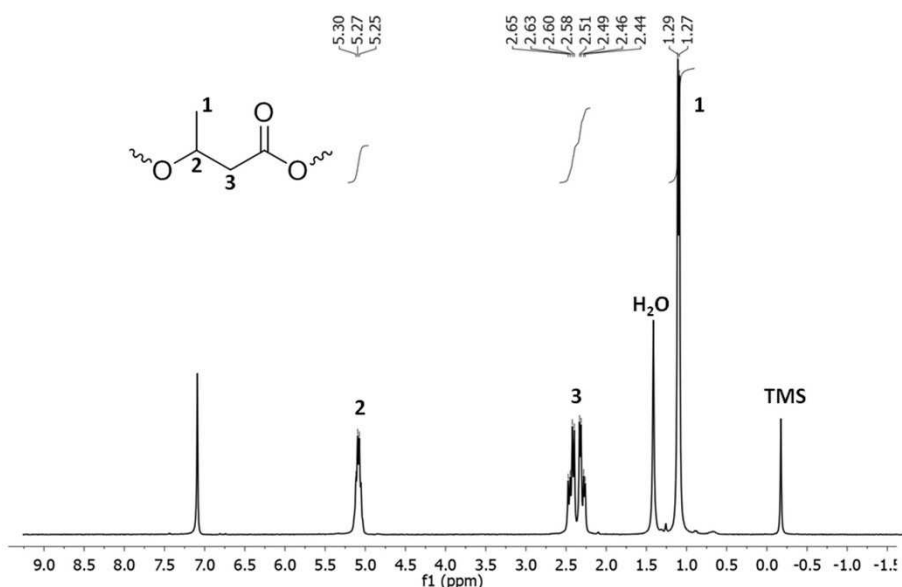


Figura 15. Análisis del polímero por RMN. Se purificó el polímero producido por *Ht* KHS3 cuando crece en medio mínimo H1-2 con glucosa o glicerol como única fuente de carbono y se analizó por ¹H-RMN en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (INTEC-CCT). Se obtuvo el mismo espectro para los dos polímeros; se muestra uno de ellos. Los números 1, 2 y 3 cercanos a los picos del espectro corresponden a los carbonos señalados con la misma numeración en la fórmula química. El número 1 hace referencia al carbono correspondiente al grupo metilo, el número 2 al carbono beta y el número 3 al carbono alfa.

3.2.2 Cinética de crecimiento y acumulación de PHB por *Ht* KHS3 utilizando glucosa como única fuente de carbono

Como se describió anteriormente, *Halomonas* es capaz de acumular PHB. Con el objetivo de caracterizar el crecimiento y la acumulación de PHB de *Ht* KHS3 cuando crece en medio mínimo H1-2 con 1% p/v de glucosa como única fuente de carbono, se evaluó la acumulación del polímero a lo largo de la curva de crecimiento.

Como se observa en la Figura 16, la fase exponencial se extendió aproximadamente entre las 12 y las 37 h de cultivo y la fase estacionaria se inició a partir de las 38 h y se mantuvo durante las 120 h posteriores de cultivo. El valor máximo de DO_{600} alcanzado fue de 6,3 a las 109 h. El comportamiento de la biomasa residual acompañó la tendencia de la DO_{600} , lo que sugiere que esta última refleja adecuadamente el crecimiento celular en estas condiciones.

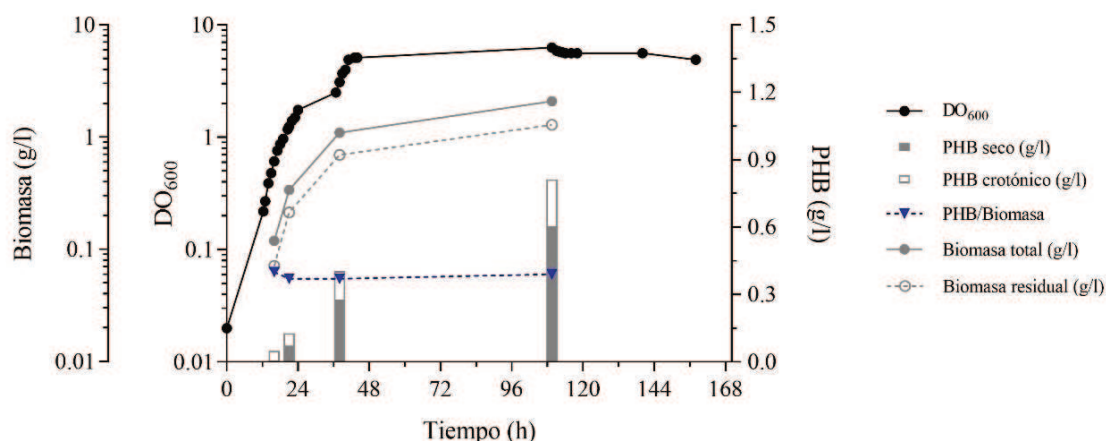


Figura 16. Curva de crecimiento y acumulación de PHB de *Ht KHS3* en 1% p/v de glucosa. Se creció *Halomonas* en medio mínimo H1-2 con glucosa como única fuente de carbono, a 28°C con agitación orbital (200 rpm). Se midió el crecimiento en función de la DO_{600} y de la biomasa seca (g/l). La biomasa total y residual se representa en escala logarítmica con el fin de comparar el perfil de crecimiento con la DO_{600} . Se determinó la acumulación de PHB en distintos puntos de las fases de crecimiento mediante la determinación del peso seco (g/l) y del ácido crotonico. Se calcularon los gramos de PHB producidos por gramo de biomasa.

La acumulación de PHB (g/l) se detectó ya durante la fase exponencial de crecimiento en glucosa y fue aumentando a medida que se incrementó la biomasa de *Ht KHS3*. Al entrar en la fase estacionaria, se observó un aumento marcado en la acumulación, alcanzando un máximo de 0,8 g/l de PHB. Sin embargo, al relativizar la acumulación del polímero respecto de la biomasa, se observó que la cantidad de PHB producido por célula se mantuvo prácticamente constante a lo largo de toda la curva (0,37-0,4 g PHB/g biomasa). Por lo tanto, el gran aumento en la cantidad de PHB alcanzado en la fase estacionaria en estas condiciones estaría dado por un aumento en la cantidad de células más que por una inducción de la producción del polímero en fase estacionaria.

3.2.3 Caracterización del crecimiento y acumulación de PHB utilizando glicerol como única fuente de carbono

Debido al potencial del glicerol como una fuente de carbono alternativa y económica, se realizó una caracterización del crecimiento y acumulación de PHB por *Ht KHS3* utilizando diferentes concentraciones de glicerol comercial como única fuente de carbono. Se realizaron cultivos en presencia de 0,25, 1,5, 3 y 4% v/v de glicerol y se evaluaron el crecimiento y la acumulación del polímero. El tiempo de duplicación calculado para cada condición aumentó con la concentración de glicerol. Así, en 4% de glicerol el t_d (13 h) fue el doble que en 0,25% (6 h). Con respecto a las

densidades ópticas máximas ($DO_{600\text{máx}}$) alcanzadas en las cuatro condiciones, los cultivos de 3 y 4% de glicerol llegaron a valores de $DO_{600\text{máx}}$ de 25 unidades, mucho mayores que la $DO_{600\text{máx}}$ de 2,5 alcanzada en el cultivo de 0,25% de glicerol. Esto sugiere que en 0,25% el crecimiento está limitado por la disponibilidad de la fuente de carbono (Figura 17A).

Al analizar la acumulación de PHB en las distintas concentraciones de glicerol, se estimó una acumulación de entre 2% y 5% (extracción con hipoclorito) en células crecidas con 0,25% glicerol, incluso en fase estacionaria. En contraposición, cuando se utilizó 1,5%, 3% o 4% v/v de glicerol, *Ht* KHS3 comenzó a acumular PHB al comienzo de fase estacionaria (~ 20% a las 50h) y la acumulación aumentó hasta 56% de PHB para 1,5% de glicerol (a las 150 h), y ~ 80% de PHB para 3 y 4% de glicerol (a las 200 h) (Figura 17A). Dado que la mayor acumulación del polímero se observó en 3% y 4% de glicerol, pero el tiempo de duplicación fue menor en 3% (10 h vs 13 h), se decidió profundizar el estudio de la cinética de crecimiento y acumulación de PHB en 3% de glicerol.

La Figura 17B muestra una curva de crecimiento de *Ht* KHS3 en medio mínimo H1-2 con 3% v/v de glicerol, en la que se determinaron DO_{600} , acumulación de PHB (por estimación con hipoclorito) y contenido de glicerol y amonio remanentes en el medio de cultivo. Durante la fase exponencial, los niveles de acumulación de PHB fueron bajos, alcanzando un máximo de ~15%. Cuando el nitrógeno comenzó a agotarse, al inicio de la fase estacionaria, se observó un aumento progresivo en la acumulación del polímero, que alcanzó valores del 70% después de 200 h de cultivo (DO_{600} 20). Por otra parte, la velocidad de consumo de glicerol varió a lo largo de la curva de crecimiento, con una mayor tasa de consumo de glicerol durante la fase exponencial de crecimiento, pudiendo atribuirse a la utilización de glicerol para la multiplicación celular. Durante la fase estacionaria, en cambio, la velocidad de consumo disminuyó notablemente y se podría especular que la mayor parte del carbono consumido en esta fase fue dirigida a la formación de los gránulos de PHB. Los bajos niveles de acumulación de PHB observados con 0,25% v/v de glicerol (Figura 17A) pueden explicarse por el agotamiento de la fuente de carbono en fase estacionaria o por la ausencia de una relación C/N que desencadene la acumulación del polímero. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se cosecharon células de un cultivo de *Halomonas* en medio mínimo H1-2 con 0,25% de glicerol en fase exponencial y se resuspendieron en medio fresco con 0,25% de glicerol sin fuente de nitrógeno o con el agregado de sulfato de amonio 0,2% p/v (ver Materiales y Métodos, sección 2.2.3). En ausencia de nitrógeno, el nivel de PHB aumentó del 5% al 50% en 24 h, mientras que, en el cultivo en presencia de N, solo se observó un ligero aumento del polímero. Al analizar el consumo de glicerol, se observó que en el cultivo con sulfato de amonio la fuente de carbono se agotó en aproximadamente 24 h acompañada de un aumento de la DO_{600} .

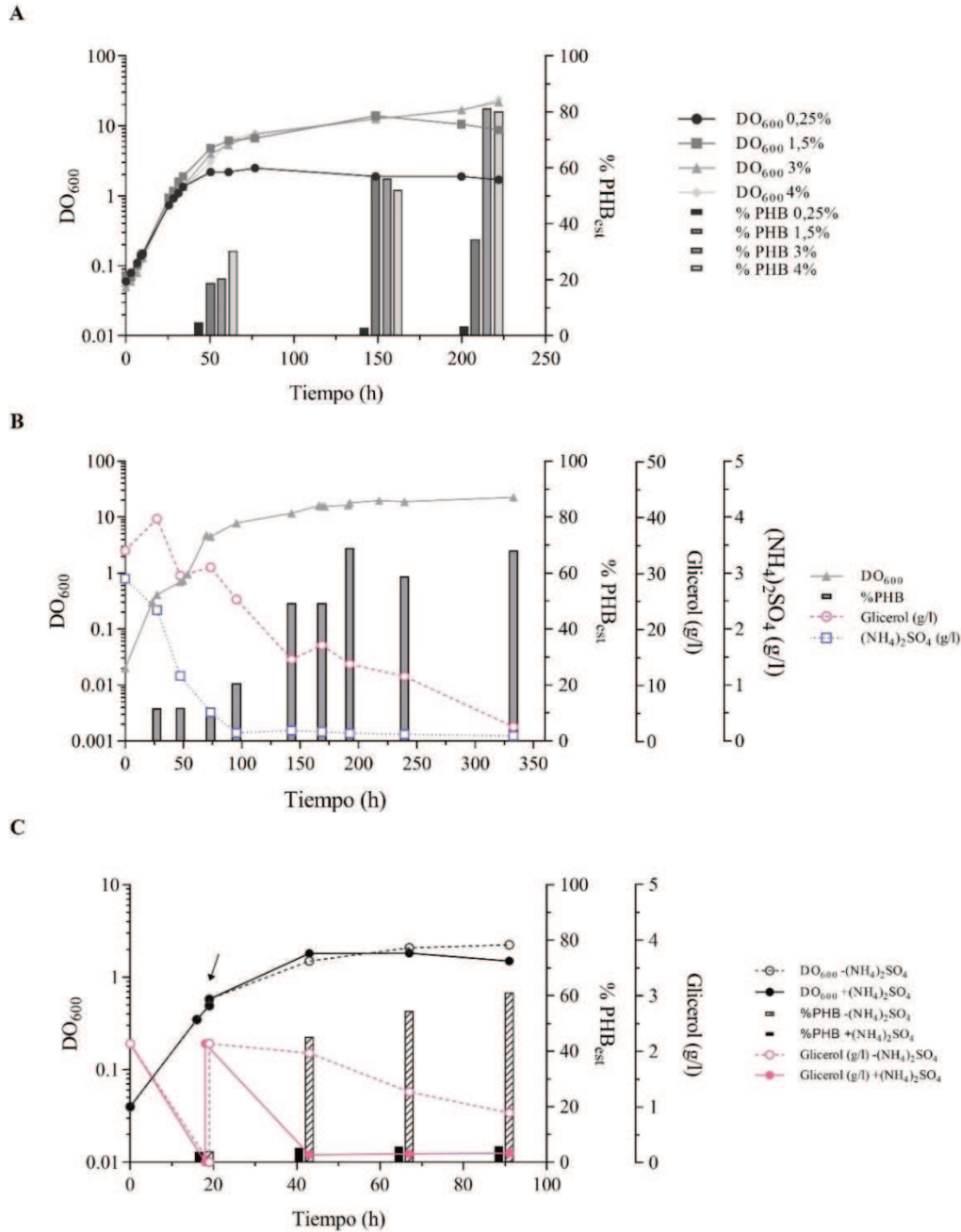


Figura 17. Crecimiento y acumulación de PHA por *Ht* KHS3 utilizando diferentes concentraciones de glicerol como fuente de carbono. **A.** Curvas de crecimiento en medio mínimo H1-2 con diferentes concentraciones de glicerol. Las líneas continuas representan DO₆₀₀ vs tiempo (h). La acumulación de PHA, estimada mediante el método del hipoclorito de sodio (%; barras), se determinó en los tiempos indicados. **B.** Crecimiento en medio mínimo H1-2 con 3% v/v de glicerol como única fuente de carbono. La DO₆₀₀ y la acumulación de PHA se midieron a lo largo del tiempo. En los puntos de muestreo para la determinación de PHB se cuantificaron también las concentraciones de glicerol y amonio remanente en el medio de cultivo. **C.** Crecimiento y acumulación de PHA con 0,25% v/v de glicerol como fuente de carbono bajo condiciones limitadas de nitrógeno. *Ht* KHS3 se cultivó en medio mínimo H1-2 con 0,25% v/v de glicerol hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 (flecha negra). El cultivo se dividió en dos fracciones: una se resuspendió en medio mínimo H1-2 completo y fresco con 0,25% de glicerol como fuente de carbono (DO₆₀₀, línea negra continua), y la otra en medio mínimo H1-2 con 0,25% de glicerol como fuente de carbono y sin fuente de nitrógeno (DO₆₀₀, línea negra punteada). Las barras indican la acumulación de PHB (%). La concentración de glicerol se determinó al inicio del cultivo y en los distintos tiempos de acumulación.

Estas observaciones sugieren que el glicerol se utilizó principalmente para el crecimiento celular. Por el contrario, en ausencia de N, las células que acumularon mayores niveles de PHB mostraron una tasa de consumo de glicerol mucho más lenta, sugiriendo que el desbalance en la relación C/N generó un cambio metabólico que derivó en la detención del crecimiento y la concomitante acumulación de PHB.

En base a estas observaciones se puede decir que *Ht* KHS3 acumuló PHB cuando se cultivó en diferentes fuentes de carbono, siempre que se generen condiciones de desbalance en la relación C/N, como lo demostró la falta de acumulación cuando el crecimiento se llevó a cabo con fenantreno 10 µg/ml (Figura 14D) o 0,25% de glicerol (Figura 17C). Este comportamiento es similar a los resultados descritos previamente para otros microorganismos (Pokój et al., 2019). Además, *Ht* KHS3 también creció y acumuló PHB en glicerol crudo (datos no mostrados). El glicerol crudo es el que se obtiene directamente a partir de los reactores de producción de biodiesel y contiene compuestos residuales del proceso como metanol, jabón y materia orgánica, que no todos los microorganismos son capaces de tolerar. Por lo tanto, esta característica aumenta el potencial de esta cepa como productora de PHB.

3.2.4 Movilización de PHB

Como se mencionó en la sección 3.1, *Ht* KHS3 posee genes que codifican para depolimerasas, tanto extra como intracelulares. Estas depolimerasas intracelulares podrían ser las encargadas de romper las cadenas del polímero para utilizarlo como fuente de carbono y energía. Por lo tanto, se diseñó un experimento para evaluar en qué condiciones *Ht* KHS3 es capaz de movilizar el PHB acumulado y cómo se afectan tanto el porcentaje de acumulación como el peso molecular del polímero en ausencia o presencia de nitrógeno en el medio.

En la Figura 18 se muestra el esquema del experimento realizado. Se cosecharon células de un cultivo de *Halomonas* en fase exponencial en 0,25% v/v de glicerol, se resuspendieron en un medio con 0,25% de glicerol sin fuente de nitrógeno y se incubaron con agitación hasta que la acumulación alcanzó el 60%. El peso molecular del PHB acumulado en ese cultivo estimado por GPC (Mw) fue de 223,6 kDa. En este punto se dividió el cultivo en dos, a uno se le adicionó sulfato de amonio y al otro no, y se incubaron durante 72 h. Al evaluar la acumulación de PHB (por estimación con hipoclorito) y el peso molecular del polímero en ambos cultivos, se observó que en el cultivo complementado con sulfato de amonio hubo una fuerte disminución del porcentaje de acumulación de PHB (de 60% a 21%). Por otra parte, el peso molecular también se redujo a 118,7 kDa, sugiriendo que las células retomaron su crecimiento. Por lo contrario, el cultivo al cual no se le adicionó sulfato de amonio tuvo un ligero aumento tanto en la acumulación como en el peso molecular (63% PHB y 254,6 kDa). Estos resultados demuestran que *Ht* KHS3 es capaz de metabolizar el PHB acumulado como fuente de carbono y energía presumiblemente

mediante las depolimerasas intracelulares que rompen las cadenas del polímero acumulado.

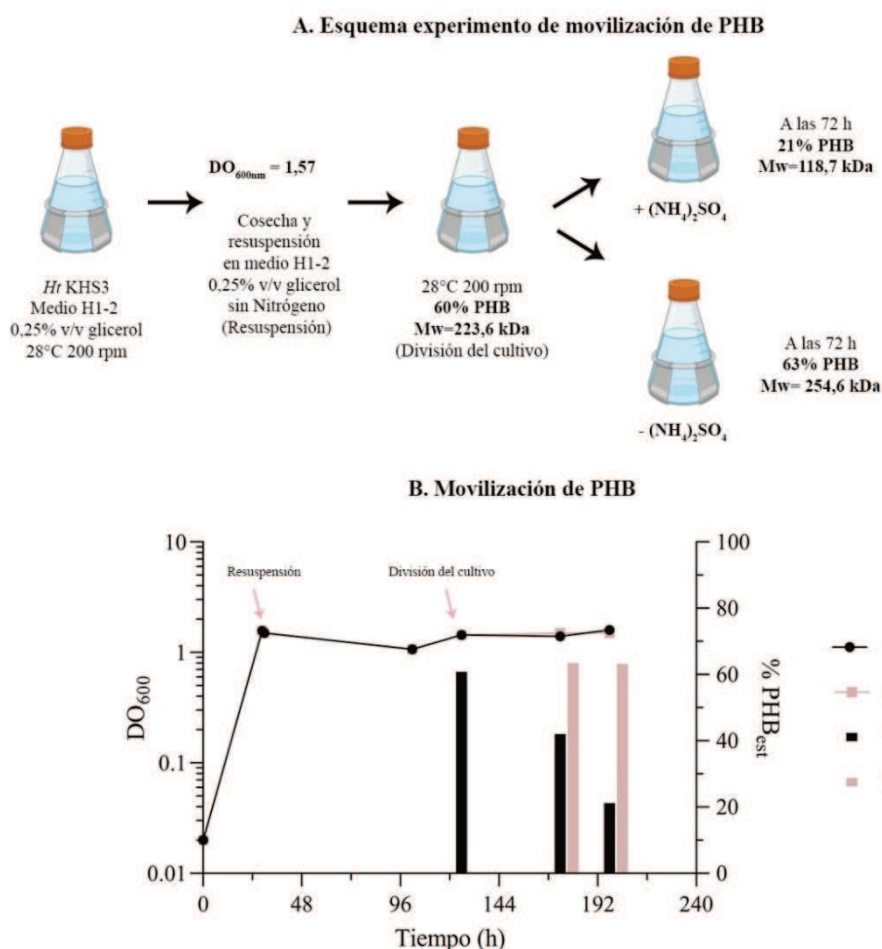


Figura 18. Experimento de movilización de PHB. A: Esquema del experimento. Se realizaron cultivos a 28°C con agitación de *Ht KHS3* en H1-2 con 0,25 % v/v de glicerol. Cuando los cultivos llegaron a etapa exponencial ($DO_{600} = 1,57$), se cosecharon las células, se resuspendieron en medio H1-2 fresco sin nitrógeno y con 0,25 % v/v de glicerol para la acumulación de PHB. Se incubaron hasta que alcanzaron una acumulación del 60% de PHB. Una vez alcanzada la acumulación de PHB, el cultivo fue dividido en dos fracciones, a una de las cuales se le agregó 0,2% de sulfato de amonio y a la otra no. En todos los casos se evaluó el crecimiento mediante la medida de DO_{600} y la acumulación de PHB mediante tratamiento con hipoclorito de sodio y por determinación del peso molecular. **B: Gráfica de movilización.** Se graficaron la DO_{600} y la acumulación de PHB desde el inicio del primer cultivo. Con flechas rosa se indican los dos tiempos en los cuales el cultivo se resuspendió y se dividió, respectivamente.

3.2.5 Eficiencia de los métodos de purificación de PHB

Las propiedades del polímero están fuertemente influenciadas por el método de extracción empleado, por ello, la elección del método adecuado depende del uso o aplicación prevista del material. La extracción con solventes orgánicos como el cloroformo es la que más preserva las propiedades de los PHAs, pero es poco amigable ambientalmente. Por eso se han desarrollado diferentes técnicas de extracción que sean más sustentables (Kunasundari & Sudesh, 2011). En esta tesis se pusieron a prueba cuatro métodos de extracción del polímero producido por un único cultivo de *Ht KHS3* en medio mínimo H1-2 con 3% p/v de glicerol como fuente de carbono. Como se muestra en la Tabla 6, el método de extracción con cloroformo presentó una menor

eficiencia en comparación con los otros métodos, además de resultar más tedioso para manipular debido a que se trata de un solvente orgánico de rápida evaporación. La extracción con SDS o con hipoclorito mostraron un rendimiento similar entre sí y superior al obtenido con cloroformo, siendo además técnicas simples de aplicar. Por su parte, la extracción con etanol mostró un rendimiento aparentemente elevado; sin embargo, el polímero obtenido presentó una coloración amarillenta, lo que sugiere una purificación incompleta. A partir de estos resultados, se concluyó que la técnica más sencilla, rápida y económica para extraer el polímero en las condiciones estudiadas era la extracción con hipoclorito. No obstante, teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos que señalan que el hipoclorito puede provocar la ruptura de las cadenas poliméricas, mientras que el cloroformo no tendría dicho efecto (Samrot et al., 2021; Tan et al., 2014), se decidió determinar el peso molecular del PHB extraído por ambas técnicas.

Tabla 6. Comparación de distintos métodos de extracción de PHB en un cultivo de *Ht* KHS3. Se muestran los valores de biomasa seca, PHB seco y el porcentaje de PHB respecto al peso seco de la biomasa obtenidos con cada método de extracción. La columna “% PHB estimación por lavandina” corresponde al valor obtenido mediante la estimación rápida con hipoclorito de sodio del cultivo.

Método de extracción	Biomasa seca (g/l)	PHB seco (g/l)	% PHB peso seco	% PHB estimación por lavandina
Hipoclorito	3,98	1,29	37,5%	44%
Cloroformo	3,62	1,17	32,46%	
Etanol	3,57	2,51	70,39%	
SDS	3,66	1,52	41,51%	

Se determinó el Mw del PHB de un mismo cultivo, extraído con cloroformo o con hipoclorito. A diferencia de lo que cita la bibliografía (Samrot et al., 2021; Tan et al., 2014), el Mw del PHB extraído por cloroformo ($M_{w\text{cloroformo}}=151,8$ kDa) fue solo un poco mayor que el Mw del polímero extraído con hipoclorito de sodio ($M_{w\text{hipoclorito}}=140,6$ kDa). En función de estos resultados, dada la sencillez, el bajo costo y el hecho de no trabajar con un solvente halogenado, se decidió proceder a la caracterización del polímero extraído con hipoclorito de sodio.

