



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2: producció i caracterització

Mònica Bassas i Galià 2007



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de doctorat: Química Orgànica (Facultat de Químiques)

BIENNI 2002-2004

Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2: producció i caracterització

Memòria presentada per **Mònica Bassas i Galià** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Director/a:

Dra. Àngels Manresa i Presas

Dr. Joan LLorens i Llacuna

Doctorand:

Mònica Bassas i Galià

Mònica Bassas i Galià, 2007

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 Microorganisme

El microorganisme emprat en aquest estudi és *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *P. aeruginosa* 42A2 és un bacil gramnegatiu aïllat d'una mostra d'aigua contaminada amb residus oliosos. Inicialment fou classificada com *Pseudomonas sp.* (Robert et al., 1988) i registrada com a *Pseudomonas sp.* 42A2 NCIMB 40045 a la col·lecció *National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd, Aberdeen, UK*. Finalment fou identificada com a *Pseudomonas aeruginosa* mitjançant la seqüenciació del gen del 16S del RNA ribosòmic (referència AJ309500 en el Genbank) obtenint un 100% d'homologia amb el 16SrRNA de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Fernández et al., 2005).

3.2 Medi de cultiu i condicions de cultiu

En aquest estudi s'ha treballat amb dos tipus de cultius diferents de *P. aeruginosa* 42A2: cultius de cèl·lules proliferants i cultius de cèl·lules no proliferants. Per als cultius de cèl·lules proliferants s'utilitza un medi mineral mínim i per als cultius amb cèl·lules no proliferants s'empra una solució de fosfats (solució amortidora Sørensen) com a medi de cultiu. Els cultius s'incuben a 30 °C i amb agitació orbital de 120 rpm.

3.2.1 Cultius de cèl·lules proliferants

Per als cultius amb cèl·lules proliferants es treballa amb matrassos amb osques (200 mL de cultiu en matrassos d'1 L) i en alguns dels experiments s'ha escalat a bioreactor. Malgrat emprar el mateix medi de cultiu tant en els experiments en matrassos com en el fermentador, per les característiques tècniques de l'aparell, la preparació del medi de cultiu i de l'inòcul es segueixen metodologies diferents.

3.2.1.1 Composició i preparació del medi de cultiu

El medi de cultiu emprat és un medi mineral mínim (medi MM1) que conté (g/L): CaCl₂ (0,01), NaNO₃ (3,5), K₂HPO₄ (2,0), KH₂PO₄ (1,0), KCl (0,1), MgSO₄·7H₂O (0,5), FeSO₄·7H₂O (0,012) i 0,05 mL/L de la solució d'oligoelements .

La solució d'oligoelements té la següent composició (g/100 mL solució mare): H₃BO₃ (0,148), CuSO₄·5H₂O (0,196), MnSO₄·H₂O (0,154), Na₂MoO₄·2H₂O (0,015),

ZnSO₄·7H₂O (0,307). Les sals es dissolen en aigua desionitzada i la solució s'esterilitza per filtració.

Es preparen solucions mare concentrades de totes les sals i s'esterilitzen per separat a l'autoclau (1atm, 20 min., 121 °C), per tal d'evitar que precipitin.

Per als experiments en matrassos, s'esterilitzen els matrassos amb el corresponent volum d'aigua destil·lada per a obtenir un volum final de cultiu de 200 mL. El volum d'aigua depèn de les condicions de cultiu, és a dir:

$$V_{H_2O} = 200\text{mL} - \text{mL sals} - \text{mL inòcul} - \text{mL substrat}$$

Es reconstitueixen els medis de cultiu a partir de les solucions concentrades de les sals, ajustant les concentracions finals del medi segons la Taula 2.1. Es treballa en condicions d'esterilitat. S'ajusta el pH=6,8-7,0, en cas que sigui necessari.

Taula 2.1. Solucions mare de les sals del medi de cultiu. (*) 0,5 mL de la solució mare d'oligoelements per 100 mL de solució de (KCl+ MgSO₄·7H₂O)

| Solucions de les sals del medi de cultiu | | | |
|---|---------------------------------|---|-------------------------------------|
| | Sol. mare (g/100 mL) | Volum sol. mare (mL)/100 mL cultiu | Conc. Final matrau (g/L) |
| CaCl₂ | 0,1 | 1 | 0,01 |
| (*) KCl | 1 | 1 | 0,1 |
| MgSO₄·7H₂O | 5 | 1 | 0,5 |
| KH₂PO₄ | 5 | 2 | 1 |
| K₂HPO₄ | 10 | | 2 |
| FeSO₄·7H₂O | 0,12 | 1 | 0,012 |
| NaNO₃ | 35 | 1 | 3,5 |

Per als experiments en bioreactor, s'introduiran alguns canvis en la metodologia a l'hora de preparar el medi de cultiu. Es treballarà amb un volum final en el bioreactor de 10 L.