3.2.6 Caracterización del polímero extraído

Tal como se mostró en el análisis de ^1H -RMN (Figura 15), la estructura química del polímero producido bajo estas condiciones corresponde a poli-3-hidroxibutirato.

Se emplearon varias metodologías para completar la caracterización fisicoquímica del polímero. La Figura 19 muestra el espectro FTIR del PHB obtenido, en la región de frecuencias de grupos funcionales, la banda más prominente para la identificación es la banda del carbonilo del éster, que aparece como un pico alrededor de 1720 cm^{-1} (vibración de estiramiento $\text{C}=\text{O}$). Además, un pequeño pico a 2930 cm^{-1} corresponde a la vibración C-H. Los picos observados a 1450 y 1379

cm^{-1} pueden atribuirse a la deformación asimétrica y simétrica de CH_3 , respectivamente. Los picos a 1280, 1228 y 1099 cm^{-1} son indicativos de la típica elongación C-O-C. Otros picos identificados incluyen 1263 cm^{-1} para la elongación C-O-C y deformación C-H, 1133 cm^{-1} para el balanceo de CH_3 y 1058 cm^{-1} para la elongación C-O. El patrón infrarrojo observado es típico de muestras comerciales de PHB, confirmando así que el polímero extraído es realmente PHB.

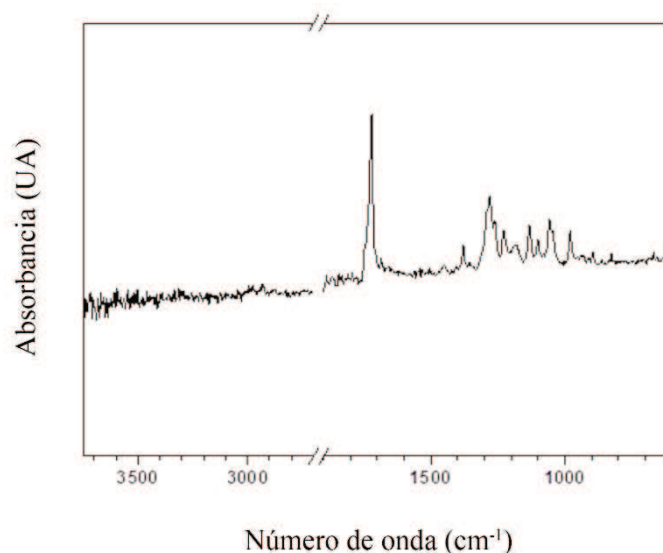


Figura 19. Espectro Infrarrojo por Transformada de Fourier de PHB. Se purificó el polímero producido por *Ht* KHS3 cuando crece en medio mínimo H1-2 con glicerol como única fuente de carbono y se analizó por FTIR.

Se estudiaron las propiedades térmicas y de degradación del polímero mediante calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Las transiciones térmicas fueron analizadas a partir del termograma de la Figura 20A. Se observó un único pico endotérmico de fusión, con una temperatura de inicio a 162°C y una temperatura de fusión a $175,7^{\circ}\text{C}$ con un ΔH_m de $94,9 \text{ J/g}$. Estos valores son consistentes con los valores de la literatura para PHB a base de glucosa (Dietrich et al., 2021). No se observó cristalización en frío, y la entalpía de fusión medida corresponde a un grado de cristalinidad del 65,5%. Esta alta cristalinidad es consistente con la estricta estereorregularidad molecular del PHB. La temperatura de transición vítrea no fue detectada por DSC. Durante la etapa de enfriamiento, el PHB exhibió un evento exotérmico a $80,2^{\circ}\text{C}$ que se asoció con la cristalización y tuvo un ΔH_c de $78,1 \text{ J/g}$.

También se investigó la estabilidad térmica del PHB mediante TGA (Figura 20B). La descomposición del PHB ocurrió en un solo paso, iniciado a una temperatura de inicio extrapolada de $249,5^{\circ}\text{C}$. Este proceso de descomposición se atribuye principalmente a la ruptura de cadenas, lo que resulta en una masa residual despreciable a 700°C .

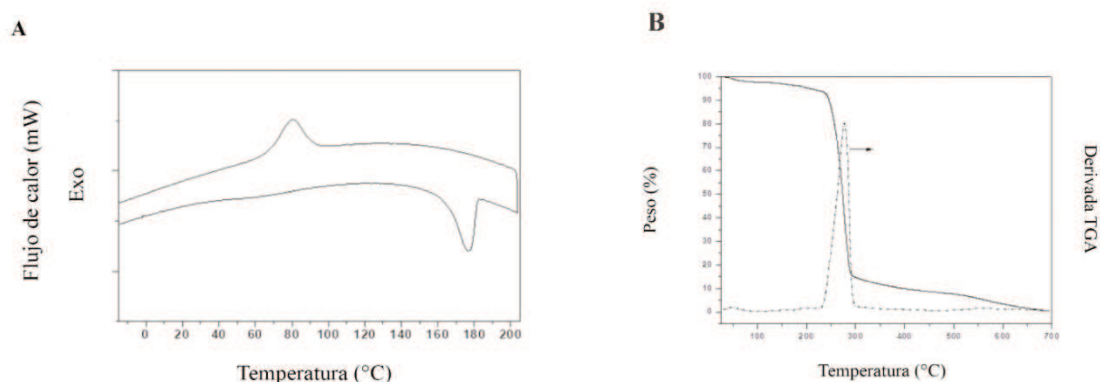


Figura 20. Propiedades térmicas del PHB. A. Termograma DSC. B. TGA curva y primera derivada.

3.2.7 Producción de PHB por *Ht* KHS3 en reactor de tanque agitado bajo condiciones no estériles

Como ya se ha mencionado, uno de los grandes desafíos de la biotecnología en estas investigaciones es reproducir los resultados del laboratorio a escala industrial con reproducibilidad y menor costo que los procesos industriales ya existentes (Chen et al., 2009). A lo largo de esta tesis se estableció un contacto con el Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL dirigido por el Dr. Alejandro Beccaria con el objetivo de probar el desempeño de *Ht* KHS3 en cultivos en reactor. En pruebas realizadas en dicho laboratorio se demostró que *Ht* KHS3 es capaz de crecer y producir PHB en cultivos en *batch* utilizando 30 g/l de glicerol como única fuente de carbono. Por otra parte, se ha demostrado que bacterias del género *Halomonas* pueden crecer y producir PHAs en procesos no estériles con elevadas concentraciones de sal y medio alcalino (Tan et al., 2011; Tan et al., 2014). Dado que *Ht* KHS3 es una bacteria moderadamente halófila, se decidió evaluar su crecimiento y acumulación de PHB en un medio con mayor concentración salina, con el objetivo de trabajar sin esterilidad para disminuir el consumo energético y potencialmente los costos de producción. Esta parte del trabajo se realizó en el laboratorio de cultivos celulares de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile, bajo la dirección del Dr. Álvaro Díaz y la tutoría de la Lic. Belén Ponce, en el contexto de una pasantía de trabajo bajo el financiamiento del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

3.2.7.1 Producción en reactor de 2 litros

En primer lugar, se hicieron cultivos en *batch* sin esterilidad en reactor de 2 l con 1, 2 l de medio mínimo H1 a pH inicial 7,5 con 25 g/l de glicerol como única fuente de carbono a 28°C, 400 rpm y con un flujo de aire de 0,45 vvm. Con el fin de disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos no halófilos, se utilizó una concentración de NaCl de 60 g/l, el triple de los 20 g/l utilizados de rutina para cultivar *Ht* KHS3. Se inoculó el reactor, previamente sanitizado, con un cultivo saturado estéril de *Ht* KHS3 en LB-6. Para evitar el exceso de espuma se adicionaron

algunas gotas de antiespumante. Se evaluó el crecimiento en función de la DO_{600} y biomasa seca y se cuantificó el contenido de PHB por HPLC, peso seco y estimación con hipoclorito de sodio (Figura 21). Además, se evaluó potencial contaminación por observación al microscopio del cultivo y crecimiento en placas de agar LB-6. El crecimiento fue aproximadamente lineal en el tiempo, hasta una $DO_{600\text{máx}}$ de 14,68, resultado confirmado por la determinación de biomasa seca que alcanzó un máximo de 4,2 g/l (la biomasa residual constató este crecimiento, datos no mostrados). La producción de PHB fue baja hasta las 68 h ($0,17 \text{ g/l} \pm 0,03$) y luego comenzó a aumentar de manera gradual hasta un máximo de 1,37 g/l a las 243 h. Durante todo el cultivo el porcentaje de acumulación fluctuó entre 24 y 37%, teniendo un pico de acumulación del polímero de 42% a las 257 h (dato no mostrado). El consumo de glicerol y amonio fue gradual a lo largo de toda la curva de crecimiento y acumulación. Los controles de placas de agar de LB-6 y observación al microscopio en los diferentes tiempos demostraron que no hubo contaminación aparente.

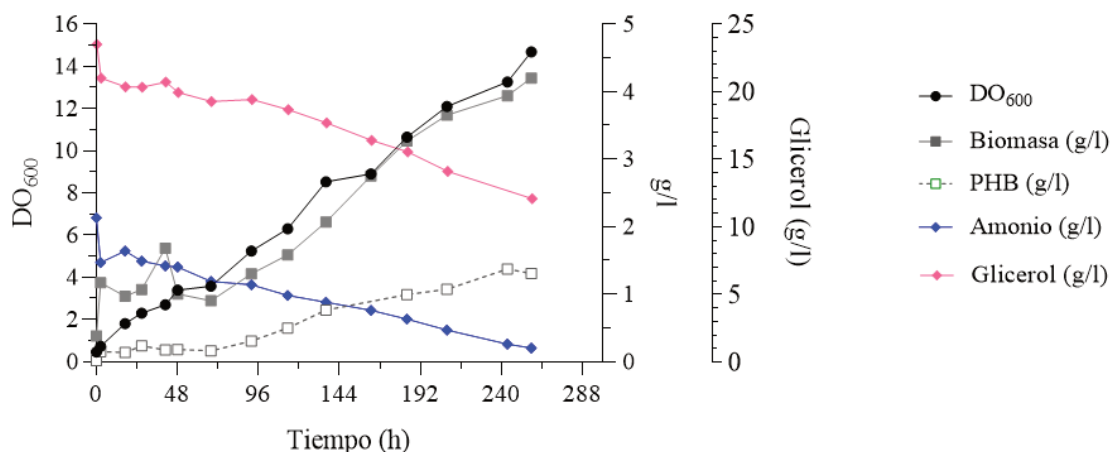


Figura 21. Evaluación del crecimiento de *Ht KHS3*, acumulación de PHB y consumos de glicerol y amonio en cultivos *batch* en tanque reactor agitado de 2 l. Evolución de la DO_{600} (círculo negro), biomasa seca en g/l (cuadrado gris), PHB seco en g/l (cuadrado hueco gris), concentración de amonio y glicerol (rombo azul y rosa, respectivamente) durante el cultivo. El eje izquierdo representa la DO_{600} (escala lineal), el eje derecho g/l (biomasa, PHB y amonio) y el eje derecho exterior g/l de glicerol.

Con esta prueba piloto, se demostró que *Ht KHS3* tiene potencial biotecnológico para la producción de PHB en condiciones no estériles utilizando altas concentraciones de sal.

3.2.7.2 Cambio de escala de 2 a 14 litros

El objetivo del cambio de escala es reproducir a escala piloto los mismos resultados obtenidos en el laboratorio. En la práctica, no siempre es sencillo reproducir a mayor escala todos los parámetros de la escala de laboratorio. Por lo tanto, el escalado se basa en la estrategia de mantener constante solo uno o dos de los diversos parámetros posibles. Los parámetros que se

mantienen constantes son aquellos que se considera que tienen mayor impacto en la fermentación (Nielsen et al., 2003, p. 486). Los métodos de escalado más frecuentes son:

- Potencia por unidad de volumen constante
- Tiempo de mezclado constante
- Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante (kLa)
- Velocidad de agitación constante y velocidad de la punta del agitador constante

Para fermentaciones aeróbicas el escalado por kLa suele ser un enfoque razonable y es el más usado (Chisti & Moo-Young, 1999). Si bien en el caso de *Ht* KHS3 lo más aproximado hubiera sido el escalado por kLa, dado el corto tiempo de la pasantía, se decidió hacer un escalado por potencia por unidad de volumen constante (P/V cte). Para escalar de 2 a 14 l, se hicieron los cálculos de las rpm necesarias de modo de tener la misma potencia que en el reactor de 2 litros (sección 2.4.1 de Materiales y Métodos). El resultado indicó que se requerían 123 rpm de agitación, pero dado que el cálculo fue considerando la presencia de dos impulsores y en el reactor de 14 litros había 3 impulsores, se decidió utilizar 80 rpm.

Una vez definidas las condiciones de agitación que se utilizarían, se hizo un cultivo en *batch* sin esterilidad en reactor de 14 l con 12 l de medio mínimo H1 a pH inicial 7,5 con 25 g/l de glicerol como única fuente de carbono y 60 g/l de NaCl, a 28°C, 80 rpm y con un flujo de aire de 0,45 vvm. Se inoculó el reactor, previamente sanitizado, con un cultivo saturado estéril de *Ht* KHS3 en LB-6 a una DO₆₀₀ inicial de 0,53. Para evitar el exceso de espuma se adicionaron pequeñas gotas de antiespumante. El crecimiento (medido por la DO₆₀₀) y la acumulación de PHB (estimada mediante hipoclorito de sodio) se registraron durante un período de 62 h, tiempo limitado por la finalización de la pasantía. En ese tiempo se observó un crecimiento similar al reactor de 2 l con una DO₆₀₀ al tiempo final de 4,04 y una acumulación del 25,92% de PHB (Figura 22). A las 26 y 37 h se determinó biomasa seca, siendo de 0,65 y 0,92 g/l respectivamente. Estos resultados indicaron que *Ht* KHS3 estaba creciendo y acumulando PHB, pero por cuestiones de tiempo el cultivo fue detenido. Sin embargo, la experiencia permitió adquirir conocimientos sobre metodologías de escalado de cultivos en laboratorio a reactores de diferentes volúmenes y evidenció que la cepa *Ht* KH3 posee un potencial biotecnológico con capacidad de producción a mayor escala industrial.

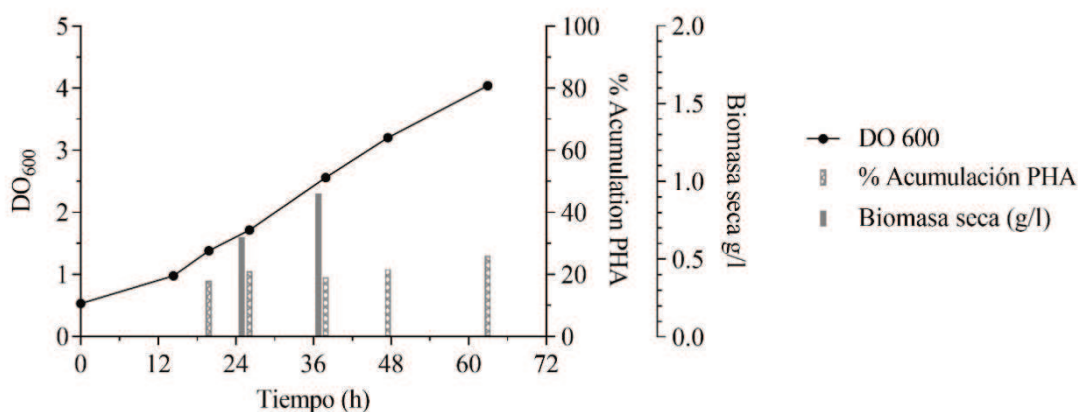


Figura 22. Evaluación del crecimiento de *Ht KHS3* y acumulación de PHB cultivo *batch* en tanque reactor agitado de 14 l. Evolución de la DO₆₀₀ (círculo negro), % de PHA (barra gris con cruces) y biomasa seca en g/l (barra gris rellena). El eje izquierdo representa la DO₆₀₀ (escala lineal), el eje derecho % de acumulación de PHA y el eje derecho exterior g/l de biomasa seca.

3.3 Generación y caracterización de una mutante por interrupción del gen *phaC1*

3.3.1 Interrupción del gen que codifica la enzima PHA sintasa *PhaC1* de *Ht KHS3*

Como se mencionó en la sección 3.1, en el genoma de *Ht KHS3* se identificaron dos genes que codifican para potenciales PHA sintasas, denominados *phaC1* y *phaC2*. Dada la localización adyacente del gen *phaC1* con el gen de la fasina *phaP1*, se decidió generar una mutante por interrupción del gen *phaC1* para analizar su contribución a la acumulación del polímero y su rol en la síntesis de PHA.

La estrategia de interrupción consistió en clonar un fragmento interno del gen en el plásmido suicida pSEVA212S, que contiene un gen de resistencia a kanamicina. La introducción del plásmido suicida en la cepa *Ht KHS3* salvaje seguida por selección con kanamicina permitiría identificar aquellas colonias que integraron el plásmido en el cromosoma por un mecanismo de recombinación homóloga. Para realizar la interrupción, se diseñaron oligonucleótidos (nAR2 y nAR3, Tabla 3) para amplificar una zona de 628 pb en el gen *phaC1* que se encuentra a 230 pares de bases río abajo del codón de iniciación de la traducción. Se amplificó el fragmento por PCR y el producto se clonó en el vector pSEVA212S. El plásmido recombinante se confirmó por PCR con oligonucleótidos que hibridan en regiones que flanquean el sitio de múltiple clonado del plásmido pSEVA212S (SF13F y SF13R, Tabla 3) y el inserto (nAR2 y nAR3, Tabla 3) (Figura 23), obteniéndose productos de amplificación de tamaño esperado. El plásmido recombinante se llamó pAR1.

La introducción del plásmido recombinante pAR1 en *Ht KHS3* se llevó a cabo por conjugación biparental en estrías superpuestas en placas de H1-2/citrato/kanamicina. De acuerdo a lo esperado, ni las estrías de la cepa dadora (*E. coli* S17 λ pir/pAR1) ni las de la cepa aceptora (*Ht KHS3*)

fueron capaces de desarrollarse en el medio por su incapacidad de crecer en citrato o por su sensibilidad a kanamicina, respectivamente. La superposición de ambas estrías dio origen al crecimiento de células de *Ht* KHS3, capaces de desarrollarse en citrato, y que incorporaron la resistencia a kanamicina gracias a la integración del plásmido en el cromosoma (Figura 23). Se obtuvieron colonias aisladas por repiques sucesivos de las conjugantes que crecieron en la placa de agar H1-2/citrato/kanamicina. La interrupción del gen se confirmó mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos nAR3-SF13F (Tabla 3), que hibridan tanto en el plásmido como en el gen *phaC1*. La amplificación del producto sólo ocurre si se trata de la cepa mutante que contiene el plásmido integrado en esa región del cromosoma. La cepa mutante se denominó *SF18*.

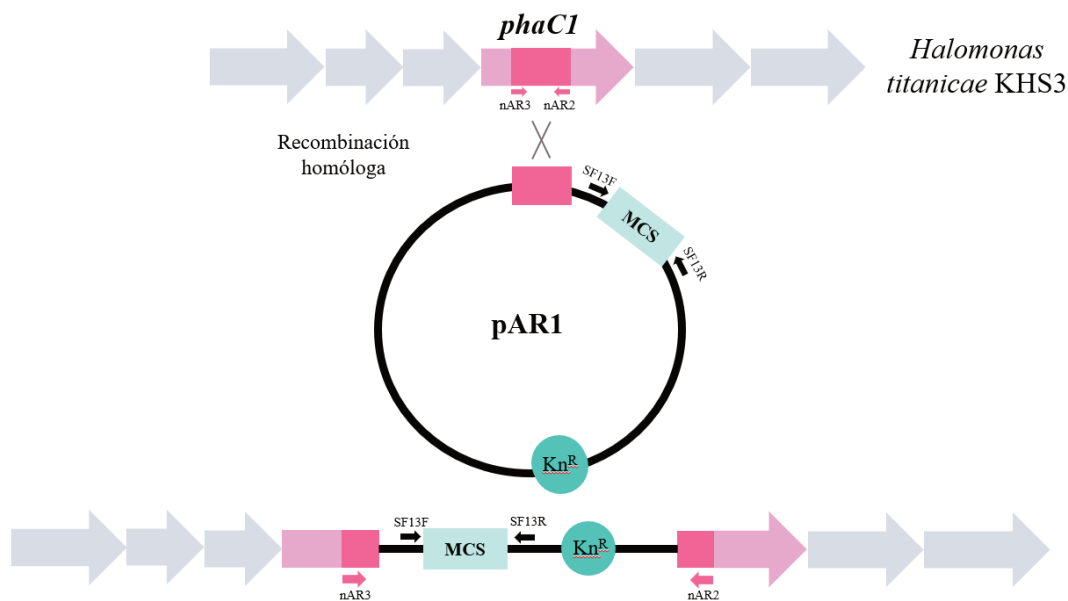


Figura 23. Representación esquemática de la estrategia de interrupción del gen *phaC1*. Se esquematiza el plásmido y el cromosoma con el sitio de recombinación. Las flechas grises representan el entorno genómico del gen blanco de *Ht* KHS3, en rosa claro el gen blanco de estudio y en rosa oscuro el fragmento del gen clonado en pAR1 que permitirá la recombinación homóloga con el cromosoma. En negro el plásmido pAR1 con la resistencia a Kn (verde) y el sitio de múltiple clonado. Con flechas negras se indican los oligonucleótidos SF13F y SF13R que hibridan en el plásmido y con flechas rosa nAR2 y nAR3 que hibridan en el gen de interés.

3.3.2 Comparación del crecimiento y acumulación de PHB entre la mutante *SF18* y la cepa salvaje

Para evaluar el rol del gen *phaC1* en el metabolismo del PHB de *Ht* KHS3, se comparó el crecimiento y la acumulación de PHA de la cepa salvaje y de la mutante en las condiciones previamente caracterizadas para la cepa salvaje *Ht* KHS3 (secciones 3.2.1, 3.2.2 y 3.3.3 de Resultados). En primer lugar, se evaluó el crecimiento por DO₆₀₀ de *Ht* KHS3 salvaje y de *SF18* en 0,25% p/v YE como única fuente de carbono (Figura 24A), condición en la cual la cepa salvaje no acumula PHB. En esas condiciones ambas cepas crecieron exactamente igual y las curvas obtenidas resultaron prácticamente superpuestas, indicando idéntico tiempo de duplicación, lo que permitió deducir que la cepa mutante *SF18* no tenía ningún problema en el crecimiento. Dado que en esta condición no se espera síntesis notoria de polímero en la cepa salvaje, no se evaluó

acumulación. A continuación, se comparó el crecimiento y la acumulación de ambas cepas en medio H1-2 con 1% p/v de glucosa como única fuente de carbono, condición de acumulación ya caracterizada para la cepa salvaje (Capítulo 2, Resultados). A diferencia de lo observado utilizando YE, en medio con glucosa 1% la cepa *SF18* mostró claros defectos de crecimiento desde el inicio de la curva (Figura 24B). Con respecto a la acumulación de PHB, la cepa salvaje acumuló un 40-50% de PHB desde las 48 h de cultivo, mientras que *SF18* no superó el 16% de acumulación a lo largo de todo el experimento. Estos resultados indican que la enzima PhaC1 es la principal responsable de la acumulación de PHA en estas condiciones y además sugieren que, bajo condiciones de crecimiento en las que hay acumulación de polímero, éste desempeña un papel fisiológico importante, dado que su ausencia impacta fuertemente en la capacidad de multiplicación de la célula.

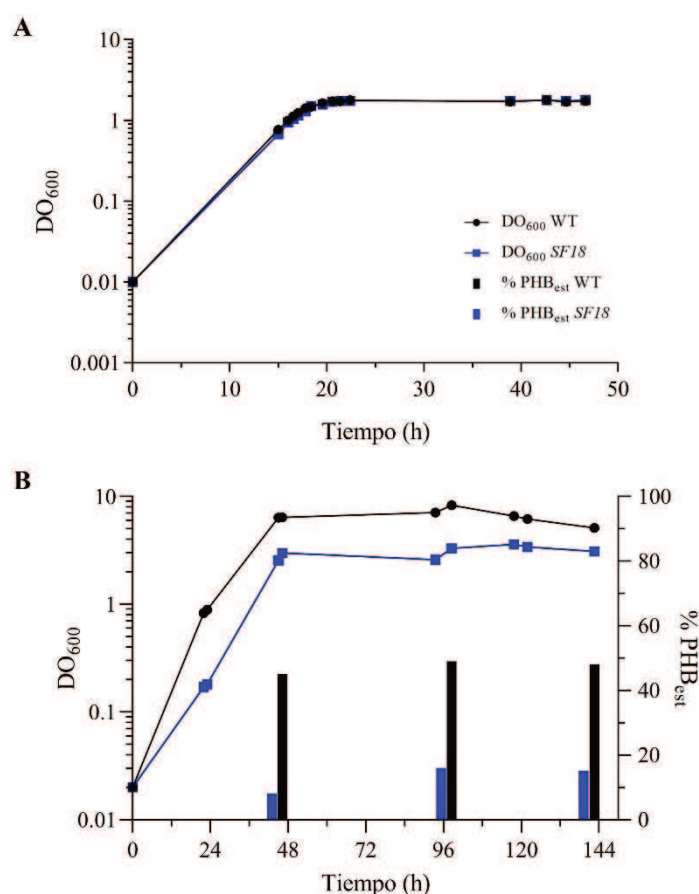


Figura 24. Crecimiento y acumulación de *Ht* KHS3 (negro) y de la mutante *SF18* (azul). Se muestra crecimiento en función de la DO₆₀₀ (líneas continuas) y acumulación de PHB por estimación con hipoclorito de sodio (barras). Se cultivaron en medio mínimo H1-2 con 0,25% p/v YE (panel A) o 1% p/v glucosa (panel B) como fuente de carbono con agitación orbital a 200 rpm, 28°C en frascos Erlenmeyer.

Para profundizar en el rol de la sintasa PhaC1 y la relación entre la capacidad de síntesis de PHA y el crecimiento celular, se comparó el comportamiento de la cepa mutante con el de la cepa salvaje en diferentes concentraciones de glicerol. En el medio con 0,25% de glicerol (condición

de no acumulación) (Figura 25A), la cepa *SF18* mostró un patrón de crecimiento prácticamente idéntico al de la cepa salvaje, y ninguna de ellas superó el 10% de PHB a lo largo de toda la curva, comportamiento similar al observado en el medio con YE. En presencia de 1,5% de glicerol (Figura 25B), el crecimiento de ambas cepas fue prácticamente idéntico durante la fase exponencial. Sin embargo, en fase estacionaria se evidenció una diferencia de hasta 2 unidades en la $DO_{600\text{máx}}$ alcanzada. En esta fase, la cepa salvaje acumuló hasta un 30% de PHB, mientras que la cepa mutante no superó el 10%. A concentraciones más elevadas de glicerol (3 y 4% p/v; Figura 25C-D), el incremento de DO_{600} durante la fase exponencial de crecimiento fue prácticamente idéntico en ambas cepas, pero nuevamente al iniciarse la fase estacionaria, los valores de DO_{600} comenzaron a divergir de manera marcada. En estas condiciones, el defecto en la capacidad de síntesis de PHB por parte de la cepa *SF18* resultó evidente: la cepa mutante no superó el 10% de acumulación en ningún caso, mientras que la cepa salvaje alcanzó niveles superiores al 70%. En conjunto, estos resultados permiten concluir que la sintasa PhaC1 es la principal responsable de la acumulación de PHA observada en estas condiciones.

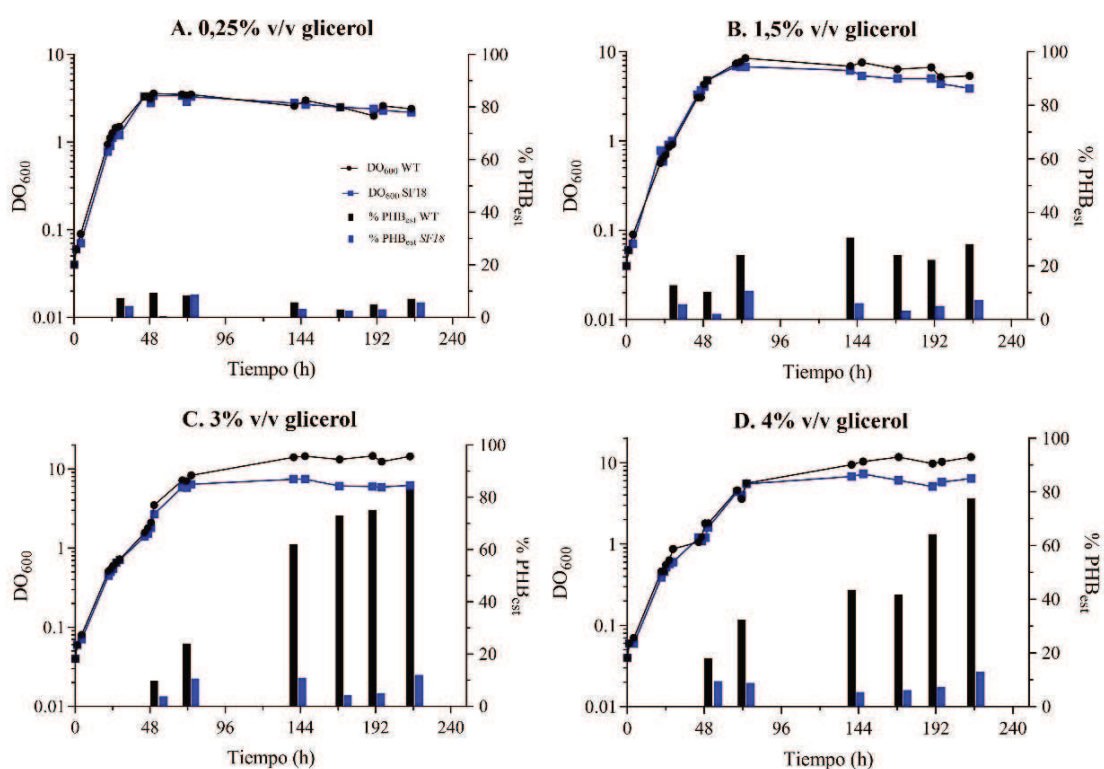


Figura 25. Crecimiento y acumulación de PHA en *Ht KHS3* (negro) y en la mutante *SF18* (azul). Se muestra crecimiento en función de la DO_{600} (líneas continuas) y acumulación de PHB por estimación con hipoclorito de sodio (barras). Se cultivaron en medio mínimo H1-2 con distintas concentraciones de glicerol (A. 0,25% v/v, B. 1,5% v/v, C. 3% v/v, D. 4% v/v) como única fuente de carbono con agitación orbital a 200 rpm, 28°C en frascos Erlenmeyer.

Los resultados obtenidos en medio con 1% de glucosa indican que en una situación fisiológica que favorece la acumulación de polímero, la incapacidad para sintetizar PHB conlleva

consecuencias desfavorables para el crecimiento. El aumento en la DO_{600} observada en la cepa *SF18* se detiene aproximadamente en el momento de la curva en el que se espera que se alcancen niveles elevados de acumulación de polímero. Esta observación lleva a pensar en que el incremento de la DO_{600} en la cepa salvaje, que alcanza valores muy altos, no refleja únicamente un aumento en el número celular, sino también modificaciones en la forma y el tamaño de los individuos. Para comparar el crecimiento de la cepa *SF18* con el de la cepa salvaje en términos de número de células, se realizaron experimentos en los que se determinó el número de unidades formadoras de colonias. Se evaluaron las UFC durante la fase exponencial de crecimiento, en la cual la DO_{600} entre ambas cepas fue similar, y durante la fase estacionaria, en la que se evidenciaron marcadas diferencias en DO_{600} y en la acumulación de polímero entre la cepa salvaje y mutante *SF18*.

Las cepas *Ht KHS3* y *SF18* se cultivaron en medio H1-2 con 3% v/v de glicerol como única fuente de carbono. Se tomaron muestras para determinar la DO_{600} , el porcentaje de acumulación y las UFC durante la fase exponencial (baja acumulación de PHB) y la fase estacionaria (alta acumulación de PHB). Como se muestra en la Tabla 7, a las 72 h de cultivo (fase exponencial), la diferencia de DO_{600} entre la cepa salvaje y la mutante fue de dos unidades y la acumulación de PHB alcanzó un 27% para *Halomonas* salvaje y un 4,96% para *SF18*. El recuento de UFC/ml fue ligeramente mayor en la cepa salvaje, en concordancia con su mayor valor de DO_{600} . A las 146 h de cultivo (fase estacionaria), la diferencia en DO_{600} y en acumulación de polímero entre las cepas se incrementó notablemente, alcanzando 21,4 unidades de DO_{600} para la cepa salvaje y 7 unidades para la mutante *SF18*. La acumulación de PHA en la cepa salvaje fue de casi 60% mientras que en *SF18* permaneció en 4,85%. El recuento de UFC/ml indicó que, en esta etapa, el cultivo de la cepa mutante *SF18* presentaba un número igual o incluso superior de células viables en comparación con la cepa salvaje. Estos resultados indican que la DO_{600} no refleja de manera real el crecimiento de *Ht KHS3* cuando la acumulación de PHB es elevada, y que la diferencia en DO_{600} entre las dos cepas se debe mayormente a diferencias de forma y tamaño de las células y no a diferencias en número de células.

Tabla 7. Crecimiento y acumulación de *Ht KHS3* y *SF18* cultivadas en medio H1-2 con 3% v/v de glicerol como única fuente de carbono. Se presentan los valores de DO_{600} , el porcentaje de acumulación (estimado por el método del hipoclorito) y las UFC/ml para ambas cepas en dos tiempos de cultivo (72 y 146 h).

	72 h		146 h	
	Cepa salvaje	SF18	Cepa salvaje	SF18
DO_{600}	7,4	5,2	21,4	7
% PHB_{est}	27%	4,96%	59,93%	4,85%
UFC/ml	$2,28 \times 10^9$	$1,97 \times 10^9$	3×10^8	$4,53 \times 10^8$

Además, los datos de UFC/ml muestran que, durante la etapa de acumulación de PHA, el número de células viables disminuye al menos un orden de magnitud, pero se mantiene activa la síntesis del polímero.

Luego de confirmar que el gen *phaC1* es el principal responsable de la acumulación de PHA en *Ht* KHS3, se intentó generar una mutante por interrupción en el gen *phaC2* con el objetivo de evaluar su posible implicancia en el crecimiento y la acumulación del polímero. Sin embargo, debido a las dificultades asociadas a la manipulación genética en *Halomonas*, los múltiples intentos realizados no permitieron obtener la recombinación homóloga necesaria para la inserción del plásmido en la cepa salvaje *Ht* KHS3 durante el transcurso de esta tesis.

3.4 Diseño experimental estadístico y optimización de la producción de biomasa y PHB

En esta sección se aplicaron diseños experimentales estadísticos para la identificación y optimización de las variables que afectan la producción de biomasa y PHB por *Ht* KHS3. Las condiciones determinadas fueron posteriormente utilizadas como base para el diseño del proceso de producción en dos etapas desarrollado en la sección 3.5.

3.4.1 Evaluación de factores por diseño de Plackett-Burman

El diseño experimental estadístico permite analizar el efecto simultáneo de diversas variables en un número reducido de experimentos. En primer lugar, se utilizó un diseño de *screening* para evaluar qué componentes del medio mínimo H1-2 y qué condiciones de cultivo tenían efecto sobre la producción de biomasa y de PHB. Se empezó con un diseño de Plackett-Burman, diseño ideal para situaciones en las cuales hay muchos factores y se desconoce su influencia sobre las respuestas. De esta manera se pudo analizar el efecto de 9 factores en 12 experimentos, asumiendo que el diseño sólo calcula los efectos principales y no las interacciones entre los factores (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008). Los factores analizados fueron concentración de glicerol, sulfato de amonio, NaCl, fosfatos de potasio, sulfato de magnesio (Mg) y cloruro de hierro (Fe), pH inicial, tiempo de cultivo y volumen de llenado (Tabla 8, columna Niveles). Los nueve factores y sus niveles se cargaron en el programa Design Expert® y éste arrojó 12 combinaciones para experimentar cuya composición exacta y los resultados obtenidos se detallan en la Tabla A1 del Anexo. Se prepararon las 12 combinaciones en frascos Erlenmeyer de 100 ml con un volumen final de medio de 40 o 100 ml según corresponda. Los cultivos se inocularon con *Ht* KHS3 a una DO₆₀₀ de 0,02 y se incubaron a 28°C con agitación orbital a 200 rpm. Al tiempo final (4 o 7 días) se determinó DO₆₀₀, biomasa seca (g/l), PHB seco (g/l) y % PHB seco. Los resultados de biomasa seca (g/l) y de PHB (g/l) seco recolectados se colocaron en la matriz del programa y se analizaron las respuestas utilizando el análisis de varianza (ANOVA, Tabla 8).

Tabla 8. Análisis estadístico del diseño Plackett-Burman para biomasa seca y PHB seco como variables de respuesta. Se indican las variables estudiadas y sus niveles (+1; -1), con el valor p correspondiente a cada variable, obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados de biomasa seca (g/l) y PHB seco (g/l). En la primera fila (Modelo) se muestra la significancia del modelo para ambas respuestas. En negrita se muestran los valores de p para los factores con efecto significativo (valor de significancia $p < 0,05$) sobre la respuesta. (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo; * factor no incluido en el modelo.

	Niveles		Biomasa seca (g/l)	PHB seco (g/l)
	-1	+1	Valor p	
Modelo			0,0213	0,0042
Glicerol	20 g/l	50 g/l	0,0756	0,00288 (+)
(NH₄)₂SO₄	0,5 g/l	3 g/l	0,0365 (+)	0,0195 (-)
NaCl	7,5 g/l	30 g/l	*	*
MgSO₄	0,5 mM	3 mM	*	0,3395
Tiempo	4 días	7 días	0,0649	*
Volumen	40 ml	100 ml	0,0041 (-)	0,0008 (-)
pH inicial	6,5	7,5	0,0152 (+)	0,2303
Fosfatos	K ₂ HPO ₄	17,62 mM	0,1345	0,0099 (+)
	KH ₂ PO ₄	32,15 mM		
FeCl₃	0,9 µM	3,7 µM	0,2139	0,0362 (+)

Cuando se corre solo una réplica de cada experimento, como en este caso, es necesario excluir algunos de los términos no significativos para aumentar los grados de libertad residuales y mejorar la calidad de las pruebas (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008, pp. 370-371). Tanto para la biomasa seca como para el PHB seco se obtuvieron modelos significativos, con valores p de 0,0213 y 0,0042 respectivamente (Tabla 8). Estos resultados indican que sólo hay un 2,13% y 0,42% de probabilidades de que algún valor p del modelo sea tan grande debido al ruido (variabilidad aleatoria). En el caso de la biomasa, el modelo con mejor ajuste fue el que no contempló los términos de concentración de Mg y de NaCl. La concentración de amonio y el pH inicial afectaron de manera significativa y positiva la producción de biomasa, es decir, a mayor concentración de amonio y pH inicial, mayor producción de biomasa. Por otra parte, el volumen de llenado afectó de manera significativa pero negativa, obteniéndose menor producción de biomasa a mayor volumen de llenado y la concentración de glicerol, de fosfatos y Fe, y el tiempo no tuvieron efecto significativo sobre la respuesta (Tabla 8, columna biomasa seca). Al analizar la producción de PHB, el modelo que mejor ajuste tuvo fue el que no contempló los términos de concentración de NaCl y tiempo. La concentración de glicerol, fosfatos y Fe afectaron de manera significativa y positiva a la producción de PHB, obteniéndose mayor producción a mayor concentración. Contrariamente a lo observado para la producción de biomasa, la concentración de amonio tuvo un efecto significativo pero negativo sobre la respuesta. De igual manera, en la

biomasa el volumen de llenado tuvo un efecto significativo y negativo. La concentración de Mg y el pH inicial no tuvieron efecto significativo (Tabla 8, columna PHB).

En función de estos resultados se tomaron decisiones para disminuir el número de factores y realizar un diseño que permita estudiar con mayor profundidad aquellas variables más relevantes. En el caso del pH inicial y de la concentración de glicerol y amonio, dada su significancia en las respuestas y de acuerdo a lo observado, se redefinió el espacio experimental para continuar con su estudio. También se decidió seguir estudiando la concentración de fosfatos y Fe dado su efecto significativo en la producción de PHB. Dado que la concentración de Mg y NaCl no fueron significativas para ninguna respuesta, el Mg se fijó en 1 mM que es la concentración normal del medio mínimo H1-2 comúnmente utilizado y la concentración de NaCl se definió en el valor más alto estudiado (30 g/l) con el objetivo de disminuir posibles contaminaciones con microorganismos no halófilos. Por cuestiones prácticas, el tiempo se fijó en 4 días y el volumen de llenado en 40 ml, teniendo en cuenta el efecto negativo sobre ambas respuestas al emplear un mayor volumen. De este modo, con este primer diseño experimental, con 12 experimentos se pudieron estudiar 9 factores de los cuales cuatro fueron filtrados y los demás siguieron en estudio en diseños más complejos.

3.4.2 Diseño factorial fraccionado

Para profundizar el estudio de las variables y sus interacciones se utilizó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} de 5 variables a dos niveles cada una (-1 y +1). Los diseños factoriales fraccionados son versiones reducidas de los factoriales completos, en los cuales se elige adecuadamente una fracción de los tratamientos con la intención de estudiar el efecto de los factores utilizando un menor número de experimentos, respecto a uno completo. La teoría se basa en la jerarquización de los efectos, dando más importancia a los efectos principales, seguidos de las interacciones dobles, triples, cuádruples, etc. De esta manera se obtiene la misma información con la mitad del costo experimental. Los puntos centrales corresponden al “nivel 0” y son corridas experimentales formadas por el valor intermedio de todos los factores. Funcionan como réplicas y además permiten ver y estudiar la curvatura de los efectos, es decir, si entre los valores de respuesta para los niveles estudiados existe un valor mínimo o un máximo (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008, pp. 260-285). Las variables estudiadas fueron pH inicial y concentración de glicerol, amonio, fosfatos y Fe (Tabla 9). La cantidad de combinaciones a estudiar fue de $2^4=16$ combinaciones. Debido a la imposibilidad experimental de realizar todas las combinaciones de manera simultánea, el diseño se fraccionó en dos bloques, con dos puntos centrales por bloque, lo que resultó en un total de 20 corridas experimentales. La composición exacta de cada tratamiento y sus resultados se muestran en la Tabla A2 del Anexo. La concentración de Mg y de NaCl fue la misma en todos los medios, 1 mM y 30 g/l, respectivamente. Se prepararon los 20

tratamientos en frascos Erlenmeyer, se ajustó el pH y posteriormente se esterilizó. Los frascos Erlenmeyer correspondientes al bloque 1 se inocularon con un cultivo de *Ht* KHS3 y se incubaron a 28°C en agitación orbital a 200 rpm. A los 4 días se determinó DO₆₀₀, biomasa seca (g/l), PHB seco (g/l) y % PHB seco, para evaluar el crecimiento y la acumulación del polímero. Para determinar los efectos significativos de cada variable y de sus interacciones sobre las respuestas biomasa (g/l) y PHB seco (g/l) se utilizó el análisis de varianza (ANOVA, Tabla 9).

Tabla 9. Análisis estadístico de un diseño factorial fraccional 2⁵⁻¹ para biomasa seca y PHB seco como variables de respuesta. Se indican las variables estudiadas y sus niveles (+1; 0; -1), con el valor p correspondiente a cada variable, obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados de biomasa seca (g/l) y PHB seco (g/l). En la primera fila se muestra la significancia del modelo para ambas respuestas. En negrita se muestran los valores p para los factores con efecto significativo (valor de significancia p<0,05) sobre la respuesta. (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo; * factor no incluido en el modelo.

		Niveles			Biomasa seca (g/l)	PHB seco (g/l)
		+1	0	-1	Valor p	
Modelo					0,0005	0,0008
F A C T O R E S	A- Glicerol	5 g/l	27,5 g/l	50 g/l	0,0331 (+)	0,0468 (+)
	B- (NH₄)₂SO₄	0,25 g/l	1,13 g/l	2 g/l	< 0,0001 (+)	0,0140 (-)
	C- pH inicial	7	7,5	8	0,000013 (+)	0,0166 (+)
	D- Fosfatos	K ₂ HPO ₄	17,62 mM	26,45 mM	0,0181 (-)	*
		KH ₂ PO ₄	32,15 mM	48,23 mM		
	E- FeCl₃	0,9 µM	2,3	3,7 µM	0,0086 (+)	0,0468 (+)
I N T E R A C C I O N E S	AB				0,0003 (+)	0,0006 (+)
	AC				0,0221 (+)	*
	AD				0,7389	*
	AE				0,0066 (+)	*
	BD				0,0768	*
	DE				0,6320	*

Para ambas respuestas, producción de biomasa y PHB, se obtuvieron modelos significativos, con valores p de 0,0005 y 0,0008, respectivamente (Tabla 9). Con respecto a la producción de biomasa, todos los factores influyeron de manera significativa en la respuesta. Las concentraciones de glicerol, Fe y amonio, y el pH inicial afectaron de manera positiva a la producción de biomasa, mientras que los fosfatos lo hicieron de manera negativa. Además, las

interacciones glicerol-amonio (AB), glicerol-pH inicial (AC) y glicerol-Fe (AE) resultaron significativas (el efecto que uno de los factores tiene sobre la respuesta depende del nivel del otro) y positivas (Tabla 9, sección interacciones). Por ejemplo, en el caso de la interacción amonio-glicerol (AB) para biomasa (Figura 26), se observa que el efecto de la concentración de glicerol sobre la respuesta depende del nivel de amonio. Cuando el amonio se encuentra en su nivel más bajo (-1, línea negra), al aumentar la concentración de glicerol de -1 a +1, la pendiente de la gráfica que une los valores de respuesta es negativa, lo que indica una disminución en la producción de biomasa. En cambio, cuando el nivel de amonio es alto (+1, línea roja), la pendiente se invierte y aumenta, evidenciando una mayor producción de biomasa. Resultados en el mismo sentido se observaron para las otras dos interacciones. En la interacción glicerol-pH, se evidenció que la pendiente de la gráfica de respuesta fue mayor cuando el pH se encontraba en su nivel alto (+1) que cuando estaba en el nivel bajo (-1), indicando un efecto positivo del pH elevado sobre la biomasa. La interacción entre el glicerol y el Fe muestra que niveles más altos de Fe potencian el efecto del glicerol sobre la biomasa, observado en una pendiente más pronunciada en la gráfica de respuesta. Por otro lado, las demás interacciones glicerol-fosfatos (AD), amonio-fosfatos (BD) y amonio-Fe (BE) no afectaron la producción de biomasa.

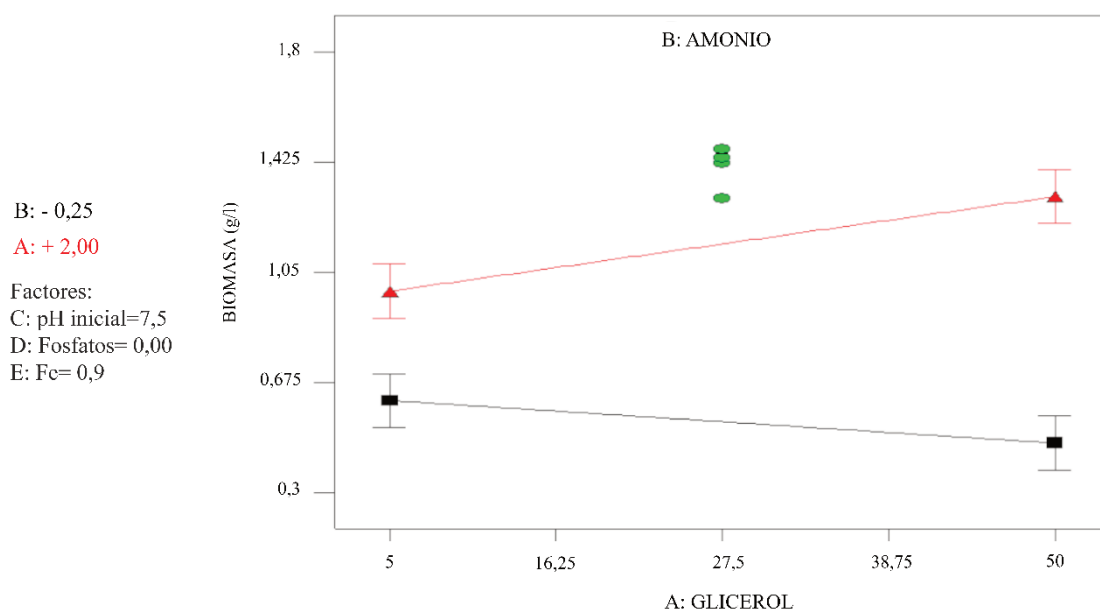


Figura 26. Gráfica de interacción entre la concentración de glicerol y amonio en la producción de biomasa. Se muestran los valores medios con sus correspondientes errores estándar para dos niveles de amonio: bajo (0,250 g/l, línea negra y cuadrados negros) y alto (2 g/l, línea roja y triángulos rojos). Los factores pH, fosfatos y Fe se mantuvieron constantes en 7,50; 0 mM y 2,30 μ M, respectivamente. Los círculos verdes indican los 4 puntos centrales.