El medi de cultiu, en aquest cas s'esterilitza per filtració a excepció de la sal de FeSO₄·7H₂O (100 mL de la solució mare, 0,12 g/L) que s'addicionarà (estèril) per separat. Es dissolen 0,1 g de CaCl₂, 35 g de NaNO₃, 20 g de K₂HPO₄, 10 g de KH₂PO₄, 1 g de KCl i 5 g de MgSO₄·7H₂O en dos litres d'aigua desionitzada. Un cop les sals estan completament dissoltes, es transvasen en un tanc i s'hi addiciona aigua desionitzada fins a un determinat volum d'aigua, V_{H₂O}. Aquest volum d'aigua dependrà de les condicions de cada experiment de manera que: V_{H₂O} = 10 L – (mL inòcul + mL fonts de carboni). Finalment s'addicionen els oligoelements (0,05 mL solució mare/L).

Es tanca el tanc i amb ajut de pressió es transvasa tot el contingut del tanc al fermentador (prèviament esterilitzat amb vapor d'aigua).

3.2.1.2. *Fonts de carboni*

Es va dur a terme un estudi de diferents fonts de carboni: substrats definits i substrats complexos. A l'hora de fer l'estudi de les diferents fonts de carboni s'han tingut en compte diferents consideracions: (1) trobar una font de carboni que ens permeti introduir a les cadenes del polímer grups funcionals susceptibles de ser modificats químicament a posteriori, com per exemple la introducció del grup vinil, com a precursor del grup diol, àcid carboxílic, i (2) emprar fonts de carboni complexos poliinsaturades, per a la producció de polihidroxiàlquenoats.

En els cultius de cèl·lules proliferants s'han estudiat diferents tipus de font de carboni: substrats definits i substrats complexos.

i) Els substrats definits són els següents:

- ❖ Àcid nonanoic , 97% (C9:0) (Sigma, USA)
- ❖ Àcid undecanoic, 97% (C11:0) (Fluka, Suïssa)
- ❖ Àcid 10-undecenoic, 99% (C11:1 Δ^{10}) (Aldrich, Alemanya)
- ❖ C11:0+C11:1 Δ^{10}

En el cas de l'àcid 10-undecenoic i l'àcid undecanoic, ambdues fonts de carboni presenten punts de fusió molt baixos ($T_{f(C11:0)} = 26-29\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T_{f(C11:1)} = 23-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i per tant poden precipitar molt fàcilment, a temperatura de treball. Aquest fet feu que es plantegés de treballar amb la sal sòdica en el cas del C11:1 Δ^{10} i amb la sal potàssica en el cas del C11:0.

- Obtenció de la sal sòdica de l'àcid undecenoic (NaC11:1 Δ^{10})

Es fan reaccionar 110,6 g de C11:1 Δ^{10} amb 27 g de NaOH (10% ee) i la solució obtinguda es porta a un volum de 500 mL. Per tal de tenir una concentració final de 54 mM (10 g/L) en el fermentador, s'han d'addicionar 450 mL d'aquesta solució.

- Obtenció de la sal potàssica de l'àcid undecanoic (KC11:0)

Es fan reaccionar 55,8 g de C11:0 amb 21,65 g KOH (10% ee) i la solució obtinguda es dissolt en un volum de 250 mL. S'addicionen 225 mL d'aquesta solució per tal de tenir una concentració final al fermentador de 27 mM (5 g/L).

ii) Les fonts de carboni complexes que s'han utilitzat són les següents: àcid linoleic (60%), oli de llinosa (linseed oil), oli de fusta (tung oil), oleïna, extracte pasta monodi (oli monodi). La composició d'aquests substrats està descrita a la Taula 2.2.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment un dels substrats complexos que s'ha provat és el que s'ha denominat *extracte pasta monodi o oli monodi*, i que s'obté com a subproducte dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid oleic (o olis residuals compostos principalment per àcid oleic, com per exemple l'oleïna) com a font de carboni principal.