En el caso de la respuesta PHB, el modelo que mejor ajuste estadístico tuvo fue aquel que no contempló la mayoría de las interacciones (AC, AD, AE, BD y DE) y la concentración de fosfatos. Al igual que en la biomasa, la concentración de glicerol y de Fe, el pH inicial y la interacción

glicerol-amonio (AB) resultaron significativas y positivas también para la producción de PHB. Por el contrario, la concentración de amonio afectó de manera significativa pero negativa la producción de PHB. En función de estos resultados se analizó qué variables optimizar para obtener la mejor producción de biomasa y PHB en la región experimental estudiada. La concentración de glicerol y amonio tuvieron un efecto crucial en las dos respuestas, además de que su interacción también fue significativa en ambas respuestas, por lo cual fueron variables a optimizar. Dado el efecto significativo de la concentración de Fe y de su interacción con la concentración de glicerol, se decidió estudiar y optimizar también esta variable. En el caso del pH y los fosfatos, se observó que, a mayor pH inicial, mejor respuesta, pero los fosfatos tuvieron un efecto negativo en la biomasa. Considerando que los fosfatos además están involucrados en la regulación del pH, se decidió optimizar el pH inicial y fijar la concentración de fosfatos en el valor intermedio estudiado (punto central: K_2HPO_4 26,45 mM y KH_2PO_4 48,23 mM).

3.4.3 Optimización de las variables por Diseño Central Compuesto (DCC).

La producción de biomasa y PHB se optimizaron mediante la RSM, una estrategia experimental y de análisis que permite encontrar las condiciones óptimas de operación dentro de la región experimental estudiada. El DCC es el diseño de segundo orden más utilizado. Los diseños de segundo orden permiten estudiar tanto los efectos lineales como los de interacción y los efectos cuadráticos o de curvatura. En estos diseños la región experimental está compuesta por tres tipos de niveles: dos niveles factoriales ($-1/+1$; porción factorial), los puntos centrales (0) y dos puntos sobre cada eje a una distancia α del origen ($-\alpha/+ \alpha$), que son la porción axial o puntos axiales (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008, pp. 413-420). La manera en que se ensamblan y el DCC resultante se muestran en la representación de la Figura 27. La porción axial ($-\alpha/+ \alpha$) es calculada para el diseño para garantizar la rotabilidad y la ortogonalidad de los bloques.

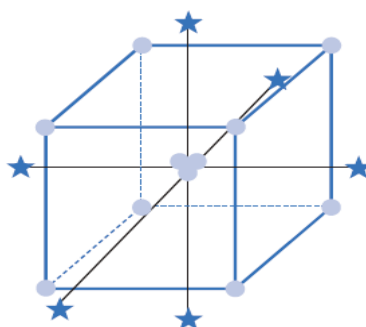


Figura 27. Matriz experimental de un diseño central compuesto. Se grafica la matriz de un DCC por 3 factores. Cada vértice representa un punto de diseño o tratamiento, los puntos en el centro son los puntos centrales y las estrellas representan los puntos axiales o niveles α , delimitando la región experimental. Las conclusiones que se obtengan en este experimento sólo tienen validez en esta región. Imagen extraída de Gutiérrez Pulido & Salazar, 2008.

Las variables a optimizar fueron concentraciones de glicerol, de amonio y de hierro, y pH inicial por un DCC (Tabla 10, columna niveles). El número de corridas experimentales está dado por el

número de variables a analizar y el número de puntos centrales. Para estudiar estos 4 factores se seleccionó una propuesta en 2 bloques con 6 puntos centrales y un total de 22 corridas experimentales. La composición exacta de cada tratamiento y sus resultados se muestran en la Tabla A3 del Anexo. Se prepararon las 22 combinaciones, se ajustó el pH y se esterilizó. El bloque 1 se inoculó con un cultivo de *Ht* KHS3 y se incubó a 28 °C y 200 rpm. A los cuatro días se midieron DO₆₀₀, biomasa seca, PHB seco y % de PHB seco para evaluar el crecimiento y la acumulación del polímero. El bloque 2 se realizó de la misma manera. Los datos experimentales obtenidos del diseño se analizaron mediante el procedimiento de regresión de superficie de respuesta utilizando la siguiente ecuación polinómica de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (9)$$

donde Y es la respuesta prevista por el modelo, x_i las variables independientes analizadas, β los coeficientes estimados: β_0 , el término de compensación, β_i , los coeficientes lineales, β_{ii} , los coeficientes cuadráticos, β_{ij} , los coeficientes de interacción; y ε es el error experimental. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para estimar estos parámetros estadísticos (Tabla 10). La importancia de la Ecuación 9 y sus términos se evaluaron mediante la prueba F y la calidad del ajuste mediante el coeficiente de correlación, R^2 . Se utilizó el software Design Expert® para los cálculos y gráficas de la superficie de respuesta.

Para ambas respuestas, producción de biomasa seca (g/l) y PHB seco (g/l), se obtuvieron modelos significativos con valores p de 0,0005 y de 0,0375, respectivamente (Tabla 9). A partir del análisis de las variables resultó que para la producción de biomasa el único efecto principal que tuvo un efecto significativo y positivo fue la concentración de sulfato de amonio. Además, fueron significativas y positivas las interacciones del glicerol con el pH inicial, del glicerol con el Fe y del amonio con el pH. En el caso de la producción de PHB, el pH inicial tuvo un efecto significativo y positivo.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se procedió a una optimización numérica de las variables en la región experimental estudiada. Se le indicó al programa que optimice las respuestas y variables teniendo en cuenta que maximice la concentración de glicerol, minimice la concentración de amonio y Fe, y que optimice el pH inicial dentro del rango estudiado (Tabla 11A). Esto dio como resultado 27 posibles combinaciones de las variables que predicen la “mejor” respuesta con un cierto índice de deseabilidad (Tabla A4 del Anexo). La función de deseabilidad es un indicador de la predicción, transforma los valores predichos por el modelo en una escala adimensional entre 0 y 1, para indicar qué tan deseables son. Si el indicador es igual a 1, significa que la respuesta predicha toma su valor máximo deseable. Si es igual a 0, la respuesta predice un valor inaceptable (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008, pp. 441-447). Si bien se tiene en cuenta

este índice para elegir el mejor óptimo, también se consideran las variables y el objetivo particular de cada experimento. De las 27 predicciones del programa se seleccionó para validar la condición que estimó la máxima producción de PHB con un índice de deseabilidad de 0,94.

Tabla 10. Análisis estadístico de un diseño central compuesto para biomasa seca y PHB seco como variables de respuesta. Se indican las variables estudiadas y sus niveles (+ α ; +1; 0; -1; - α), con el valor p correspondiente a cada variable, obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados de biomasa seca (g/l) y PHB seco (g/l) de la Tabla 3 del Anexo. En la primera fila se muestra la significancia del modelo para ambas respuestas. En negrita se muestran los factores con efecto significativo (valor de significancia $p < 0,05$) sobre la respuesta. (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo; * factor no incluido en el modelo.

Niveles							Biomasa seca (g/l)	PHB seco (g/l)
							Valor p	
Modelo							0,0005	0,0375
FACTORES	A- Glicerol	5 g/l	14,12 g/l	27,5 g/l	40,87 g/l	50 g/l	0,9405	*
	B- (NH4)2SO4	0,25 g/l	0,6 g/l	1,13 g/l	1,65 g/l	2 g/l	0,0017 (+)	0,1476
	C- pH inicial	7	7,2	7,5	7,8	8	0,2809	0,0243 (+)
	D- FeCl3	0,9 μM	1,47 μM	2,3 μM	3,13 μM	3,7 μM	0,692	0,0796
INTERACCIONES	AB						0,0741	0,3825
	AE						0,0003	*
	AD						0,0040	*
	BC						0,0033	*
	BD						0,0088	*
	CD						0,1966	0,1007

Esta solución predice un óptimo de 0,65 g/l de PHB con 40,88 g/l de glicerol, 0,61 g/l de amonio y 1,47 μ M de Fe a un pH inicial de 7,8 (Tabla 11B). Se validó por triplicado. Las concentraciones de fosfatos, Mg y NaCl fueron las mismas en las tres condiciones a validar (K₂HPO₄ 26,45 mM, KH₂PO₄ 48,23 mM, 1 mM y 30 g/l, respectivamente). Se inocularon con un cultivo de *Ht* KHS3 y se incubaron a 28°C con agitación orbital a 200 rpm. A los cuatro días se determinó biomasa seca (g/l), PHB seco (g/l) y DO₆₀₀. La producción de PHB fue ligeramente mayor a la predicha por el modelo 0,8 g/l (Tabla 11C), pero dentro del intervalo de confianza establecido (0,37-1,04 g/l de PHB).

Tabla 11. Optimización numérica de la producción de PHB por DCC. En la parte A de la tabla se muestran las variables y la respuesta a optimizar, y los límites de la región experimental dentro de la cual se optimiza. La columna objetivo es lo que se le indicó al programa que haga con estas variables de acuerdo a lo observado en el análisis del diseño. La parte B muestra el óptimo predicho para la producción de PHB, con su índice de deseabilidad. En la parte C se muestran los resultados de la validación del óptimo.

A		B		C	
Variable	Objetivo	Límite inferior	Límite mayor	Óptimo predicho	Resultados
Glicerol	Maximizar	14,12 g/l	40,87 g/l	40,88 g/l	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	Minimizar	0,6 g/l	1,64 g/l	0,61 g/l	-
pH inicial	En el rango	7,2	7,79	7,8	-
FeCl ₃	Minimizar	1,47 µM	3,13 µM	1,47 µM	-
PHB	Maximizar	0,12 g/l	0,77 g/l	0,65 g/l	0,803 +/- 0,3 g/l
Biomasa	En el rango	0,58 g/l	3,87 g/l	1,2 g/l	1,318 +/- 0,15 g/l
Deseabilidad				0,94	

Además de la validación del óptimo, se evaluaron dos condiciones experimentales adicionales derivadas del análisis de los resultados obtenidos con el objetivo de comprobar su reproducibilidad (Tabla 12). Teniendo en cuenta la mayor producción de PHB a mayor pH inicial, se probaron, por un lado, las condiciones óptimas predichas por el programa validada anteriormente, pero con un pH inicial más elevado de 8,5. Por otro lado, el análisis de la tabla A3 del Anexo permitió observar que uno de los experimentos arrojó una producción de PHB de 0,77 g/l, superior al valor predicho como óptimo por el programa (0,65 g/l), por lo que las condiciones de ese experimento particular también se reprodujeron. Se procedió de igual manera que en la validación del óptimo. Con respecto al estudio del óptimo, pero a mayor pH, no se observaron mejoras significativas (Tabla 12B). Por el contrario, para el tratamiento con mayor producción de PHB se obtuvo 0,98 g/l del polímero seco, mayor a la esperada y mayor a la predicha por el modelo (Tabla 12B). Como se observa, el tratamiento adicional alcanzó una producción de PHB de 0,98 g/l de PHB, superior a la obtenida en el punto óptimo predicho por el modelo, 0,80 g/l. Cabe destacar que dicho punto óptimo corresponde al resultado que satisface simultáneamente todas las condiciones establecidas en la optimización numérica, y no necesariamente al valor máximo de PHB considerado de forma individual.

De esta primera experiencia en el diseño experimental estadístico, se hallaron dos óptimos de producción de PHB para la región experimental estudiada, uno predicho por el sistema y otro obtenido empíricamente, aunque no se encontró la región del óptimo. En líneas generales, estos

análisis permitieron ver cómo los diferentes componentes del medio que se utilizó y las condiciones de cultivo afectan tanto a la producción de biomasa como a la de PHB y además cómo algunas de ellas dependen de las otras.

Tabla 12. Condiciones experimentales y resultados para evaluar la reproducibilidad de los tratamientos adicionales. Parte A. Condiciones experimentales elegidas para estudiar su reproducibilidad. **Parte B.** Resultados de DO₆₀₀, biomasa seca y PHB seco para las 2 condiciones estudiadas. Nota: Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar (n = 3).

A- Condiciones experimentales		
	Óptimo a mayor pH	Tratamiento con producción de PHB de 0,77 g/l
Glicerol	40,88 g/l	27,5 g/l
(NH₄)₂SO₄	0,60 g/l	1,13 g/l
pH inicial	8,5	7,5
FeCl₃	1,47 μ M	0,90 μ M
B- Resultados experimentales		
DO₆₀₀	5,13 $\pm$ 0,85	6,99 $\pm$ 0,64
Biomasa seca	1,48 $\pm$ 0,25	2,05 $\pm$ 0,21
PHB seco	0,80 $\pm$ 0,2	0,98 $\pm$ 0,14

3.5 Diseño de un proceso de producción de PHB en dos etapas

Los resultados de la primera experiencia en diseño experimental permitieron evaluar el efecto de los diferentes componentes del medio y las condiciones de cultivo sobre la producción de biomasa y de PHB. Se observó que no todos los factores influyen de la misma manera en ambas respuestas. Como ejemplo para resaltar, el amonio favorece significativamente y de manera positiva la producción de biomasa, mientras que muestra un efecto negativo sobre la de PHB. Por otra parte, se comprobó que es posible realizar cultivos con alta concentración de sal, lo que permitió trabajar sin condiciones de esterilidad, incluso en reactores (tal como se detalla en la sección 3.2.7 de Resultados). En función de estos resultados, se diseñó un experimento de producción en dos etapas con el objetivo de optimizar de manera independiente ambas respuestas, la obtención inicial de una gran cantidad de células seguida de la acumulación de PHB. La primera etapa, destinada a la producción de biomasa, se llevó a cabo bajo condiciones estériles para asegurar el crecimiento de *Ht* KHS3 libre de contaminación en esta fase crítica. Una vez obtenido un cultivo de *Halomonas* de alta densidad celular, se inició con la segunda etapa orientada a la producción de PHB. Este esquema en dos etapas no sólo permitió optimizar cada fase por separado, sino que también ofreció la posibilidad de evaluar el uso de fuentes de carbono alternativas, por ejemplo, fuentes provenientes de desechos, en la producción de PHB.

3.5.1 Etapa 1: producción de biomasa

3.5.1.1 Análisis de las variables que influyen en la producción de biomasa

Con el objetivo de obtener cultivos con alta concentración de células en corto tiempo, se estudió la influencia de la concentración de glicerol, amonio, NaCl, Fe, temperatura, volumen de llenado, fortalecimiento con YE y tiempo de cultivo sobre la producción de biomasa (Tabla 13, columna niveles) mediante un diseño factorial fraccionado 2^{8-4} , de 8 variables a dos niveles cada una (-1; +1). La cantidad de combinaciones a estudiar fue de $2^4=16$ combinaciones que se realizaron en dos bloques, con dos puntos centrales por bloque, resultando en 20 corridas experimentales. La composición exacta de cada tratamiento y sus resultados se muestran en la Tabla A5 del Anexo. Se prepararon las 22 combinaciones, se ajustó el pH y se esterilizó. El bloque 1 se inoculó con un cultivo de *Ht* KHS3 y se incubó en las condiciones correspondientes (Tabla 13), al cabo de las cuales se determinó biomasa seca (g/l) y DO_{600} para evaluar el crecimiento. El bloque 2 se realizó de la misma manera. Para determinar los efectos significativos de cada variable y de sus interacciones se utilizó el análisis de varianza (ANOVA, Tabla 13).

El modelo fue significativo con un valor $p < 0,0001$ (Tabla 13), lo que indica que sólo hay un 0,01% de posibilidades de que algún valor p del modelo sea tan grande debido al ruido. El modelo que mejor ajuste estadístico tuvo fue aquel que no contempló la concentración de NaCl, volumen de llenado y las interacciones AC, AF y AH. Las variables concentración de glicerol, concentración de amonio, fortalecimiento con YE y tiempo afectaron de manera significativa y positiva la producción de biomasa. La temperatura afectó la respuesta de manera significativa pero negativa y la concentración de Fe no tuvo efecto significativo. Además, las interacciones glicerol-amonio (AB) y glicerol-YE (AG) resultaron significativas y positivas; mientras que las interacciones glicerol-Fe (AD) y glicerol-temperatura (AE) fueron significativas y negativas. En función de estos resultados se analizó qué variables optimizar para obtener la mejor producción de biomasa en la región experimental estudiada. La concentración de NaCl y el volumen fueron variables no incluidas en el modelo, por lo que se decidió fijar ambas en su mayor nivel estudiado. La concentración de NaCl se fijó en 60 g/l para disminuir la potencial contaminación con microorganismos no halófilos en la segunda etapa y el volumen en 40 ml para tener mayor cantidad de cultivo. Dado que el objetivo era producir la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible, se decidió fijar el tiempo en 24 h, tiempo suficiente para ver el efecto de la variable en la respuesta. Si bien el efecto del Fe por sí solo no resultó significativo, su interacción negativa con el glicerol sí lo fue, lo que indica que, cuando la concentración de Fe se encontraba en su nivel más alto, el glicerol ejerció un efecto negativo sobre la producción de biomasa. En cambio, a menor concentración de Fe y mayor de glicerol, se obtuvo una mayor producción de biomasa. Por esta razón, la concentración de Fe se fijó en el valor más bajo estudiado (0,9 μ M). La

temperatura afectó de manera significativa y negativa la producción de biomasa, además de que su interacción significativa con el glicerol también fue negativa, por lo que se la fijó en el menor valor estudiado 28°C. Por último, la concentración de glicerol, amonio y extracto de levadura tuvieron un efecto crucial en la producción de biomasa, además de que la interacción del glicerol con la concentración de amonio y el YE fue significativa, por lo cual fueron las variables a optimizar.

Tabla 13. Análisis estadístico de un diseño factorial fraccional 2⁸⁻⁴ para biomasa seca como variable de respuesta. Se indican las variables estudiadas y sus niveles (-1; 0; +1), con el valor p correspondiente a cada variable, obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados de biomasa seca (g/l) de la Tabla A5 del Anexo. En la primera fila se muestra la significancia del modelo para la respuesta. En negrita se muestran los factores con efecto significativo sobre la biomasa seca. (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo; *factor no incluido en el modelo.

Niveles					Biomasa seca (g/l)
		+1		-1	Valor p
Modelo		< 0,0001			
FACTORES	A- Glicerol	2 g/l	13,5 g/l	25 g/l	0,01114 (+)
	B- (NH4)2SO4	0,25 g/l	1,63 g/l	3 g/l	0,0014 (+)
	C- NaCl	15 g/l	37,5 g/l	60 g/l	*
	D- FeCl3	0,9 µM	2,3 µM	3,7 µM	0,1095
	E- Temperatura	28 °C	32,5 °C	37 °C	0,0045 (-)
	F- Volumen	20 ml	30 ml	40 ml	*
	G- YE	0	0,03 % p/v	0,05 % p/v	< 0,0001 (+)
	H- Tiempo	18 h	32 h	46 h	< 0,0001 (+)
INTERACCIONES	AB	0,0022 (+)			
	AC	*			
	AD	0,0142 (-)			
	AE	0,0491 (-)			
	AF	*			
	AG	0,010 (+)			
	AH	*			

3.5.1.2 Optimización de la producción de biomasa

Se optimizó la producción de biomasa en corto tiempo mediante la RSM. Las variables a optimizar fueron concentración de amonio, glicerol y YE por un diseño central compuesto de 3

variables con 5 niveles cada una ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) (Tabla 14, columna niveles). Se seleccionó una propuesta en 2 bloques incluyendo 3 puntos centrales por bloque en un total de 16 corridas experimentales. La composición exacta de cada tratamiento y sus resultados se presentan en la Tabla A6 del Anexo. Se prepararon las 16 combinaciones, se ajustó el pH y se esterilizaron. El bloque 1 se inoculó con un cultivo de *Ht* KHS3 y se incubó a 28 °C y 200 rpm. A las 24 h se determinó DO₆₀₀ y biomasa seca para evaluar el crecimiento. El bloque 2 se realizó de la misma manera. Los datos experimentales obtenidos del diseño se analizaron mediante el procedimiento de regresión de superficie de respuesta. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA, Tabla 14) para estimar los parámetros estadísticos. Se utilizó el software Design Expert® para los cálculos y gráficas de la superficie de respuesta.

Tabla 14. Análisis estadístico de un diseño central compuesto para biomasa seca como variable de respuesta. Se indican las variables estudiadas y sus niveles ($+\alpha$; +1; 0; -1; $-\alpha$), con el valor p correspondiente a cada variable, obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados de biomasa seca (g/l) de la Tabla A6 del Anexo. En la primera fila se muestra la significancia del modelo para la respuesta. En negrita se muestran los factores con efecto significativo (valor de significancia $p < 0,05$) sobre la respuesta. (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo.

		Niveles					Biomasa seca (g/l)
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	Valor p
Modelo							0,0052
F A C T O R E S	A-Glicerol	0,25 g/l	4,5 g/l	14,75 g/l	25 g/l	29,5 g/l	0,006
	B- (NH₄)₂SO₄	0,10 g/l	0,6 g/l	1,8 g/l	3 g/l	3,5 g/l	0,9345
	C- YE	0,01%	0,02%	0,04%	0,06%	0,07%	0,010
I N T E R A C C I O N E S	AB						0,2885
	AC						0,3719
	BC						0,0070
	A²						0,0187

Se obtuvo un modelo significativo para la respuesta biomasa con un valor p de 0,0052. Se analizó el efecto de las variables para su posterior optimización. De este análisis resultó que la concentración de biomasa tuvo un efecto significativo y cuadrático (Tabla 14). Esto implica que la relación entre el glicerol y la biomasa no es lineal, sino curva. Este afecta de manera curvilínea

la biomasa (hay un óptimo), y esta curvatura no es casual, sino que realmente influye en la respuesta dentro del rango estudiado (Figura 28A). Además, la fortificación con YE tuvo un efecto significativo y positivo. Por el contrario, la concentración de amonio no afectó de manera significativa la respuesta (Tabla 14). Sin embargo, la concentración de amonio y YE potencian sus efectos al estar juntos y su interacción resultó significativa y positiva, es decir, que cuando la concentración de ambos es mayor, la producción de biomasa resulta mayor (Figura 28B).

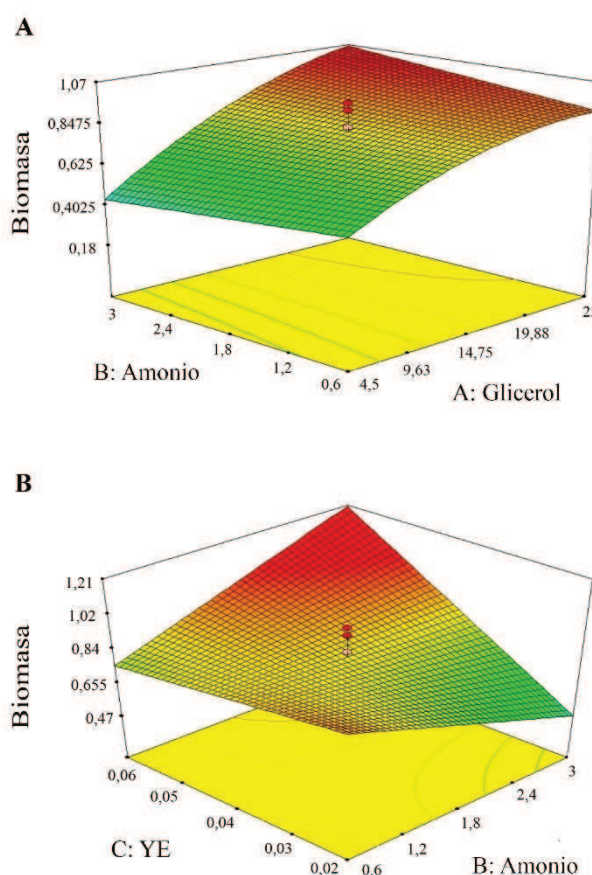


Figura 28. Superficie de respuesta para biomasa como variable respuesta en función de diferentes factores del cultivo. A: Interacción Glicerol-Amonio (AB), donde se observa el efecto cuadrático del glicerol sobre la biomasa (eje y), con un valor máximo (zona roja) en lo que sería la zona media de la curva. Independientemente de la concentración de amonio (eje x), el glicerol determina las condiciones óptimas para la producción de biomasa. **B:** se muestra la interacción significativa entre el amonio (eje y) y YE (eje x), evidenciando que el incremento simultáneo de ambos factores conduce al máximo de biomasa (zona roja).

Teniendo en cuenta estas observaciones, se procedió a una optimización numérica de las variables en la región experimental estudiada. Se le indicó al programa que optimice la producción de biomasa y las variables, teniendo en cuenta que se maximice la concentración de glicerol y el YE, y que el amonio sea optimizado dentro del rango estudiado (Tabla 15A). Esto dio como resultado 28 posibles combinaciones de las variables que estiman la “mejor” respuesta con un cierto índice de deseabilidad que se muestran con detalle en la Tabla A7 del Anexo. De las 28 estimaciones generadas por el programa, se seleccionó la condición que predecía la mayor biomasa posible

utilizando la menor cantidad de amonio, con el objetivo de facilitar una futura etapa sin este compuesto. Esta opción presentaba un índice de deseabilidad de 1, indicando la solución óptima. Se estimó una producción de biomasa de 1,0519 g/l, con un intervalo de confianza del 95 % (0,67-1,4 g/l), utilizando 25 g/l de glicerol, 0,96 g/l de amonio y 0,06 % p/v de extracto de levadura (Tabla 15B). Para comprobar esta estimación, se preparó el cultivo por triplicado, se inocularon con un cultivo saturado de *Ht* KHS3 y se incubaron a 28°C con agitación orbital a 200 rpm durante 24 h. Luego se determinó la biomasa seca para verificar la precisión del modelo. La producción de biomasa obtenida fue de $0,798 \pm 0,16$ g/l, lo cual está dentro del rango previsto por el programa (0,67–1,4 g/l), confirmando la validez de la estimación estadística. A partir de esta optimización estadística para la producción de biomasa en corto tiempo, se obtuvo una producción de 0,798 g/l en 24 horas.

Tabla 15. Optimización numérica de la producción de biomasa en DCC. En la parte A de la tabla se muestran las variables y respuesta a optimizar; en la segunda y tercera columna se indica el límite inferior y superior de cada factor estudiado en el diseño central compuesto y en la cuarta lo que se le sugirió al programa que haga con cada variable de acuerdo a lo observado en el análisis del diseño. En la columna B se observa el óptimo predicho para cada factor y para la respuesta de biomasa seca con un intervalo de confianza del 95%. En la columna C, se muestra la biomasa seca obtenida experimentalmente por triplicado junto con su desviación estándar.

A				B	C
Variable	Límite inferior	Límite superior	Objetivo	Óptimo predicho	Resultado
Glicerol	4,5 g/l	25 g/l	Maximizar	25 g/l	$0,798 \pm 0,16$ g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g/l	3 g/l	En el rango	0,96 g/l	
YE	0,02 % p/v	0,06 % p/v	Maximizar	0,06 %	
Biomasa	0,18 g/l	1,03 g/l	Maximizar	1,0519 g/l IC (0,67-1,4)	
Deseabilidad	1				

Dado que el objetivo era avanzar hacia una segunda etapa enfocada en la producción de PHB y estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono y del amonio, se determinaron las concentraciones remanentes de glicerol y amonio al final del período analizado. Se observó que, después de 24 horas, aún quedaban concentraciones significativas de glicerol y de amonio (~15 g/l y ~0,3, respectivamente). Con el propósito de establecer condiciones que permitan finalizar la etapa de producción de biomasa en condiciones en las que se hayan consumido por completo tanto el glicerol como el sulfato de amonio, se diseñó un experimento con tres cultivos que presentaban diferentes concentraciones iniciales de glicerol y de amonio, definidas en función del consumo observado en el experimento anterior (Figura 29).

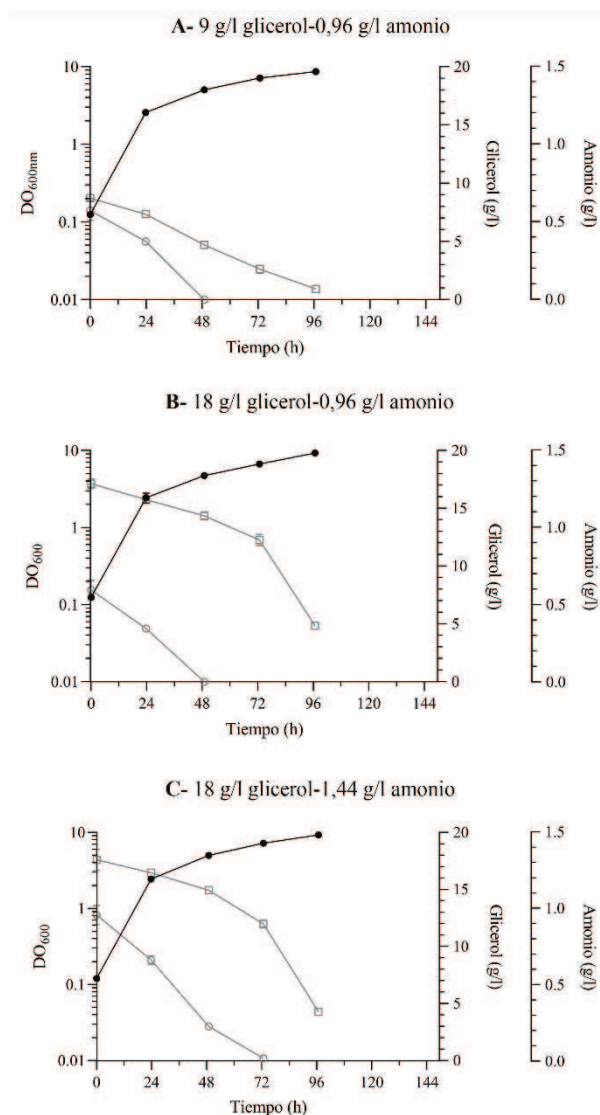


Figura 29. Seguimiento del consumo de glicerol y amonio en cultivos de *Ht KHS3* bajo diferentes concentraciones iniciales de estos compuestos. Los cultivos se realizaron en medio con glicerol como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, a 28 °C con agitación orbital a 200 rpm, durante un período de 96 h. Se monitorearon la DO₆₀₀, la concentración de glicerol y de amonio en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h). El círculo negro representa la DO₆₀₀ en el eje izquierdo con escala logarítmica. El cuadrado vacío muestra la concentración de glicerol en g/l en el eje derecho y el círculo vacío indica la concentración de amonio en g/l en el eje derecho.

El primer cultivo contenía 9 g/l de glicerol, una concentración cercana a la que *Halomonas* consumió en 24 horas, y una concentración de amonio de 0,96 g/l, correspondiente a la resultante de la optimización (Figura 29A). En el segundo cultivo, se duplicó la concentración de glicerol a 18 g/l y se mantuvo constante la concentración de amonio en 0,96 g/l (Figura 29B). En el tercer cultivo se mantuvo el nivel de glicerol en 18 g/l y se incrementó en un 50% la concentración de amonio, alcanzando 1,44 g/l (Figura 29C). Cada uno de los cultivos se preparó por duplicado, manteniendo las concentraciones de los demás componentes del medio en los valores previamente optimizados (60 g/l de NaCl, 1 mM de Mg, 26,44 mM de K₂HPO₄, 48,22 mM de KH₂PO₄ y 0,9

μM de Fe). De acuerdo con el seguimiento de la DO_{600} , los tres cultivos presentaron un crecimiento similar (Figura 29A-C). En relación con el consumo de amonio, los dos cultivos con concentración inicial de 0,96 g/l (Figura 29A-B) lo agotaron completamente a las 48 h, mientras que el cultivo con la mayor concentración de amonio (1,44 g/l) lo consumió por completo a las 72 h. Respecto al glicerol, a las 96 h aún se detectaban concentraciones remanentes en todos los cultivos, siendo el cultivo A (con 9 g/l de glicerol inicial) el que mostró el mayor consumo de sustrato (5 g/l de glicerol consumido en las primeras 48 h). Con base en estos resultados, se determinó que las condiciones óptimas para la etapa de producción de biomasa fueran 5 g/l de glicerol y 0,96 g/l de amonio como concentraciones iniciales. Este medio de cultivo, resultado de la optimización de la producción de biomasa y al que se le ajustaron las concentraciones de glicerol y amonio, fue denominado LM2 (Tabla 16). Con este cultivo con un alto contenido celular se pasó a estudiar y optimizar la segunda etapa de producción de PHB.

Tabla 16. Composición del medio LM2. Se muestra la composición del medio de cultivo LM2, formulado a partir de la optimización de la producción de biomasa. Esta composición no contiene la fuente de carbono y fortificación con YE para el crecimiento, que en el cultivo productor de biomasa fue de 5 g/l y 0,06% p/v respectivamente. El volumen de llenado optimizado para este medio destinado a la producción de biomasa fue del 40%, con un pH de 7,5.

Componente	Concentración
K_2HPO_4	26,44 mM
KH_2PO_4	48,22 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,96 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mM
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,9 μM
NaCl	60 g/l

3.5.2 Etapa 2: producción de PHB

3.5.2.1 Evaluación de variables que afectan la producción de PHB

Una vez obtenido un cultivo de *Ht* KHS3 con alta densidad celular, se procedió al estudio de las variables que influyen en la producción de PHB mediante un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} , de 5 variables con dos niveles cada una (-1; +1). Se estudió el efecto de la agitación (variable categórica), el volumen de llenado y las concentraciones de glicerol, amonio y NaCl (Tabla 17, columna niveles). La cantidad de combinaciones a estudiar fue de $2^4=16$. Además, debido a la presencia de una variable categórica (de todo o nada), se incluyeron seis puntos centrales: 3 puntos centrales para un nivel de esa variable (-1, sin agitación) y 3 puntos centrales para el otro (+1, con agitación), lo que dio como resultado 22 corridas experimentales. Todas las condiciones se

podieron realizar en un único bloque. La composición exacta de cada tratamiento y sus resultados se muestran en la Tabla A8 del Anexo. Una vez obtenido el cultivo productor de biomasa (etapa 1), se prepararon las 22 combinaciones en frascos Erlenmeyer sanitizados. En los casos correspondientes la adición de los componentes se realizó considerando las concentraciones ya presentes en el medio. Por ejemplo, dado que el medio contenía inicialmente 60 g/l de NaCl, para alcanzar una concentración final de 80 g/l según el diseño experimental (Tabla 17), se añadieron 20 g/l adicionales. Se incubaron a 28°C en presencia o ausencia de agitación orbital durante 7 días. Se realizó un seguimiento diario del cultivo mediante observación microscópica y no se detectó contaminación aparente por otros microorganismos. A los 7 días se determinó el porcentaje de PHB por estimación con hipoclorito de sodio. Para determinar los efectos significativos de cada variable y de sus interacciones, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA, Tabla 17).

Tabla 17. Análisis estadístico de un diseño factorial fraccional 2^{5-1} para PHB seco como variable de respuesta. Se indican variables estudiadas y sus niveles (-1; 0; +1), con el valor p correspondiente a cada variable obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados del % de PHB de la Tabla A8 del Anexo. En la primera fila se muestra la significancia del modelo para la respuesta. En negrita se muestran los valores que resultaron significativos (Significancia valor $p < 0,05$) (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo. *Dado que la agitación es una variable categórica (presente o ausente), no se puede definir un punto central. Por ello, se consideraron tres puntos centrales con agitación y tres sin agitación.

		Niveles			PHB (g/l)
		- 1		+ 1	Valor p
Modelo					< 0,0001
F A C T O R E S	A- Agitación	Con	*	Sin	< 0,0001 (-)
	B- Glicerol	0	12,25 g/l	25 g/l	< 0,0001(+)
	C- (NH₄)₂SO₄	0	0,45 g/l	0,96 g/l	0,3651
	D- Volumen	40 ml	60 ml	80 ml	0,0002 (-)
	E- NaCl	0	70 g/l	80 g/l	0,0238 (-)
AB					<0.0001 (+)
I N T E R A C C I O N E S	AC				0,0004 (+)
	AD				0,0834
	AE				0,1186
	BC				0,2978
	BE				0,0005 (-)
	CD				0,0198 (-)
	CE				0,0543
	DE				0,1583

El modelo fue significativo con un valor $p < 0,0001$ (Tabla 17). La ausencia de agitación de los cultivos, el volumen de llenado y la concentración de NaCl afectaron de manera significativa y negativa la producción del polímero. Es decir, se requiere agitación, menor volumen de llenado y la menor concentración de NaCl de las testeadas en estos ensayos (60 g/l) para obtener buenas cantidades del polímero. Además, las interacciones de la agitación con la concentración de glicerol y amonio resultaron significativas. La agitación favorece la producción de PHB a altas concentraciones de glicerol y desfavorece la producción cuando hay amonio. Por otra parte, la concentración de glicerol influye de manera significativa y positiva en la producción de PHB y la concentración de amonio no influye sobre la respuesta. Además, las interacciones glicerol–NaCl y amonio–volumen resultaron ser significativas y negativas, lo que indica que, al combinarse, reducen su efecto positivo sobre la respuesta. A partir de estos resultados, se analizó qué variables debían optimizarse para maximizar la producción de PHB dentro de la región experimental estudiada. La adición de amonio no resultó estadísticamente significativa, y su interacción con el volumen y la agitación fue negativa; por lo tanto, se decidió no adicionar amonio en esta etapa de producción. En cuanto a la adición de NaCl, se observó que disminuye la producción de PHB y que, en combinación con el glicerol, intensifica dicho efecto negativo, por lo que también se optó por eliminarla. Considerando que tanto la agitación como el volumen de llenado (ambos vinculados a la aireación del cultivo) impactan significativamente en la acumulación de PHB, se decidió optimizar estas variables. El volumen de llenado se mantuvo en el rango previamente estudiado (40–80 ml), mientras que para la agitación se redefinió el espacio experimental entre 80 y 200 rpm.

3.5.2.2 Optimización de la producción de PHB

La producción de PHB fue optimizada mediante la metodología de superficie de respuesta. Las variables evaluadas fueron la concentración de glicerol, la agitación y el volumen de llenado, utilizando un diseño de optimización Box-Behnken con dos niveles para cada variable (Tabla 18, columna niveles). Este diseño experimental permite ajustar modelos cuadráticos sin necesidad de combinar simultáneamente los niveles extremos de todos los factores. Se caracteriza por su eficiencia en cuanto al número de ensayos y por no incluir puntos axiales, lo que facilitó su implementación experimental (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008, pp. 416). En particular, el uso de un diseño central compuesto habría requerido hasta seis condiciones de agitación distintas en simultáneo, lo cual resultaba inviable en el contexto experimental disponible. La cantidad de combinaciones a realizar fue de 17. La composición exacta de cada tratamiento y sus resultados se muestran en la Tabla A9 del Anexo. De igual manera que en el diseño anterior, se realizó un cultivo para la producción de biomasa de 48 h. El cultivo con alta densidad celular (conteniendo 0,45 g/l de glicerol y sin amonio remanente) fue fraccionado en 17 frascos Erlenmeyer

previamente sanitizados, en los que se prepararon los distintos tratamientos para ser inoculados e incubados durante 7 días con la agitación orbital correspondiente (Tabla 18). Se realizó un seguimiento diario del cultivo mediante observación microscópica y no se detectó contaminación aparente por otros microorganismos. Finalizado el período de incubación, se determinó el contenido de PHB seco en los 17 cultivos. Los datos experimentales obtenidos del diseño se analizaron mediante el procedimiento de regresión de superficie de respuesta. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para estimar los parámetros estadísticos (Tabla 18). Se utilizó el software Design Expert® para los cálculos y gráficas de la superficie de respuesta.

Tabla 18. Análisis estadístico de un diseño Box-Behnken para PHB seco como variable de respuesta. Se indican variables estudiadas y sus niveles (-1; 0; +1), con el valor p correspondiente a cada variable obtenido por el análisis de ANOVA de los resultados de PHB seco (g/l) de la Tabla A9 del Anexo. En la primera fila se muestra la significancia del modelo para la respuesta. En negrita se muestran los valores que resultaron significativos (Significancia valor $p < 0,05$) (+) Efecto positivo; (-) efecto negativo. *Se trabajó en frascos Erlenmeyer de 100 ml.

		Niveles			PHB (g/l)
		- 1		+ 1	Valor p
Modelo					0,0008
F A C T O R E S	A- Glicerol	5 g/l	15 g/l	25 g/l	0,0002
	B- Agitación	80 rpm	140 rpm	200 rpm	0,0906
	C- Volumen*	40 ml	50 ml	60 ml	0,8522
I N T E R A C C I O N E S	AB				0,6271
	AC				0,3796
	BC				0,6271
	A²				0,0002
	B²				0,0011
	C²				0,2458

Se obtuvo un modelo significativo para la producción de PHB con un valor p de 0,0008. Se analizó el efecto de las variables para su posterior optimización. El análisis mostró que la agitación presentó efectos significativos tanto en su componente lineal como en el cuadrático, ambos valores p de 0,0002 (Tabla 18), sugiriendo una fuerte influencia en la producción de PHB y la existencia de un valor óptimo de agitación (Figura 30A). Por su parte, la concentración de glicerol mostró un efecto cuadrático significativo (valor p 0,00011; Tabla 18), lo cual indica que su

influencia no es lineal y que la concentración óptima para la producción de PHB se encuentra en los valores intermedios estudiados (Figura 30A-C, zona roja eje y). El volumen de llenado no presentó efectos significativos dentro del rango estudiado (Tabla 17), pero de igual manera se puede ver una leve curvatura y valores óptimos de producción (Figura 30B-C). Las interacciones entre variables no fueron significativas.

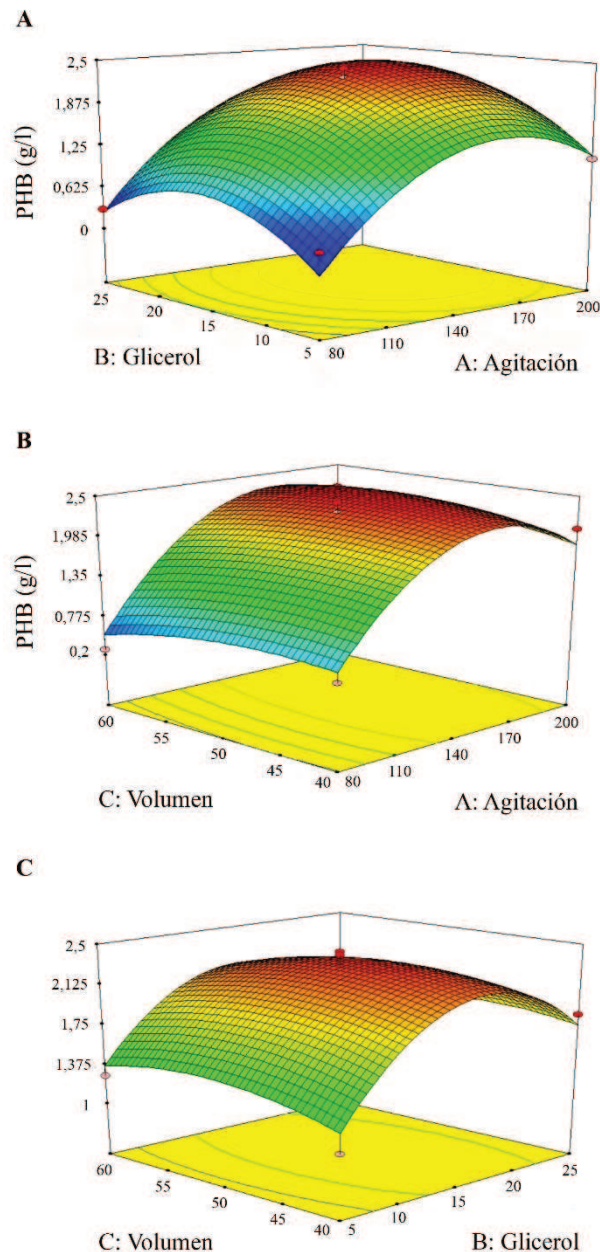


Figura 30. Superficie de respuesta para PHB en función de diferentes factores del cultivo. A: Interacción Agitación-Glicerol (AB), donde se observa el efecto cuadrático de ambos factores sobre la producción de PHB con un valor máximo (zona roja) en el medio de la RSM. **B:** Interacción Agitación-Volumen (AC) evidenciando valores óptimos centrales (zona roja). **C:** Interacción Glicerol-Volumen (BC) se ven también regiones óptimas en la RSM.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se procedió a una optimización numérica de las variables en la región experimental estudiada. Se sugirió al programa que optimice la producción de PHB teniendo en cuenta que minimice la concentración de glicerol y optimice en el rango a la agitación y al volumen de llenado (Tabla 19A). Como resultado, se obtuvo una única predicción con un índice de deseabilidad de 0,86, estimando una producción óptima de PHB de 2,31 g/l a los 7 días de cultivo, con un intervalo de confianza del 95% (1,65-2,97). Esta predicción se alcanzaría bajo las variables optimizadas de 11,94 g/l de glicerol, 163 rpm de agitación y un volumen de llenado de 51,7 ml (Tabla 19B). Para comprobar esta estimación, se preparó el cultivo productor de biomasa, el cual fue incubado durante 48 h a 28°C con agitación orbital a 200 rpm. Transcurrido ese período, se determinó la concentración de glicerol remanente y se dividió el cultivo en 3 frascos Erlenmeyer de 100 ml previamente sanitizados. A cada uno se le adicionó glicerol para una concentración final de 11,94 g/l y se incubaron durante 7 días a 163 rpm. Por cuestiones de practicidad en los diseños factoriales y de optimización, no se había evaluado previamente la acumulación de PHB antes de los 7 días. Por esta razón, en la etapa de validación se decidió también cuantificar la acumulación de PHB a los 4 días de cultivo, con el fin de comparar ambas condiciones. La producción de PHB obtenida a los 4 días fue de $1,23 \pm 0,22$ g/l, mientras que a los 7 días fue de $3,3 \pm 0,2$ g/l (Tabla 19C). Estos resultados muestran que una extensión de 3 días en el cultivo permite casi triplicar la acumulación de PHB, lo que resalta la importancia de mantener el cultivo durante 7 días.

Tabla 19. Optimización numérica de la producción de PHB en Diseño Box-Behnken. En la **parte A** de la tabla se muestran las variables y la respuesta a optimizar; en las segundas y terceras columnas se indican los límites inferiores y superiores de cada factor estudiado en el diseño. En la cuarta se detalla lo que se le sugirió al *software* de optimización definido en función de los resultados obtenidos en el análisis estadístico previo. En la **parte B** se muestran las condiciones óptimas sugeridas por el *software* para cada una de las variables, así como el valor estimado de producción de PHB, junto con su respectivo intervalo de confianza al 95%. En la **parte C**, se muestra la biomasa seca obtenida experimentalmente a los 4 y a los 7 días de cultivo junto con su desviación estándar.

A- Condiciones para la optimización de PHB				B- Óptimo predicho		C- Validación del óptimo	
Variable	Límite inferior	Límite superior	Objetivo	Variables optimizadas	Predicción PHB g/l	PHB 4 días	PHB 7 días
Agitación	80 rpm	200 rpm	En el rango	163 rpm	2,31 g/l IC 95%: 1,65-2,97	1,23 ± 0,22 g/l	3,3 ± 0,2 g/l
Glicerol	5 g/l	25 g/l	Minimizar	11,94 g/l			
Volumen de llenado	40 ml	60 ml	En el rango	51,7 ml			
Deseabilidad				0,86			

En resumen, se logró el diseño de un esquema de producción en dos etapas. La primera etapa orientada al crecimiento celular en medio LM2 optimizado con 5 g/l de glicerol como única fuente de carbono y 0,06% YE, incubado a 28 °C y 200 rpm de agitación en condiciones estériles. A las

48 h se alcanzó una DO_{600} aproximada de 5 y una biomasa seca de 2,5 g/l. La segunda etapa, destinada a la acumulación del polímero, se desarrolló en condiciones no estériles, con menor agitación y utilizando nuevamente glicerol como única fuente de carbono, obteniéndose alrededor de 3 g/l de PHB y una biomasa de 4,99 g/l. Este enfoque no sólo permitió optimizar el proceso, sino también establecer una estrategia potencialmente más económica, adecuada para la evaluación futura de fuentes alternativas de carbono provenientes de desechos.

3.5.3 Aplicación del proceso en dos etapas utilizando fuentes de carbono alternativas

Esta estrategia de cultivo en dos etapas ofrece la posibilidad de explorar la utilización de subproductos y materiales residuales, contribuyendo así a un enfoque más sostenible en la obtención de bioplásticos. Con el objetivo de aplicar el esquema en dos etapas para el estudio de fuentes de carbono alternativas provenientes de residuos, se evaluaron como fuentes de carbono bagazo de cerveza y lixiviado sanitario. El bagazo de cerveza es el principal subproducto de la industria cervecera, representa aproximadamente el 85% del total de subproductos generados, es rico en celulosa y polisacáridos no celulósicos, y tiene un gran potencial para ser reciclado (Castro-Criado et al., 2023). El lixiviado de relleno sanitario es el líquido que se forma cuando el agua (proveniente de lluvias o drenajes) percola a través de desechos acumulados, arrastrando consigo compuestos orgánicos, metales pesados y otros contaminantes. Se considera un subproducto indeseado con alto potencial de impacto ambiental. Su manejo inadecuado representa un riesgo significativo para suelos, aguas subterráneas y ecosistemas cercanos (Wang & Qiao, 2024). Este trabajo se realizó en el marco de la tesina de grado de Julia Ingaramo, en la cual me desempeñé como codirectora.