Aquest extracte té textura d'oli i s'obté a partir d'un cultiu amb oleïna (2 %) com a font de carboni. Es centrifuga el cultiu i es separa el sobrenedant. A continuació s'acidifica el sobrenedant amb HCl concentrat fins a pH=1, es deixa que precipiti a 4 °C durant 24 hores i es centrifuga per tal de recuperar el precipitat (pasta blanca). Es fa una extracció del precipitat amb cloroform i s'obté un oli (extracte pasta monodi).

La composició d'aquest oli és bàsicament àcid oleic i dos productes de biotransformació de l'àcid oleic: àcid (E)-10-hidroxi-8-octadecenoic (*mono-*) i àcid (E)-7,10-dihidroxi-8-octadecenoic (*di-*), (Culleré et al., 2001).

Taula 2.2. Composició dels substrats complexos. On: Àcid palmític (C16:0) ; àcid esteàric (C18:0); àcid oleic (C18:1 Δ^9); àcid linoleic (C18:2 $\Delta^{9,12}$); àcid linolènic (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$); àcid eleostereàric (C18:3 $\Delta^{9,11,13}$); mono- (àcid (E)-10-hidroxi-8-octadecenoic) i di- (àcid (E)-7,10-dihidroxi-8-octadecenoic).

| SUBSTRATS | | | | | |
|---|--------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|----------------------------------|
| | Àcid linoleic (60%) | oli de llinosa | oli de fusta | oleïna | Extracte pasta Monodi |
| C16:0 | 3,0 | 6,3 | 4,6 | 23,2 | - |
| C18:0 | 1,0 | 2,5 | - | 9,6 | - |
| C18:1Δ^9 | 60,0 | 19,0 | 4,1 | 44,2 | 16,2 |
| C18:2$\Delta^{9,12}$ | 26,0 | 24,1 | 0,6 | 14,6 | - |
| C18:3$\Delta^{9,12,15}$ | 6,0 | 47,4 | - | - | - |
| C18:3$\Delta^{9,11,13}$ | - | - | 90,7 | - | - |
| mono- | - | - | - | - | 27,5 |
| di- | - | - | - | - | 56,3 |
| altres | 4,0 | 3,2 | - | 4,5 | - |

3.2.1.3. Preparació de l'inòcul

La preparació de l'inòcul també serà diferent en els experiments en matrassos i en els experiments en bioreactor.

Per als experiments en matrassos l'inòcul de *P. aeruginosa* 42A2 es prepara a partir d'un cultiu d'aquest microorganisme durant 24 h, en medi sòlid nutritiu (Trypticase Soy Agar (TSA), Pronadisa, Barcelona, Espanya). Es resuspen la biomassa d'un cultiu de 24 hores d'una placa de TSA en 5 mL de solució de NaCl (0,9 %) estèril. S'ajusta la suspensió a una densitat òptica $DO_{\lambda=540\text{nm}} = 2 \pm 0,2$ (aproximadament 1,5 mL de la suspensió cel·lular en 8,5 mL de NaCl (0,9 %) estèril). Les mesures es duen a terme amb un espectrofotòmetre Uvikon 922 (Kontron Instruments, Milà, Itàlia). S'utilitza com a blanc per a les mesures espectrofotomètriques, la solució de NaCl (0,9 %).

Un cop es té ajustada la suspensió cel·lular de l'inòcul a una densitat òptica ($DO_{\lambda=540\text{nm}}$) de $2 \pm 0,2$ s'inocula el medi de cultiu al 2 % (v/v).

En canvi, en els experiments amb bioreactor s'emprarà com a inòcul un precultiu de *P. aeruginosa* 42A2 en medi mínim mineral (MM1) i citrat sòdic (20 mM) com a font de carboni. El precultiu s'incubarà 24 h, a 30 °C i en un agitador orbital a 120 rpm. S'inocularan els 500 mL del precultiu (amb $DO_{\lambda=540\text{nm}} = 1,3 \pm 0,2$), directament al bioreactor. Segons estudis previs, amb el citrat sòdic no hi ha acumulació intracel·lular. D'aquesta manera, les cèl·lules inoculades al fermentador no contenen grànuls de PHA.