3.5.3.1 Lixiviado de relleno sanitario como fuente de carbono

Se desarrolló un cultivo productor de biomasa en las condiciones previamente determinadas, respetando la proporción del 40% de volumen de llenado. A las 72 h, el cultivo alcanzó una DO_{600} de 4,2, un % de PHA de 24% y una baja concentración de glicerol (0,34 g/l). En este punto se dividió el cultivo en 3 frascos Erlenmeyer de 100 ml previamente sanitizados para un volumen final de cultivo de 51,7 ml, a los que se agregó lixiviado para una concentración final de 10 y 20% v/v. Se incluyó un control de 5 g/l de glicerol y se determinaron DO_{600} y %PHA. El control con glicerol mostró el comportamiento esperado tanto en la DO_{600} como en la acumulación de PHA. La incorporación de lixiviado sanitario como fuente de carbono en la etapa de acumulación, en cambio, no resultó en aumento significativo ni en la acumulación de PHA ni en la DO_{600} (Figura 31). Estos resultados sugieren que *Ht KHS3* no fue capaz de utilizar de manera eficiente este residuo como fuente de carbono bajo las condiciones evaluadas.

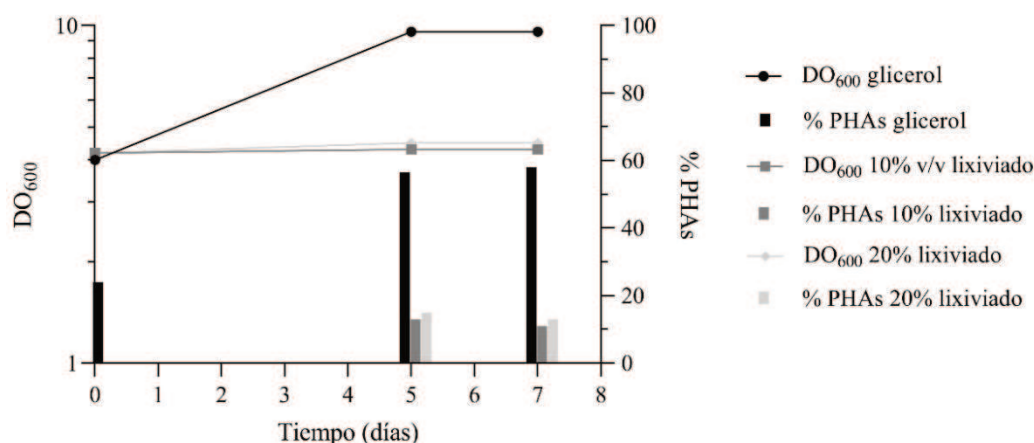


Figura 31. Evaluación del lixiviado sanitario como fuente alternativa de carbono en la etapa de acumulación de PHA. El tiempo cero corresponde al cultivo productor de biomasa en el momento de la división y transferencia a la fase de acumulación de PHA. Se presenta el crecimiento celular en función de la DO₆₀₀ y la acumulación de PHA determinada mediante el método de hipoclorito de sodio. La acumulación se evaluó a los 5 y 7 días de cultivo.

3.5.3.2 Bagazo de cerveza como fuente de carbono

Del mismo modo que en el caso anterior, los ensayos para evaluar el bagazo de cerveza se realizaron a partir de un cultivo productor de biomasa, el cual se dividió y se suplementó con 10 o 20% v/v de solución obtenida a partir del bagazo de cerveza.

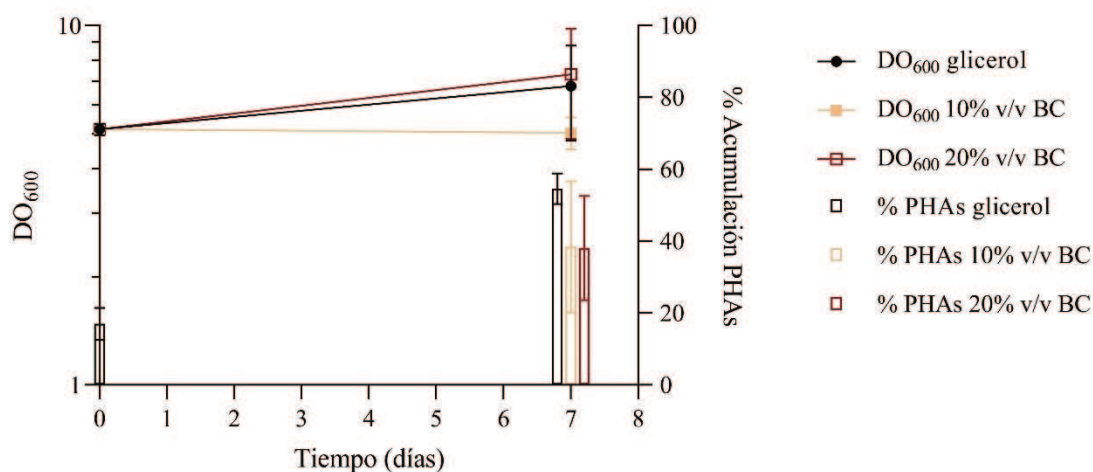


Figura 32. Evaluación del bagazo de cerveza como fuente alternativa de carbono en la etapa de acumulación de PHA. El tiempo cero corresponde al cultivo productor de biomasa en el momento de la división y transferencia a la fase de acumulación de PHA. Se presenta el crecimiento celular en función de la DO₆₀₀ y la acumulación de PHA estimada mediante el método de hipoclorito de sodio a los 7 días. Nota: la gráfica corresponde a seis experimentos independientes realizados con glicerol y 10% v/v de bagazo; y 4 experimentos para 20% v/v de bagazo.

Al cabo de siete días, se observó para los tratamientos con bagazo de cerveza una acumulación de PHB significativa, aunque algo menor que la obtenida en los controles con glicerol. Sin embargo, se observó una elevada variabilidad entre seis ensayos independientes, posiblemente

relacionada con la heterogeneidad en la composición del residuo (Figura 32). Los resultados sugieren que el bagazo de cerveza podría representar una fuente de carbono alternativa para obtener PHB a partir de *Ht* KHS3; no obstante, la elevada variabilidad observada en los ensayos sugiere que su aprovechamiento no es consistente y plantea la necesidad de estudios adicionales que permitan evaluar con mayor precisión su potencial como sustrato.

3.5.4 Estrategia en dos etapas para la producción del copolímero PHBV

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en medio mínimo H1-2 con glucosa como fuente de carbono y ácido propiónico como precursor del copolímero demostraron que *Halomonas* es capaz de incorporar el monómero hidroxivalerato al polímero en crecimiento, pero en una baja proporción en las condiciones estudiadas. Y que dependiendo de qué momento del crecimiento se adiciona el precursor, puede afectar el crecimiento. Con el objetivo de utilizar una fuente de carbono más económica que la glucosa y evitar que la adición del ácido propiónico afecte el crecimiento de *Halomonas*, se implementó el esquema de producción en dos etapas para evaluar la síntesis del copolímero PHBV. Se comenzó el estudio con el cultivo productor de biomasa en LM2 (Tabla 16). A las 48 h, el cultivo alcanzó una DO_{600} de 4,7, una biomasa seca de 1,6 g/l y 0,14 g/l de PHB seco, sin presencia de glicerol remanente y 0,09 g/l de amonio residual. En la segunda etapa, se incorporó ácido propiónico como precursor para la biosíntesis del copolímero PHBV. El cultivo productor de biomasa se dividió en 2 frascos Erlenmeyer previamente sanitizados con 51,7% de su volumen, se les adicionó a ambos cultivos glicerol para una concentración final de 12 g/l y a uno de ellos además de ácido propiónico para una concentración final de 0,2% p/v. Se incubaron a 28°C con agitación orbital de 163 rpm. A los 3 y 7 días, se midió DO_{600} , contenido de PHA y glicerol remanente en el medio y a los 7 días, se procedió a la determinación de biomasa y extracción del polímero. Se observó que el crecimiento celular, evaluado mediante la DO_{600} , fue similar en ambas condiciones experimentales. Esto se confirmó con la determinación de biomasa seca, que alcanzó 2,73 g/l en el cultivo control (glicerol) y 2,48 g/l en el cultivo suplementado con ácido propiónico. Sin embargo, la acumulación del polímero fue mayor en el cultivo que solo contenía glicerol, mientras que la presencia de ácido propiónico provocó una ligera disminución en la acumulación de PHA (Figura 33A). Después de 7 días, el contenido de PHA fue de 0,94 g/l en el cultivo con glicerol y de 0,82 g/l en el cultivo con ácido propiónico.

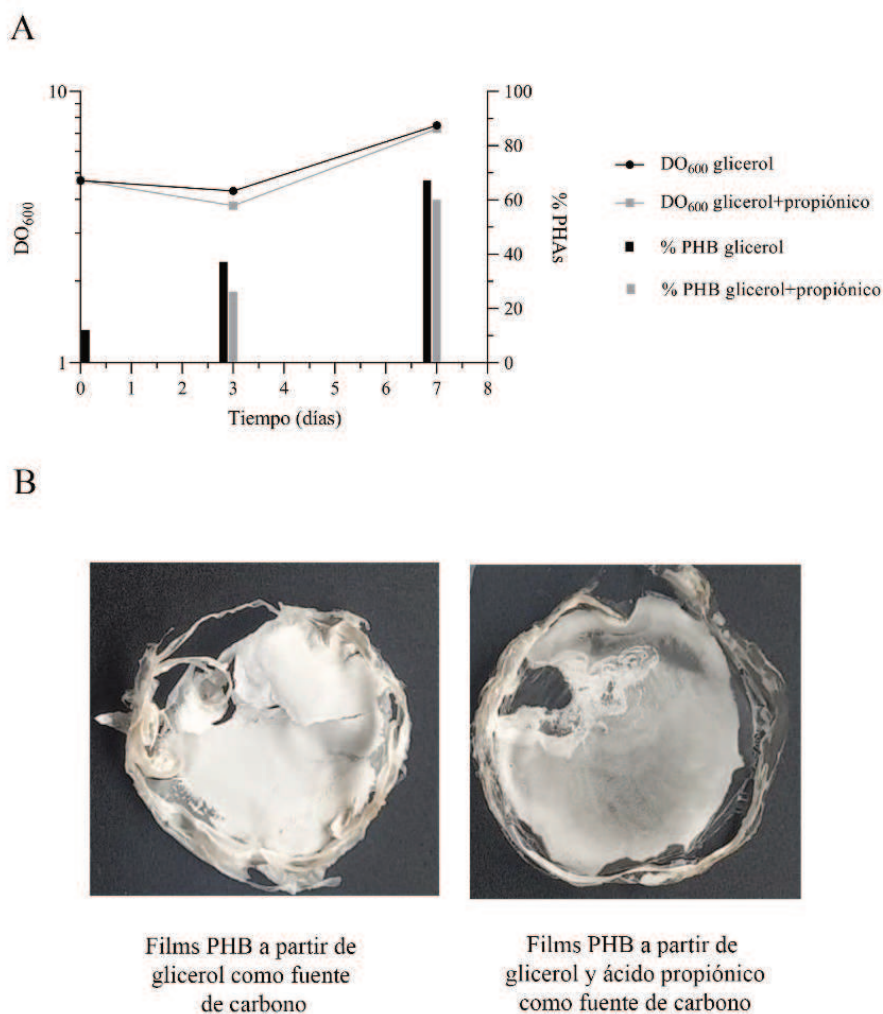


Figura 33. Evaluación del uso de ácido propiónico como precursor del copolímero PHBV durante la etapa de acumulación. A: Crecimiento de *Ht* KHS3 y acumulación del polímero en cultivos con glicerol y con glicerol y ácido propiónico como fuente de carbono. Se muestra la DO₆₀₀ y el % de acumulación por el método de hipoclorito de sodio. El tiempo cero corresponde al cultivo productor de biomasa en el momento de la división y transferencia a la fase de acumulación de PHAs. **B:** Imágenes de los *films* formados mediante la purificación del polímero con cloroformo de los diferentes cultivos.

El PHA extraído con cloroformo permitió generar un *film* con características distintas a simple vista, entre el polímero obtenido del cultivo con glicerol (más opaco y quebradizo) en comparación con el *film* producido a partir del cultivo suplementado con ácido propiónico (Figura 33B). Para confirmar la presencia del copolímero en estos *films* se analizó por RMN (INTEC, CONICET, Santa Fe). En el espectro de RMN se observaron señales consistentes con las de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato. La integración de las señales permite estimar que hay 85% de 3HB y 15% de 3HV (Figura 34). Estos resultados indican la presencia predominante de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato en la muestra, lo cual es consistente con la formación de un copolímero de PHBV. Esto indica que el ácido propiónico sería un buen precursor para la formación del copolímero en estas condiciones y que con una concentración de 0,2% p/v se obtuvo una buena proporción del copolímero en la cepa salvaje comparado con otros estudios (Cavalheiro et al., 2012; Catalán et al., 2007).

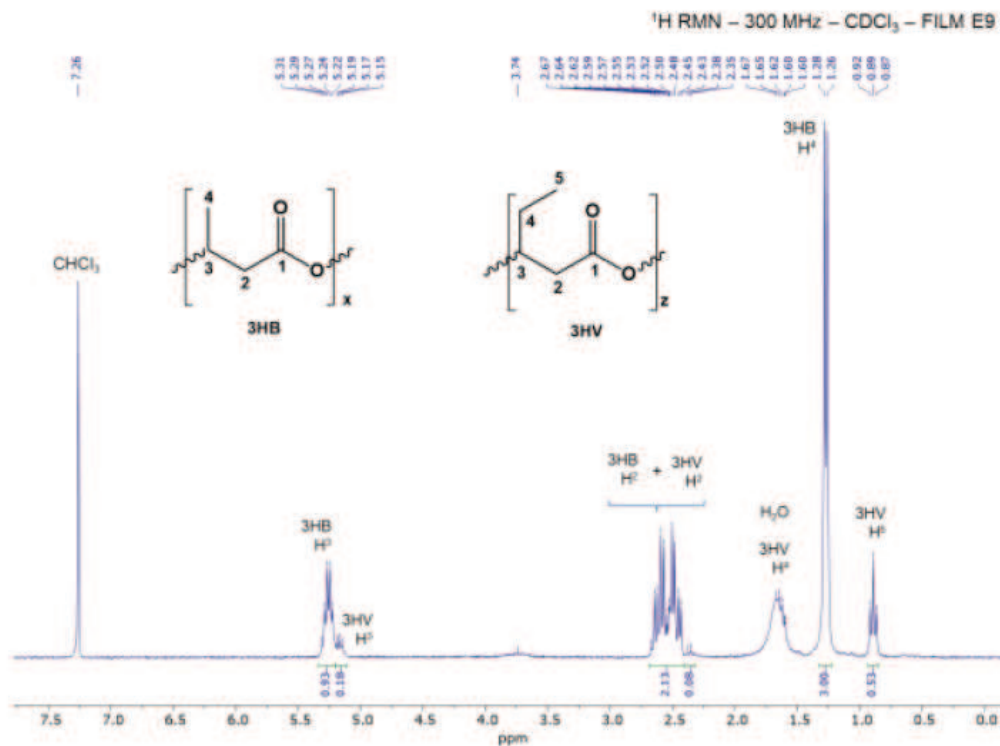


Figura 34. Análisis del polímero por resonancia magnética nuclear. Se purificó el PHA producido utilizando 12 g/l de glicerol comercial y 0,2 % p/v de ácido propiónico como fuente de carbono. Se tomaron 15 mg de cada muestra, se disolvieron con cloroformo y se analizaron por ¹H-RMN en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (INTEC-CCT). Se muestran los espectros obtenidos. Se señala en cada grupo de picos cuál corresponde a 3HB o 3HV.

Discusión de resultados

En la presente tesis se abordó la caracterización integral de *Ht* KHS3 como potencial productora de PHA, combinando el análisis genómico del metabolismo del PHB con estudios fisiológicos, de caracterización del polímero y de optimización del proceso productivo. La integración de estos enfoques permitió no solo caracterizar la capacidad de esta cepa para sintetizar PHB, sino también evaluar su potencial aplicación biotecnológica.

El análisis del genoma de *Ht* KHS3 permitió identificar un conjunto de genes homólogos a los involucrados en la síntesis, regulación y degradación de PHA, ya descritos previamente en otras bacterias acumuladoras de estos biopolímeros. En conjunto, los resultados indican que la maquinaria genética de *Ht* KHS3 comparte una alta similitud funcional con la de *Halomonas* TD01, una cepa halófila modelo para la producción de PHA (Cai et al., 2011; Tan et al., 2014).

A diferencia de lo observado en organismos modelo como *C. necator*, donde los genes del metabolismo de PHA se agrupan en un único operón (*phaCAB*) (Rehm, 2003), en *Ht* KHS3 estos genes se encuentran distribuidos en distintas regiones del genoma, un patrón previamente descrito en otras especies del género *Halomonas* (Cai et al., 2011; Quillaguamán et al., 2010). Si bien la localización adyacente de los genes *phaC1* y *phaP1* podría sugerir la existencia de un posible operón, el análisis de las regiones promotoras indica que ambos estarían regulados de manera independiente, en concordancia con lo reportado para *Halomonas* TD01 (Cai et al., 2011).

En *Ht* KHS3 se identificaron dos genes que codifican sintasas (*phaC1* y *phaC2*), ambas pertenecientes a la clase I y asociadas a la polimerización de monómeros de cadena corta. El alineamiento mostró una fuerte conservación del motivo tipo *lipase box* y de la tríada catalítica (C-D-H), esenciales para la actividad enzimática (Cai et al., 2011).

La presencia de genes codificantes de depolimerasas (*phaZ1*, *phaZ2* y *phaZ3*) sugiere que *Ht* KHS3 no sólo es capaz de sintetizar PHA, sino también de movilizar el polímero acumulado en respuesta a requerimientos metabólicos, mecanismo descrito en bacterias acumuladoras de PHB (Jendrosseck & Handrick, 2002). El análisis de las secuencias reveló que *PhaZ1* y *PhaZ2* conservan el motivo *lipase box* (GxSxGG) y la tríada catalítica (S, D, H), esenciales para la actividad hidrolasa de las depolimerasas de PHA (York et al., 2003). La presencia de un péptido señal en *PhaZ1* sugiere además una posible localización extracelular, lo que indicaría la capacidad de degradar PHB liberado al medio. Por su parte, la potencial depolimerasa *PhaZ3*, identificada por su similitud con *PhbZ1* de *A. vinelandii*, conserva el motivo GxCxAG y la tríada catalítica C-D-H descritas para *PhbZ1* (Adaya et al., 2018). Estas características apoyan la hipótesis de que *Ht* KHS3 posee mecanismos eficientes tanto para el reciclaje intracelular del PHB como para la degradación extracelular de polímero liberado al medio, lo que podría representar una ventaja ecológica en ambientes donde la disponibilidad de carbono es limitada. En concordancia con el

análisis génico, los ensayos de movilización de PHB demostraron experimentalmente que *Ht* KHS3 es capaz de movilizar el PHB acumulado y utilizarlo como fuente de carbono y energía cuando se encuentra en condiciones de requerimiento de ellas (Figura 18). Al acumular ~60 % PHB ($M_w = 223,6$ kDa) en glicerol con limitación de nitrógeno, y luego dividir el cultivo en dos fracciones (una con adición de sulfato de amonio, otra sin), se observó que en presencia de sulfato de amonio la acumulación cayó a 21 % y el peso molecular se redujo a 118,7 kDa. En ausencia de sulfato de amonio, en cambio, aumentó ligeramente la cantidad de PHB e incluso se observó un incremento del peso molecular a 254,6 kDa. La degradación del polímero sintetizado implica la presencia de depolimerasas funcionales, en este caso intracelulares capaces de degradar el PHB como fuente de carbono/energía. Este mecanismo de movilización es relevante desde el punto de vista biotecnológico, ya que la fase de acumulación debe mantenerse estable para conservar el porcentaje de polímero acumulado; la activación del crecimiento puede conducir al consumo del polímero acumulado (reduciendo así el rendimiento final). Estos datos son útiles para el diseño de procesos de producción de PHB con cepas halófilas.

En relación con la estructura del gránulo, se identificaron tres fasinas (PhaP1, PhaP2 y PhaP3) con alta similitud (>83%) con las de *Halomonas* TD01 y baja identidad con las de *C. necator*. Todas conservan el motivo característico de fasina (“phasin 2 motif”), asociado a la estabilización de la superficie del gránulo y a la prevención de su coalescencia (Pfeiffer & Jendrosseck, 2012). Estos resultados indican que, pese a la variabilidad de secuencia, las regiones estructurales esenciales para la función de las fasinas se mantienen conservadas en *Ht* KHS3. Asimismo, el regulador PhaR presentó una alta identidad con su homólogo de *Halomonas* TD01 (87%) y conserva el dominio de unión al ADN. En *C. necator*, este regulador actúa reprimiendo la transcripción de PhaP y de sí mismo en ausencia de gránulos de PHA, y su disociación al formarse los gránulos permite la expresión de las fasinas (Maehara et al., 2002; Pötter et al., 2002). Por lo tanto, la conservación estructural observada sugiere que el sistema regulador PhaR–PhaP funcionaría de manera análoga a lo descrito en otros modelos bacterianos (Maehara et al., 2002). No obstante, serán necesarios estudios experimentales para poder afirmar si PhaR de *Ht* KHS3 regula su propia expresión y la de alguno o todos los genes *phaP* identificados.

Si bien el análisis genómico aporta información clave, el potencial biotecnológico de una cepa productora de PHA debe validarse a nivel fisiológico. En este marco, se evaluó el crecimiento y la acumulación de PHB por *Ht* KHS3 bajo distintas condiciones nutricionales y utilizando diversas fuentes de carbono.

Los resultados muestran que *Ht* KHS3 creció eficientemente utilizando YE al 0,25 % p/v como única fuente de carbono, alcanzando fase exponencial tardía a las 15 h ($td \sim 3,23$ h). No obstante, no se detectó acumulación de PHB mediante tinciones con Sudan Black o Nile Blue A (Figuras

13A y 14A). En contraste, cuando se utilizó glucosa 1%, que es una de las fuentes de carbono utilizadas en la industria (Chen et al., 2009), o glicerol 3% *Ht* KHS3 demostró ser un eficiente productor de PHA, acumulando entre un 50% y 70% de su peso seco en PHA (Figuras 17 y 18B). En cultivos con glucosa, el contenido específico de PHB por biomasa (g PHB/g biomasa) se mantuvo relativamente constante ($\sim 0,37-0,4$) a lo largo de la curva de crecimiento, indicando que el aumento en la producción total de PHB estuvo principalmente asociado al incremento de biomasa. Por el contrario, en presencia de altas concentraciones de glicerol (3%) o limitación de nitrógeno se observaron incrementos significativos en el contenido de PHA por célula alcanzando porcentajes muy elevados ($\sim 80\%$). En este sentido, el hecho de que *Ht* KHS3 no acumule PHB en presencia de YE, una fuente rica y compleja de nutrientes, sugiere que un exceso de nutrientes o una relación C/N baja inhibe la activación del mecanismo de almacenamiento, confirmando que una relación C/N desbalanceada es un requisito clave para la acumulación de PHB, tal como ha sido descrito para otros microorganismos (Mitra et al., 2020). Adicionalmente, *Ht* KHS3 mostró la capacidad de utilizar glicerol de reactor, que contiene diversos compuestos contaminantes, lo que le confiere un valor agregado desde el punto de vista biotecnológico. Dado que uno de los principales obstáculos para la adopción a gran escala de bioplásticos es el costo de las fuentes de carbono, la conversión de glicerol crudo en productos de mayor valor agregado, como PHB, por parte de *Ht* KHS3 representa una estrategia prometedora para mejorar la sostenibilidad de la industria del biodiésel. El glicerol crudo constituye el principal subproducto de dicha industria y se genera en grandes volúmenes, lo que lo convierte en una fuente de carbono abundante y económica (Dubey & Mishra, 2021).

Como primer paso hacia la validación del proceso a mayor escala, se evaluó la capacidad de *Ht* KHS3 para acumular PHB en sistemas de cultivo en reactor. Para ello, se analizaron cultivos en reactores de 2 l y 14 l, operados sin condiciones de esterilidad, con alta salinidad (60 g/l NaCl) y utilizando glicerol como única fuente de carbono. Esto se alinea con una de las principales ventajas de las bacterias halófilas, operar en condiciones de alta salinidad reduce el riesgo de contaminación y permite disminuir los costos operativos (González-Rojo et al., 2024). En el reactor de 2 l, se alcanzó una biomasa de 4,2 g/l y producción de PHB de 1,37 g/l (con un porcentaje de acumulación del 42%). En el reactor de 14 l a las 62 h se alcanzó una acumulación del 25,9% de PHB y una DO_{600} de 4,04. Aunque estos valores muestran que *Ht* KHS3 puede crecer y acumular en mayor escala y bajo condiciones menos controladas, los porcentajes de acumulación aún son inferiores a los obtenidos en cultivos de laboratorio (70-80 % en glicerol). Esta diferencia pone de relieve los retos del escalado (oxigenación, transferencia de masa, mezcla, alimentación, agotamiento de sustratos, etc.). La literatura también muestra que, aunque las halófilas son promisorias como productoras de bajo coste para PHA, la transición al escalado industrial aún presenta desafíos (González-Rojo et al., 2024; Mitra et al., 2020).

La etapa de extracción del polímero constituye un paso crítico del proceso productivo, ya que los distintos métodos disponibles permiten la separación y recuperación de polímeros con características fisicoquímicas particulares. Dichas características pueden diferir en mayor o menor medida de las observadas en los gránulos nativos, en función del método de extracción empleado (MadKour et al., 2013). En este estudio se compararon diferentes métodos de extracción del polímero, incluyendo la ampliamente utilizada extracción con hipoclorito de sodio. Este método tiene como principal ventaja su sencillez, eficacia y, a diferencia de lo que dice la bibliografía (McAdams et al., 2020; Tan et al., 2014), en nuestra experiencia no afectó significativamente el peso molecular del PHB de *Ht* KHS3, lo que lo convierte en una alternativa viable dependiendo del uso final del polímero. La extracción con SDS fue también muy efectiva, por lo que podría ser una alternativa viable a la extracción con hipoclorito si se lo requiriese. Cabe destacar que, a diferencia de lo reportado para otros microorganismos (MadKour et al., 2013), *Ht* KHS3 no requiere ningún pretratamiento previo para la extracción del polímero, y que la concentración de hipoclorito de sodio utilizada en este estudio (1%) es baja en comparación con la reportada en la bibliografía (13%; 5%) (MadKour et al., 2013).

La caracterización del polímero producido con glucosa y glicerol como fuente de carbono mediante FTIR y 1-HNMR confirmó la producción de un homopolímero puro de poli(3-hidroxibutirato), específicamente un PHA de cadena corta. El PHB mostró una alta temperatura de fusión de aproximadamente 176°C, y la degradación térmica se inició a 245°C a través de la ruptura aleatoria de la cadena, que involucró una β -eliminación facilitada por un complejo en anillo (Erceg et al., 2005). Los estudios de DSC revelaron que el PHB mostró el comportamiento térmico característico de un PHA lineal semicristalino derivado de bacterias, indicando la presencia de regiones tanto cristalinas como amorfas (Kong & Hay, 2002). La ausencia de un evento de cristalización en frío durante el escaneo de calentamiento podría atribuirse a la movilidad restringida de la cadena en el PHB. Cabe destacar que el PHB exhibió un alto grado de cristalinidad, lo que impacta significativamente en varias propiedades, como la solubilidad en disolventes orgánicos y las propiedades mecánicas.

La interrupción del gen *phaC1* en *Ht* KHS3 permitió demostrar que esta sintasa es la principal responsable de la síntesis de PHA en esta cepa. La mutante *SF18*, obtenida por integración del plásmido suicida pAR1 en el *locus tag* 19245, mostró una marcada reducción en la acumulación de PHB en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados coinciden con lo observado en *C. necator*, donde la delección del gen *phaC1* dio lugar a una drástica disminución en la producción de PHA (Peplinski et al., 2010). Durante los ensayos iniciales se observó una diferencia en los valores de DO₆₀₀ entre la cepa mutante *SF18* y la cepa salvaje *Ht* KHS3 en las etapas de acumulación de PHB, lo que llevó a plantear la hipótesis de que *SF18* podría presentar una deficiencia en el crecimiento. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron recuentos de UFC/ml en

fase exponencial (baja acumulación) y en fase estacionaria (alta acumulación). Los resultados mostraron que, en fase estacionaria, el incremento en la DO₆₀₀ no se correlacionó con el número de UFC, indicando que la señal de DO₆₀₀ está influenciada por cambios en el tamaño y la morfología celular y no principalmente por un aumento en la cantidad de células viables. En conjunto, estos datos confirman que la diferencia en DO₆₀₀ entre la cepa salvaje *Ht KHS3* y la mutante *SF18* se debe a la acumulación de PHB y no a una deficiencia en el crecimiento por parte de la mutante. La incapacidad de *SF18* para acumular cantidades significativas de PHB incluso en condiciones altamente favorables (1,5–4% v/v de glicerol o 1% p/v de glucosa) indica que en *Ht KHS3* la sintasa PhaC2 no compensa funcionalmente la ausencia de PhaC1. Por otro lado, la persistencia de un bajo pero detectable nivel de acumulación (<10%) en la cepa *SF18* podría explicarse por una actividad residual de PhaC2. La imposibilidad de generar la mutante por interrupción del gen *phaC2* en *Ht KHS3* impide confirmar experimentalmente esta hipótesis, aunque el comportamiento de *SF18* apunta a que la contribución de PhaC2 sería limitada o dependiente de factores regulatorios aún no caracterizados. En este sentido cabe destacar que en *C. necator* existe también una PhaC2 (*locus tag* H16_A2003) cuya identidad de aminoácidos con la PhaC2 de *Ht KHS3* es de 47%. Se ha reportado que esta PhaC2 de *C. necator* se encuentra interactuando con gránulos, pero no se detectó actividad de PHA polimerasa para esta enzima (Pfeiffer-2012), por lo tanto, su rol en el metabolismo de PHA se desconoce. Estudios futuros deberían enfocarse en la interrupción del gen *phaC2* y su caracterización, con el fin de esclarecer completamente la contribución de ambos genes a la síntesis y regulación de PHA en *Ht KHS3*.

Por último, se desarrolló y optimizó un proceso de producción de PHB y PHBV mediante estrategias de diseño experimental. En conjunto, los resultados obtenidos permitieron comprender cómo los componentes del medio y las condiciones de cultivo influyen sobre la producción de biomasa y la acumulación de polímeros, y posibilitaron establecer un proceso en dos etapas con potencial aplicación biotecnológica.

Los estudios iniciales mediante diseño Plackett–Burman permitieron identificar cuáles variables tenían impacto relevante sobre la producción de biomasa y PHB, permitiendo descartar factores sin significancia estadística y concentrar los esfuerzos experimentales en un número reducido de variables. En el caso de la biomasa el amonio y pH inicial fueron las variables significativas a estudiar y en cuanto al PHB fueron la concentración de glicerol, amonio, fosfatos y Fe. Este enfoque resultó particularmente útil dadas las múltiples condiciones evaluadas y la naturaleza multivariable del sistema.

Los diseños factoriales fraccionados posteriores permitieron avanzar hacia la comprensión de las interacciones entre factores. La detección del rol determinante del glicerol, del Fe y del pH inicial tanto en la biomasa como en el PHB, incluyendo interacciones positivas entre ellos, permitió redefinir una región experimental más precisa. La interacción glicerol–amonio, significativa tanto

en biomasa como en PHB, confirma que el metabolismo de *Halomonas* no responde a los factores de manera independiente, sino que las rutas metabólicas centrales se encuentran conectadas. Sin embargo, la contraposición entre los efectos del amonio sobre la producción de biomasa (efecto positivo) y sobre la acumulación de PHB (efecto negativo) se presentó como el principal hallazgo del estudio. Este comportamiento es coherente con la fisiología de la biosíntesis de PHA, comportamiento consistente con lo reportado para otras cepas de *Halomonas* y en *C. necator* (Mitra et al., 2020; Zhang et al., 2022). Esto se debe a que la disponibilidad de nitrógeno favorece el crecimiento celular, mientras que su limitación actúa como señal metabólica para el desvío del exceso de carbono hacia la síntesis de PHA como reserva intracelular.

La aplicación de la metodología de superficie de respuesta mediante un Diseño Central Compuesto permitió modelar y predecir zonas de máximo rendimiento tanto de biomasa como de PHB. La validación experimental confirmó que las predicciones eran confiables, aunque también se identificó un tratamiento empírico que superó al punto óptimo sugerido por el *software*. Esto puede deberse a que el *software* optimiza y predice un óptimo en función de los parámetros experimentales definidos por el investigador dentro del rango estudiado (Tabla 10), lo que podría haber impedido la identificación del óptimo global. Los resultados del primer diseño experimental evidenciaron que las condiciones óptimas para el crecimiento celular eran diferentes a las necesarias para la acumulación de PHB. Esta diferencia llevó a realizar un diseño de producción en dos etapas, una estrategia ya documentada para maximizar la productividad de PHB (Tan et al., 2011). La primera etapa, orientada al crecimiento, se favoreció con altas concentraciones de amonio y la presencia de YE y glicerol. La optimización permitió alcanzar una alta concentración de biomasa en 48 h ($2,62 \pm 0,43$ g/l) con glicerol como fuente de carbono en condiciones estériles necesarias para minimizar la contaminación en esta fase crítica. La observación de que el glicerol presenta un efecto cuadrático y no lineal es relevante para futuros diseños, ya que indica que concentraciones excesivas no necesariamente se traducen en mayor crecimiento.

La segunda etapa requirió ausencia de amonio, menores condiciones de aireación y concentraciones intermedias de glicerol. El efecto negativo de la sal añadida sobre la acumulación de PHB sugiere que, si bien *Halomonas* tolera altas concentraciones de NaCl, el metabolismo de PHA se ve inhibido en condiciones osmóticas demasiado extremas. Además, la ausencia de esterilidad en esta fase demostró que la estrategia es adecuada para procesos industriales, reduciendo costos operativos sin comprometer la pureza del cultivo. La optimización mediante un diseño Box–Behnken permitió ajustar los parámetros críticos, especialmente la agitación, que mostró un comportamiento cuadrático marcado. La validación experimental no sólo confirmó la predicción, sino que demostró que prolongar el cultivo de 4 a 7 días incrementa significativamente la acumulación de polímero (de 1,23 g/l a 3,3 g/l de PHB respectivamente), reforzando la importancia del tiempo como variable operacional en los cultivos de *Ht* KHS3. Aunque estos

resultados son significativos y a la fecha no hay reportes de este tipo para esta cepa, los valores obtenidos son inferiores a los reportados en la literatura para otras cepas de *Halomonas* (Tan et al., 2011).

El diseño de producción en dos etapas permitió estudiar el uso de fuentes de desecho como fuentes de carbono para la producción de PHB, bagazo de cerveza y lixiviado de relleno sanitario, dándole sustentabilidad al proceso. Si bien el lixiviado no pudo ser aprovechado de manera eficiente como fuente de carbono, el bagazo presentó cierto potencial, aunque altamente variable. Esta variabilidad podría deberse a la composición heterogénea del residuo, lo que sugiere la necesidad de pretratamientos o fraccionamientos para estandarizar su uso (Castro-Criado et al., 2023). A pesar de ello, estos estudios demuestran que la estrategia en dos etapas es adaptable a fuentes residuales y constituye una plataforma valiosa para futuras investigaciones en valorización de desechos.

Finalmente, la implementación del esquema en dos etapas para la producción de PHBV permitió evaluar el efecto del ácido propiónico como precursor. Tal como se esperaba, su adición redujo ligeramente la acumulación total de polímero, debido a su toxicidad (Catalán et al., 2018). Sin embargo, el copolímero obtenido presentó un 15% de 3HV, una proporción relevante considerando que se trabajó con una cepa salvaje, sin modificación genética y utilizando glicerol como fuente de carbono. Este valor es considerablemente superior al reportado por Catalán et al. (2018), quienes obtuvieron 2,89% de 3HV con una cepa salvaje de *Herbaspirillum seropedicae* Z69 y 14,1% de 3HV con su mutante, y por Fu et al. (2014), quienes obtuvieron 12% de 3HV en una cepa mutante de *Halomonas* TD01. Además, las diferencias macroscópicas entre los *films* sugieren modificaciones deseadas en las propiedades mecánicas del polímero. Esto confirma la utilidad del proceso en dos etapas como plataforma para la generación de polímeros con diferentes propiedades.

Cabe destacar que *Ht* KHS3 presenta un buen potencial biotecnológico para la acumulación de PHB, pero se deben señalar los desafíos pendientes de optimización de parámetros de fermentación, escalado y alimentación para alcanzar rendimientos industriales que resulten competitivos.

CONCLUSIONES

El análisis comparativo del genoma reveló que *Ht* KHS3 contiene un conjunto bien conservado de genes asociados a la ruta de síntesis, regulación, almacenamiento y degradación de PHA. Este grupo de genes incluye dos sintasas (*phaC1* y *phaC2*), tres fasinas (*phaP1*, *phaP2* y *phaP3*), tres depolimerasas (*phaZ1*, *phaZ2* y *phaZ3*) y un regulador transcripcional (*phaR*). Al igual que en *Halomonas* TD01, los genes se encuentran dispersos en el genoma a excepción de *phaC1* y *phaP1*, que se localizan adyacentes entre sí, aparentemente bajo el control de promotores independientes. La interrupción del gen *phaC1* permitió concluir que esta sintasa tiene un rol protagónico en la acumulación de PHB en las condiciones experimentales estudiadas, ya que su ausencia produjo una cepa incapaz de acumular polímero.

Desde el punto de vista fisiológico, se determinó que *Ht* KHS3 es capaz de acumular PHA en medio mínimo utilizando glucosa y glicerol como única fuente de carbono. El estudio de la acumulación de PHA en diferentes concentraciones de glicerol y de amonio permitió determinar que *Ht* KHS3 es capaz de acumular hasta aproximadamente un 80% de PHB bajo condiciones de desequilibrio C/N y en presencia de altas concentraciones de glicerol, incluso utilizando glicerol crudo proveniente de la industria del biodiésel. La caracterización del polímero reveló que el PHB obtenido presenta propiedades físicas y químicas comparables a las obtenidas en otras especies utilizadas a escala industrial, y que es posible modular características del material a través de las condiciones de cultivo y del agregado de precursores. Por otra parte, el potencial biotecnológico de *Ht* KHS3 se validó en biorreactor empleando un medio mínimo con glicerol y sin esterilidad. La cepa conservó su capacidad de acumulación sin contaminación detectable, lo que permitió escalar el proceso de 2 l a 12l. En conjunto, estos resultados posicionan a *Ht* KHS3 como una plataforma prometedora para la producción industrial de biopolímeros en procesos de bajo costo. Los estudios mediante diseños estadísticos permitieron identificar los factores que afectan al crecimiento y a la acumulación del polímero, demostrando que las condiciones óptimas para la biomasa no coinciden con las óptimas para la producción de PHB. Esto posibilitó diseñar un proceso en dos etapas, una de crecimiento y otra de acumulación, aumentando la eficiencia global del sistema. La estrategia también permitió evaluar fuentes de carbono alternativas y de bajo costo al tratarse de desechos, como el lixiviado de relleno sanitario y el bagazo de cerveza, para la producción de PHB, así como obtener PHBV con un considerable contenido de 3HV. Este valor es notable considerando que se trabajó con una cepa salvaje y con sustratos de bajo costo.

En general, esta tesis aporta una caracterización integral de *Halomonas titanicae* KHS3 como plataforma biotecnológica para la producción de polihidroxialcanoatos. Los resultados obtenidos constituyen una contribución significativa para futuros estudios y posicionan a *Ht* KHS3 como

una candidata prometedora para el desarrollo de bioprocesos sostenibles orientados a la producción industrial de biopolímeros.

Anexo

Tabla A1. Matriz del diseño experimental Plackett-Burman para biomasa y PHB como variables respuesta. Se muestra la composición de los cultivos a experimentar y los resultados obtenidos. Cada fila (1 a 12) muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer tiene una combinación de variables diferentes a excepción de los puntos centrales que son réplicas. *Por cuestiones experimentales estos valores no fueron obtenidos.

Erlenmeyer	Glicerol g/l	Amonio g/l	NaCl g/l	Mg mM	Fosfatos	Fe μM	Volumen ml	pH	Tiempo h	Biomasa g/l	PHB g/l	PHB %	DO ₆₀₀
1	20	0,5	30	0,5	1	3,7	100	6,5	7	1,6	1	62,5	4
2	50	3	30	0,5	-1	3,7	40	7,5	4	3,48	1,98	57	8,6
3	20	0,5	7,5	3	-1	3,7	100	7,5	4	1,2	0,79	66	5,1
4	50	3	7,5	0,5	-1	3,7	100	6,5	7	0,76	0,58	76	2
5	50	3	7,5	3	1	0,9	100	6,5	4	1,27	0,85	67	3,2
6	50	0,5	30	3	-1	0,9	100	7,5	7	1,31	0,74	56,5	3,6
7	20	0,5	7,5	0,5	-1	0,9	40	6,5	4	2,22	1,76	79,3	0,03
8	20	3	7,5	3	1	3,7	40	7,5	7	4,22	2,13	51	12,4
9	50	0,5	7,5	0,5	1	0,9	40	7,5	7	2,9	2,4	83	8,1
10	20	3	30	0,5	1	0,9	100	7,5	4	1,46	0,63	43	1,9
11	50	0,5	30	3	1	3,7	40	6,5	4	1,48	*	*	0,57
12	20	3	30	3	-1	0,9	40	6,5	7	2,52	*	*	6,1

Tabla A2. Matriz del diseño experimental factorial fraccionado 2⁵⁻¹ para biomasa y PHB como variables respuesta. Se muestra la composición de los cultivos a experimentar y los resultados obtenidos. Cada fila (1 a 20) muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer de 100 ml tiene una combinación de variables diferentes a excepción de los puntos centrales que son réplicas. En todas las corridas experimentales se mantuvieron constantes el pH (7,5), la concentración de NaCl (30 g/l) y la concentración de magnesio (1 mM).

Erlenmeyer	Bloque	Glicerol g/l	Amonio g/l	pH inicial	Fosfatos	Fe μM	Biomasa g/l	PHB g/l	PHB %	DO ₆₀₀
1	1	5	0,25	7	-1	0,9	0,61	0,16	26,23	2,85
2	2	50	0,25	7	-1	3,7	0,49	0,24	48,9	1,7
3	2	5	2	7	-1	3,7	1,03	0,06	5,8	3
4	1	50	2	7	-1	0,9	1,08	0,19	17,6	3,5
5	1	5	0,25	8	-1	3,7	0,63	0,35	55,5	2,65
6	2	50	0,25	8	-1	0,9	0,5	0,22	44	1,9
7	2	5	2	8	-1	0,9	1,11	0,1	9	3,2
8	1	50	2	8	-1	3,7	1,71	0,41	23,98	5,35
9	2	5	0,25	7	1	0,9	0,54	0,29	53,7	2
10	1	50	0,25	7	1	3,7	0,42	0,21	50	1,75
11	1	5	2	7	1	3,7	0,85	0,08	9,41	3,3
12	2	50	2	7	1	0,9	1	0,2	20	3,4
13	2	5	0,25	8	1	3,7	0,67	0,34	50,7	2,4

14	1	50	0,25	8	1	0,9	0,46	0,22	47,8	2
15	1	5	2	8	1	0,9	0,95	0,11	11,6	3,35
16	2	50	2	8	1	3,7	1,44	0,27	18,75	4,4
17	1	27,5	1,13	7,5	0	2,3	1,42	0,41	28,9	4,35
18	1	27,5	1,13	7,5	0	2,3	1,3	0,4	30,8	4,5
19	2	27,5	1,13	7,5	0	2,3	1,44	0,25	17,36	3,7
20	2	27,5	1,13	7,5	0	2,3	1,47	0,33	22,45	3,8

Tabla A3. Matriz del diseño experimental central compuesto para biomasa y PHB como variables respuestas. Se muestra la composición de los 22 cultivos a experimentar y los resultados obtenidos. Cada fila muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer tiene una combinación de variables diferentes a excepción de los puntos centrales que son réplicas. En todas las corridas experimentales se mantuvieron constantes el pH (7,5), la concentración de NaCl (30 g/l), la concentración de magnesio (1 mM) y la concentración de fosfatos (K₂HPO₄ 26,45 mM y KH₂PO₄ 48,23 mM). En negrita y subrayado se señala la combinación (Fila 19) de variables que arrojó la mayor producción de PHB, la cual se validó junto con el óptimo predicho por el programa.

Erlenmeyer	Bloque	Glicerol g/l	Amonio g/l	pH inicial	Fe μM	Biomasa g/l	PHB g/l	PHB %	DO ₆₀₀
1	1	40,88	1,65	7,8	1,47	1,98	0,63	31,52	6,1
2	1	40,88	1,65	7,2	1,47	0,69	0,12	12,62	2,1
3	1	40,88	0,6	7,8	3,13	0,85	0,31	36,77	3,3
4	1	14,12	1,65	7,2	3,13	1,84	0,36	19,69	6,2
5	1	40,88	0,6	7,2	3,13	0,61	0,18	29,1	2,4
6	1	14,12	0,6	7,8	1,47	1,24	0,59	45,09	5
7	1	14,12	1,65	7,8	3,13	1,43	0,37	25,65	5,3
8	1	14,12	0,6	7,2	1,47	3,87	0,23	5,85	2,9
9	1	27,5	1,13	7,5	2,3	1,19	0,26	21,68	4,2
10	1	27,5	1,13	7,5	2,3	1,43	0,46	32,11	4,9
11	1	27,5	1,13	7,5	2,3	1,68	0,56	33,44	5,2
12	1	27,5	1,13	7,5	2,3	1,17	0,23	19,7	4
13	2	5	1,13	7,5	2,3	1,14	0,17	14,86	3,9
14	2	50	1,13	7,5	2,3	1,17	0,3	25,54	4,3
15	2	27,5	0,25	7,5	2,3	0,58	0,26	45,21	2,8
16	2	27,5	2	7,5	2,3	2,38	0,66	27,85	8,3
17	2	27,5	1,13	7	2,3	1,19	0,17	14,49	4,4
18	2	27,5	1,13	8	2,3	1,34	0,39	28,83	4,2
<u>19</u>	<u>2</u>	<u>27,5</u>	<u>1,13</u>	<u>7,5</u>	<u>0,9</u>	<u>1,78</u>	<u>0,77</u>	<u>43,47</u>	<u>7,7</u>
20	2	27,5	1,13	7,5	3,7	1,61	0,38	23,66	5,9
21	2	27,5	1,13	7,5	2,3	1,60	0,49	31,16	5,6
22	2	27,52	1,13	7,5	2,3	1,70	0,51	29,94	6,3

Tabla A4. Resultados de la optimización numérica de la producción de PHB. Se muestran las soluciones generadas por el programa para la optimización de variables y respuesta. En negrita y subrayada se indica la condición óptima seleccionada, solución número 1.

	Glicerol g/l	Amonio g/l	pH inicial	Fe μ M	PHB g/l	Deseabilidad
<u>1</u>	<u>40,88</u>	<u>0,61</u>	<u>7,8</u>	<u>1,47</u>	<u>0,65</u>	<u>0,945</u>
2	40,88	0,6	7,79	1,47	0,7032	0,961
3	40,78	0,6	7,8	1,47	0,7045	0,961
4	40,88	0,6	7,8	1,48	0,7029	0,960
5	40,88	0,6	7,78	1,47	0,6965	0,958
6	40,88	0,6	7,8	1,5	0,6995	0,956
7	40,88	0,6	7,78	1,47	0,6922	0,955
8	40,88	0,66	7,8	1,47	0,7053	0,952
9	39,08	0,6	7,8	1,47	0,6968	0,940
10	40,49	0,71	7,8	1,47	0,7025	0,936
11	40,88	0,6	7,8	1,58	0,6778	0,934
12	40,88	0,6	7,8	1,6	0,6731	0,929
13	40,88	0,6	7,7	1,47	0,6418	0,926
14	40,88	0,6	7,69	1,47	0,6394	0,925
15	37,78	0,6	7,79	1,47	0,6880	0,922
16	37,16	0,61	7,8	1,47	0,6865	0,914
17	40,86	0,6	7,8	1,67	0,6555	0,910
18	40,88	0,87	7,8	1,47	0,7005	0,905
19	40,88	0,88	7,8	1,47	0,7003	0,903
20	40,88	0,6	7,8	1,72	0,6445	0,899
21	40,88	0,6	7,61	1,47	0,5830	0,890
22	40,13	0,92	7,8	1,47	0,6978	0,885
23	40,74	0,96	7,8	1,47	0,6982	0,880
24	40,88	0,6	7,56	1,47	0,5554	0,872
25	40,88	0,6	7,8	1,83	0,6165	0,868
26	33,60	0,6	7,8	1,47	0,6664	0,864
27	40,88	0,73	7,56	1,47	0,5524	0,848

Tabla A5. Matriz del diseño factorial fraccionado 2⁸⁻⁴ para la producción de biomasa como variable respuesta. Se muestra la composición de los 20 cultivos a experimentar y los resultados obtenidos. Cada fila muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer de 100 ml tiene una combinación de variables diferentes a excepción de los puntos centrales que son réplicas. En todas las corridas experimentales se mantuvieron constantes el pH (7,5), la concentración de fosfatos (K₂HPO₄ 48,23 mM y KH₂PO₄ 26,45 mM) y la concentración de magnesio (1 mM).

Erlenmeyer	Bloque	Glicerol g/l	Amonio g/l	NaCl g/l	Fe μM	Temperatura °C	Volumen ml	Fortalecido % p/v	Tiempo h	Biomasa g/l	DO ₆₀₀
1	2	2	0,25	15	0,9	28	20	0	18	0,02	0,05
2	1	25	0,25	15	0,9	37	40	0,05	18	0,15	0,45
3	1	2	3	15	0,9	37	40	0	46	0,16	0,52
4	2	25	3	15	0,9	28	20	0,05	46	2,76	7,98
5	1	2	0,25	60	0,9	37	20	0,05	46	0,46	1,21
6	2	25	0,25	60	0,9	28	40	0	46	0,35	1,2
7	2	2	3	60	0,9	28	40	0,05	18	0,15	0,48
8	1	25	3	60	0,9	37	20	0	18	0	0,02
9	1	2	0,25	15	3,7	28	40	0,05	46	0,48	1,21
10	2	25	0,25	15	3,7	37	20	0	46	0	0,009
11	2	2	3	15	3,7	37	20	0,05	18	0,12	0,36
12	1	25	3	15	3,7	28	40	0	18	0,0499	0,17
13	2	2	0,25	60	3,7	37	40	0	18	0,02	0,05
14	1	25	0,25	60	3,7	28	20	0,05	18	0,16	0,56
15	1	2	3	60	3,7	28	20	0	46	0,43	1,2
16	2	25	3	60	3,7	37	40	0,05	46	1,32	4,13
17	1	13,5	1,63	37,5	2,3	32,5	30	0,03	32	1,07	3,4
18	1	13,5	1,63	37,5	2,3	32,5	30	0,03	32	1,24	4,02
19	2	13,5	1,63	37,5	2,3	32,5	30	0,03	32	0,98	2,75

20	2	13,5	1,63	37,5	2,3	32,5	30	0,03	32	1,34	3,37
-----------	---	------	------	------	-----	------	----	------	----	------	------

Tabla A6. Matriz del diseño central compuesto para la optimización de biomasa. Se muestra la composición de los 16 cultivos a experimentar. Cada fila (1 a 16) muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer de 100 ml tiene una combinación de estas variables diferente a excepción de los puntos centrales que son réplicas. En todas las corridas experimentales se mantuvieron constantes el pH (7,5), la concentración de NaCl (60 g/l), la concentración de magnesio (1 mM), la concentración de fosfatos (K_2HPO_4 26,45 mM y KH_2PO_4 48,23 mM) y la concentración de Fe (0,9 μ M).

Erlenmeyer	Bloque	Glicerol g/l	Amonio g/l	Fortalecido % p/v	Biomasa g/l	DO₆₀₀
1	1	25	3	0,02	0,77	0,6
2	1	25	0,6	0,06	1,03	0,73
3	1	4,5	3	0,06	0,88	0,69
4	1	4,5	0,6	0,02	0,83	0,59
5	1	14,75	1,8	0,04	0,79	0,63
6	1	14,75	1,8	0,04	0,96	0,68
7	1	14,75	1,8	0,04	0,92	0,69
8	2	0,25	1,8	0,04	0,18	0,34
9	2	29,25	1,8	0,04	0,87	2,35
10	2	14,75	0,1	0,04	0,76	2,25
11	2	14,75	3,5	0,04	0,77	2,35
12	2	14,75	1,8	0,01	0,53	1,55
13	2	14,75	1,8	0,07	0,94	2,95
14	2	14,75	1,8	0,04	0,83	2,55
15	2	14,75	1,8	0,04	0,76	2,3
16	2	14,75	1,8	0,04	0,64	1,75

Tabla A7. Resultados de la optimización numérica de la producción de biomasa. Se muestran las soluciones generadas por el programa para la optimización de variables y respuesta. En negrita y subrayada se indica la condición óptima seleccionada, solución número 14.

	Glicerol	Amonio	YE %	Biomasa	Deseabilidad
	g/l	g/l	p/v	g/l	
1	25	2	0,06	1,239	1
2	25	2,85	0,06	1,4471	1
3	25	2,8	0,06	1,4342	1
4	25	1,73	0,06	1,1728	1
5	25	1,67	0,06	1,1597	1
6	25	1,6	0,06	1,143	1
7	25	2,68	0,06	1,4064	1
8	25	2,53	0,06	1,3699	1
9	25	1,14	0,06	1,0311	1
10	25	2,58	0,06	1,382	1
11	25	2,47	0,06	1,3554	1
12	25	0,6	0,06	1,03	1
13	25	2,05	0,06	1,2525	1
<u>14</u>	<u>25</u>	<u>0,96</u>	<u>0,06</u>	<u>1,04</u>	<u>1</u>
15	25	1,36	0,06	1,0847	1
16	25	2,6	0,06	1,3858	1
17	25	2,10	0,06	1,2634	1
18	25	2,06	0,06	1,2555	1
19	25	2,65	0,06	1,3983	1
20	25	1,45	0,06	1,1069	1
21	25	2,39	0,06	1,3338	1
22	25	1,18	0,06	1,0404	1
23	25	1,88	0,06	1,2116	1
24	25	2,67	0,06	1,4033	1
25	25	3,00	0,06	1,474	0,997
26	24,75	1,15	0,06	1,03	0,997
27	25	0,62	0,06	0,9044	0,923

28	25	0,6	0,05	0,9043	0,894
-----------	----	-----	------	--------	-------

Tabla A8. Matriz del diseño factorial fraccionado 2^{5-1} para la producción de PHB como variable respuesta. Se muestra la composición de los 22 cultivos a experimentar, cada fila (1 a 22) muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer tiene una combinación de estas variables diferente a excepción de los puntos centrales que son réplicas. A1 y A2 hacen referencia a la variable categórica agitación: A1, sin agitación y A2, con agitación.

Erlenmeyer	Glicerol g/l	Amonio g/l	NaCl g/l	Volumen ml	Agitación rpm	PHB %	DO ₆₀₀
1	0	0	20	40	200	33,3	5,4
2	0	0	0	40	0	12,7	2
3	24,5	0	0	40	200	78,8	13,2
4	24,5	0	20	40	0	23,86	1,3
5	0	0,89	0	40	200	18,3	5,4
6	0	0,89	20	40	0	24	1,8
7	24,5	0,89	20	40	200	51,35	9,2
8	24,5	0,89	0	40	0	44,4	1,75
9	0	0	0	80	200	13,8	4,6
10	0	0	20	80	0	5	1,65
11	24,5	0	20	80	200	54,9	8,2
12	24,5	0	0	80	0	14,9	1,55
13	0	0,89	20	80	200	13,16	4
14	0	0,89	0	80	0	8,6	1,95
15	24,5	0,89	0	80	200	64,5	13,6
16	24,5	0,89	20	80	0	21,83	1,35
17	12,25	0,45	10	60	200	57,2	12,2
18	12,25	0,45	10	60	0	14	1,7
19	12,25	0,45	10	60	200	57,7	12,2
20	12,25	0,45	10	60	0	19,8	1,7
21	12,25	0,45	10	60	200	60	12
22	12,25	0,45	10	60	0	15,3	1,75

Tabla A9. Matriz experimental del diseño Box-Behnken para la optimización de PHB. Se muestra la composición de los 22 cultivos a experimentar. Cada fila (1 a 22) muestra las combinaciones de componentes que generó el programa para estudiar las variables. Cada uno de los frascos Erlenmeyer tiene una combinación de estas variables diferentes a excepción de los puntos centrales que son réplicas.

Erlenmeyer	Glicerol g/l	Volumen ml	Agitación rpm	Biomasa g/l	PHB g/l	PHB seco %	PHB %	DO ₆₀₀
1	5	50	80	1,15	0,34	28,7	25	6,2
2	5	50	200	2,22	1,13	50,91	67,5	12,4
3	25	50	80	1,3	0,29	22,3	27,45	6,4
4	25	50	200	2,48	1,34	54	61,3	13
5	15	40	80	1,73	0,64	37	48,8	8,8
6	15	40	200	3,08	2,04	66,23	82	15,6
7	15	60	80	1,26	0,28	22,2	21,62	5,6
8	15	60	200	3,21	2,16	67,3	70,8	15,2
9	5	40	140	1,96	1,09	55	56,3	10,2
10	25	40	140	2,87	1,85	64	75	15,2
11	5	60	140	2,33	1,27	54	60,2	11,2
12	25	60	140	2,82	1,77	63	74,74	14,6
13	15	50	140	3,43	2,43	70,9	82	17
14	15	50	140	3,24	2,23	69	79,7	16,4
15	15	50	140	3,37	2,26	73	75,87	16,8
16	15	50	140	3,23	2,26	64	82,61	17
17	15	50	140	3,5	2,4	68,6	82,5	16,8
18	5	50	80	1,15	0,34	28,7	25	6,2
19	5	50	200	2,22	1,13	50,91	67,5	12,4
20	25	50	80	1,3	0,29	22,3	27,45	6,4
21	25	50	200	2,48	1,34	54	61,3	13
22	15	40	80	1,73	0,64	37	48,8	8,8

Bibliografía

- Adaya, L., Millán, M., Peña, C., Jendrossek, D., Espín, G., Tinoco-Valencia, R., Guzmán, J., Pfeiffer, D., & Segura, D. (2018). Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2693-2707. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8806-y>
- Anderson-Cook, C. M., Borror, C. M., & Montgomery, D. C. (2009). Response surface design evaluation and comparison. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 139(2), 629-641. <https://doi.org/10.1016/j.jspi.2008.04.004>
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (Phas) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Argandoña, M., Vargas, C., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Salvador, M., & Nieto, J. J. (2012). An extended suite of genetic tools for use in bacteria of the *halomonadaceae*: An overview. En A. Lorence (Ed.), *Recombinant Gene Expression* (Vol. 824, pp. 167-201). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_9
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., & Foglia, T. A. (2005). Synthesis of short-/medium-chain-length poly(Hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules*, 6(4), 2106-2112. <https://doi.org/10.1021/bm058005h>
- Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L., & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: Poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19(9), 2781-2794. <https://doi.org/10.1007/BF01026954>
- Ben Abdallah, M., Saadaoui, I., Al-Ghouti, M. A., Zouari, N., Hahladakis, J. N., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2025). Advances in polyhydroxyalkanoate (Pha) production from renewable waste materials using halophilic microorganisms: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, 963, 178452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.178452>
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (Pha): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791-808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Burdon, K. L., Stokes, J. C., & Kimbrough, C. E. (1942). Studies of the common aerobic spore-forming bacilli: I. Staining for fat with sudan black b-safranin. *Journal of Bacteriology*, 43(6), 717-724. <https://doi.org/10.1128/jb.43.6.717-724.1942>
- Cai, L., Tan, D., Aibaidula, G., Dong, X.-R., Chen, J.-C., Tian, W.-D., & Chen, G.-Q. (2011). Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (Pha) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-88>
- Castro-Criado, D., Abdullah, J. A. A., Romero, A., & Jiménez-Rosado, M. (2023). Stabilization and valorization of beer bagasse to obtain bioplastics. *Polymers*, 15(8), 1877.

- Catalán, A. I., Ferreira, F., Gill, P. R., & Batista, S. (2007). Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1352-1357. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.008>
- Catalán, A. I., Malan, A. K., Ferreira, F., Gill, P. R., & Batista, S. (2018). Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate production by a *prpC* mutant of *Herbaspirillum seropedicae* Z69. *Journal of Biotechnology*, 286, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.008>
- Cavalheiro, J. M. B. T., De Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. M. R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5), 509-515. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.008>
- Cavalheiro, J. M. B. T., Raposo, R. S., De Almeida, M. C. M. D., Teresa Cesário, M., Sevrin, C., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. M. R. (2012a). Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, 111, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.176>
- Cavalheiro, J. M. B. T., Raposo, R. S., De Almeida, M. C. M. D., Teresa Cesário, M., Sevrin, C., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. M. R. (2012b). Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, 111, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.176>
- Cavalheiro, J. M. B. T., Raposo, R. S., De Almeida, M. C. M. D., Teresa Cesário, M., Sevrin, C., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. M. R. (2012c). Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, 111, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.176>
- Chen, G.-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (Pha) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434. <https://doi.org/10.1039/b812677c>
- Chen, Y., Chen, X.-Y., Du, H.-T., Zhang, X., Ma, Y.-M., Chen, J.-C., Ye, J.-W., Jiang, X.-R., & Chen, G.-Q. (2019). Chromosome engineering of the TCA cycle in *Halomonas bluephagenesis* for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (Phbv). *Metabolic Engineering*, 54, 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.03.006>
- Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1999). Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture. In V. Moses, R. E. Cape, & D. G. Springham (Eds.), *Biotechnology: The science and the business* (2nd ed., pp. 177-222). Harwood Academic Publishers.
- Choi, S. Y., Rhie, M. N., Kim, H. T., Joo, J. C., Cho, I. J., Son, J., Jo, S. Y., Sohn, Y. J., Baritugo, K.-A., Pyo, J., Lee, Y., Lee, S. Y., & Park, S. J. (2020). Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*, 58, 47-81. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.009>

- Corti Monzón, G., Nisenbaum, M., Herrera Seitz, M. K., & Murialdo, S. E. (2018). New findings on aromatic compounds' degradation and their metabolic pathways, the biosurfactant production and motility of the halophilic bacterium *Halomonas* sp. KHS3. *Current Microbiology*, 75(8), 1108-1118. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1497-x>
- Das, S., Lengweiler, U. D., Seebach, D., & Reusch, R. N. (1997). Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (*r*)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9075-9079. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9075>
- Dietrich, K., Dumont, M., Orsat, V., & Del Rio, L. F. (2021). IN-DEPTH material characterization of polyhydroxybutyrate from a forest biorefinery. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(46), 51375. <https://doi.org/10.1002/app.51375>
- DOE Joint Genome Institute. (s.f.). Integrated Microbial Genomes (IMG). <https://img.jgi.doe.gov/>
- Dubey, S., & Mishra, S. (2021). Efficient production of polyhydroxyalkanoate through halophilic bacteria utilizing algal biodiesel waste residue. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 624859. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624859>
- D'Ippólito, S., de Castro, R. E., & Herrera Seitz, K. (2011). Chemotactic responses to gas oil of *Halomonas* spp. strains isolated from saline environments in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(2), 107–110. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000200007>
- Erceg, M., Kovačić, T., & Klarić, I. (2005). Dynamic thermogravimetric degradation of poly(3-hydroxybutyrate)/aliphatic–aromatic copolyester blends. *Polymer Degradation and Stability*, 90(1), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2005.02.014>
- Escobar, M. (2021). Caracterización de la acumulación de polihidroxicanoatos a expensas de glicerol en *Halomonas titanicae* KHS3 (Tesina de licenciatura). Universidad Nacional del Litoral.
- García, A., Pérez, D., Castro, M., Urtuvia, V., Castillo, T., Díaz-Barrera, A., Espín, G., & Peña, C. (2019). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate [P(3hb)] of ultra-high molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(6), 1853-1860. <https://doi.org/10.1002/jctb.5959>
- Gasperotti, A. F., Revuelta, M. V., Studdert, C. A., & Herrera Seitz, M. K. (2018). Identification of two different chemosensory pathways in representatives of the genus *Halomonas*. *BMC Genomics*, 19(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4655-4>
- Gasperotti, A. F., Studdert, C. A., Revale, S., & Herrera Seitz, M. K. (2015). Draft genome sequence of *Halomonas* sp. KHS3, a polyaromatic hydrocarbon-chemotactic strain. *Genome Announcements*, 3(2), e00020-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00020-15>
- González-Rojo, S., Paniagua-García, A. I., & Díez-Antolínez, R. (2024). Advances in microbial biotechnology for sustainable alternatives to petroleum-based plastics: A comprehensive review of polyhydroxyalkanoate production. *Microorganisms*, 12(8), 1668. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081668>

- Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R.-M., Zaharia, C., & Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(9), 695-712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>
- Gutiérrez Pulido, H., & Vara Salazar, R. de la. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2a ed.). McGraw-Hill.
- Haider, T. P., Völker, C., Kramm, J., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2019). Plastics of the future? The impact of biodegradable polymers on the environment and on society. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(1), 50-62. <https://doi.org/10.1002/anie.201805766>
- Hartman, T. L. (1940). The use of sudan black b as a bacterial fat stain. *Stain Technology*, 15(1), 23-28. <https://doi.org/10.3109/10520294009110328>
- Ibrahim, M. H. A., & Steinbüchel, A. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* mw1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6222-6231. <https://doi.org/10.1128/AEM.01162-09>
- Ingaramo Carosi, J. (2022). Aprovechamiento de sustratos económicos para la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Halomonas titanicae* KHS3 y estudio de su biodegradabilidad (Tesina de licenciatura). Universidad Nacional del Litoral.
- Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 403-432. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (Carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, 16(8), 2357-2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Johnston, B., Radecka, I., Hill, D., Chiellini, E., Ilieva, V., Sikorska, W., Musioł, M., Zięba, M., Marek, A., Keddie, D., Mendrek, B., Darbar, S., Adamus, G., & Kowalczyk, M. (2018). The microbial production of polyhydroxyalkanoates from waste polystyrene fragments attained using oxidative degradation. *Polymers*, 10(9), 957. <https://doi.org/10.3390/polym10090957>
- Kadouri, D., Burdman, S., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2002). Identification and isolation of genes involved in poly(B-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2943-2949. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2943-2949.2002>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2003a). Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3244-3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2003b). Poly-hydroxybutyrate depolymerase (Phaz) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Archives of Microbiology*, 180(5), 309-318. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0590-z>

- Kalia, V. C., Singh Patel, S. K., Shanmugam, R., & Lee, J.-K. (2021). Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 326, 124737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124737>
- Kansiz, M., Domínguez-Vidal, A., McNaughton, D., & Lendl, B. (2007). Fourier-transform infrared (Ftir) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (Phas). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5-6), 1207-1213. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1337-5>
- Kawata, Y., & Aiba, S. (2010). Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *halomonas* sp. Km-1 using waste glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(1), 175-177. <https://doi.org/10.1271/bbb.90459>
- Koller, M. (2018). A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (Pha) biopolyesters. *Fermentation*, 4(2), 30. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- Kong, Y., & Hay, J. N. (2002). The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. *Polymer*, 43(14), 3873-3878. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00235-5)
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (Pha) production. *Bioengineering*, 4(2), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620-634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>
- Kutralam-Muniasamy, G., & Pérez-Guevara, F. (2018). Genome characteristics dictate poly-R-(3)-hydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 79. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2460-5>
- Liu, C., Wang, X., Yang, H., Liu, C., Zhang, Z., & Chen, G. (2021). Biodegradable polyhydroxyalkanoates production from wheat straw by recombinant *Halomonas elongata* A1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 675-682. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.137>
- Madkour, M. H., Heinrich, D., Alghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2013). Pha recovery from biomass. *Biomacromolecules*, 14(9), 2963-2972. <https://doi.org/10.1021/bm4010244>
- Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T., & Doi, Y. (2002). A repressor protein, phar, regulates polyhydroxyalkanoate (Pha) synthesis via its direct interaction with pha. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3992-4002. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3992-4002.2002>
- Maestro, B., & Sanz, J. M. (2017). Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1323-1337. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (Phb) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics.

- Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Mitra, R., Xu, T., Xiang, H., & Han, J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01342-z>
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Muigano, M. N., Mauti, G. O., Anami, S. E., & Onguso, J. M. (2025). Advances and challenges in polyhydroxyalkanoates (Pha) production using *Halomonas* species: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 309, 142850. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.142850>
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). *Bioreaction engineering principles*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0767-3>
- Nygaard, D., Yashchuk, O., & Hermida, É. B. (2019). Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: Application of the response surface methodology. *Heliyon*, 5(3), e01374. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01374>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z., & Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795-4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 238-241. <https://doi.org/10.1128/aem.44.1.238-241.1982>
- Park, S. L., Cho, J. Y., Choi, T.-R., Song, H.-S., Bhatia, S. K., Gurav, R., Park, S.-H., Park, K., Joo, J. C., Hwang, S. Y., & Yang, Y.-H. (2021). Improvement of polyhydroxybutyrate (Phb) plate-based screening method for PHB degrading bacteria using cell-grown amorphous PHB and recovered by sodium dodecyl sulfate (Sds). *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 413-421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.098>
- Peplinski, K., Ehrenreich, A., Döring, C., Bömeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C., & Steinbüchel, A. (2010). Genome-wide transcriptome analyses of the ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology*, 156(7), 2136-2152. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038380-0>
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2012). Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (Phb) granule-associated proteins during phb granule formation and identification of two new phasins, phap6 and phap7, in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5909-5921. <https://doi.org/10.1128/JB.00779-12>
- Pham, T. H. (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*, 150(10), 3405-3413. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>

- Pokój, T., Klimiuk, E., & Ciesielski, S. (2019). Interactive effect of crude glycerin concentration and C:N ratio on polyhydroxyalkanoates accumulation by mixed microbial cultures modelled with Response Surface Methodology. *Water Research*, 156, 434-444. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.033>
- Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (Pha) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 148(8), 2413-2426. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2413>
- Redersdorff, I., Rodríguez, A., Escobar, M., Studdert, C., & Herrera Seitz, M. (2024). Rapid method for estimating polyhydroxybutyrate accumulation in bacteria using sodium hypochlorite. *BIO-PROTOCOL*, 14(1360). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5130>
- Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15-33. <https://doi.org/10.1042/bj20031254>
- Rehm, B. H. A. (2006). Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnology Letters*, 28(4), 207-213. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5521-4>
- Reusch, R. N. (1989). Poly- γ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. *Experimental Biology and Medicine*, 191(4), 377-381. <https://doi.org/10.3181/00379727-191-42936>
- Ruiz, J. A., López, N. I., Fernández, R. O., & Méndez, B. S. (2001). Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 225-230. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.225-230.2001>
- Shrivastava, A. (2018). *Introduction to plastics engineering*. William Andrew.
- Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 81-96. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00036-6)
- Stubbe, J., & Tian, J. (2003). Polyhydroxyalkanoate (Pha) homeostasis: The role of the PHA synthase. *Natural Product Reports*, 20(5), 445. <https://doi.org/10.1039/b209687k>
- Stubbe, J., Tian, J., He, A., Sinskey, A. J., Lawrence, A. G., & Liu, P. (2005). Nontemplate-dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 433-480. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133013>
- Tan, D., Xue, Y.-S., Aibaidula, G., & Chen, G.-Q. (2011). Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology*, 102(17), 8130-8136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.068>
- Tan, G.-Y., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J.-Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (Pha): A review. *Polymers*, 6(3), 706-754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>

- Tanadchangsang, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2808-2818. <https://doi.org/10.1002/bit.24546>
- Tohme, S., Hacıosmanoğlu, G. G., Eroğlu, M. S., Kasavi, C., Genç, S., Can, Z. S., & Toksoy Oner, E. (2018). Halomonas smyrnensis as a cell factory for co-production of PHB and levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1238-1246. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.197>
- Tribelli, P. M., Pezzoni, M., Brito, M. G., Montesinos, N. V., Costa, C. S., & López, N. I. (2020). Response to lethal UVA radiation in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*: Polyhydroxybutyrate and cold adaptation as protective factors. *Extremophiles*, 24(2), 265-275. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01152-1>
- Tschoeke, I. C. P., Fraga, T. J. M., Da Silva, M. P., Costa E Souza, T. P., & Chinelate, G. C. B. (2023). Biogas production from malt bagasse from craft beer industry: Kinetic modeling and process simulation. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 25(5), 2809-2821. <https://doi.org/10.1007/s10163-023-01715-7>
- Van-Thuoc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G., & Mattiasson, B. (2007). Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology*, 0(0), 071003000434003-??? <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03553.x>
- Walpole, R. E. (2011). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. Pearson Educación de México.
- Wang, J., & Qiao, Z. (2024). A comprehensive review of landfill leachate treatment technologies. *Frontiers in Environmental Science*, 12, 1439128. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1439128>
- Williamson, D. H., & Wilkinson, J. F. (1958). The isolation and estimation of the poly- -hydroxybutyrate inclusions of bacillus species. *Journal of General Microbiology*, 19(1), 198-209. <https://doi.org/10.1099/00221287-19-1-198>
- Yang, Y.-H., Brigham, C., Willis, L., Rha, C., & Sinskey, A. (2011). Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (Phas). *Biotechnology Letters*, 33(5), 937-942. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0513-4>
- York, G. M., Lupberger, J., Tian, J., Lawrence, A. G., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2003). *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D -(–)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3788-3794. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3788-3794.2003>
- Zaldívar Carrillo, J. A., Stein, L. Y., & Sauvageau, D. (2018). Defining nutrient combinations for optimal growth and polyhydroxybutyrate production by *Methylosinus trichosporium* OB3B using response surface methodology. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1513. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01513>
- Zhao, H., Yao, Z., Chen, X., Wang, X., & Chen, G. (2017). Modelling of microbial

polyhydroxyalkanoate surface binding protein PhaP for rational mutagenesis. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1400-1411. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12820>

Zhao, Y. H., Li, H. M., Qin, L. F., Wang, H. H., & Chen, G.-Q. (2007). Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), 34-41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>

Zhou, X.-Y., Yuan, X.-X., Shi, Z.-Y., Meng, D.-C., Jiang, W.-J., Wu, L.-P., Chen, J.-C., & Chen, G.-Q. (2012). Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-54>