3.2.1.4. Condicions de cultiu: Matrassos i Bioreactor

i) Matrassos

Per als experiments en matrassos s'han utilitzat matrassos d'1 L amb osques (Anorsa, Barcelona) amb taps de cotó hidròfob i s'ha treballat amb 200 mL de medi de cultiu. Els matrassos són esterilitzats prèviament a l'autoclau (121 °C, 1 atm, 20 minuts).

ii) Descripció del bioreactor HPR (High Pressure Reactor)

Els cultius s'han realitzat en un bioreactor HPR (Bioengineering AG, Wald-CH) amb la unitat de fermentació modificada (Biospectra AG, Schlieren-CH) per tal de

garantir una millor precisió en el sistema d'alimentació dels substrats, així com també l'automatització del procés. Tant el bioreactor com totes les connexions estan dissenyades per a poder treballar en cultiu continu i amb una sobrepressió de 10 bar. També s'ha modificat el sistema d'alimentació dels substrats de manera que en cas que sigui necessari es pot treballar amb tres tipus diferents de substrats en un mateix experiment. Es controla l'addició del substrat mitjançant un sistema de balances i de bombes d'HPLC (Figura 3.3).

La unitat de control (Figura 3.4) és un Siemens SIMATIC S7-300 (Siemens, Alemanya). Tot el procés està controlat pel programa Lucullus Process Information Management System (PIMS; Biospectra AG) que permet treballar amb diferents règims de cultiu: cultiu continu, cultiu alimentat i successius cultius alimentats, gradients d'alimentació exponencials i cultius continus (quimiostat, pH-stat, pO₂-stat).

El tanc de reacció és d'acer inoxidable amb una capacitat màxima de 16 L, però es treballa amb un volum de treball de 10 L.

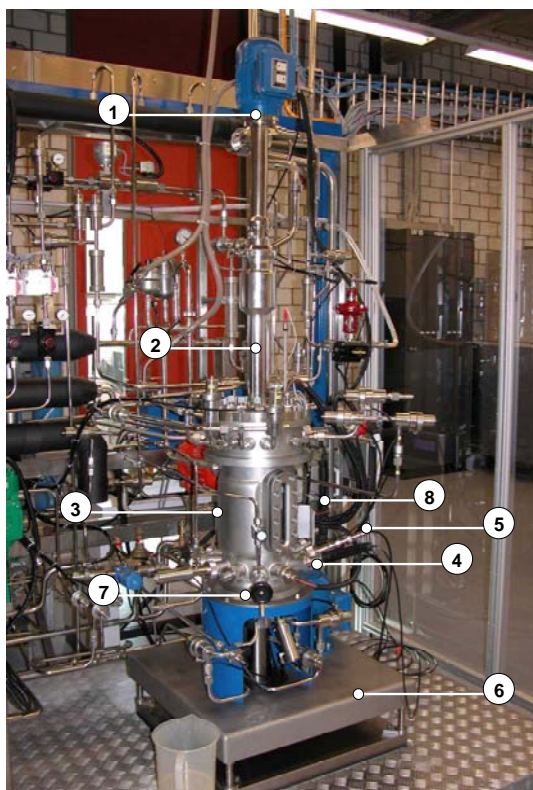


Figura 3.1. Bioreactor HPR. Les parts més importants s'han indicat amb números. (1) trencador d'escuma; (2) agitador; (3) tanc d'hacer inoxidable de 16 L de capacitat; (4) sonda de pH; (5) sonda de pO₂; (6) balança per a controlar el pes del tanc de reacció; (7) punt de mostratge; (8) punt d'entrada del substrat.

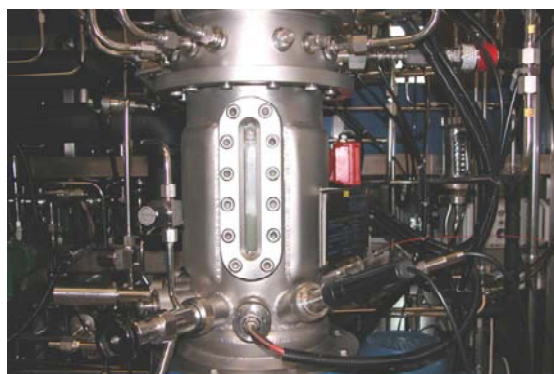


Figura 3.2. Tanc de reacció d'acer inoxidable amb sondes de pH i pO₂.



Figura 3.3. Sistema d'alimentació. Bombes d'HPLC i balances.

L'equip permet controlar la temperatura de treball, així com el pH i la saturació d'oxigen durant el procés. S'han utilitzat sondes de pH i pO_2 de Mettler Toledo (Greifensee, Suïssa). El bioreactor pot treballar a una velocitat d'agitació de 0-1400 rpm (agitador tipus hèlix marina) i a unes velocitats de flux de 0-5 L/min per l' O_2 , de 0-20 L/min per l'aire i de 0-200 L/min en el cas del N_2 .



Figura. 3.4. Unitat control Siemens SIMATIC S7-300

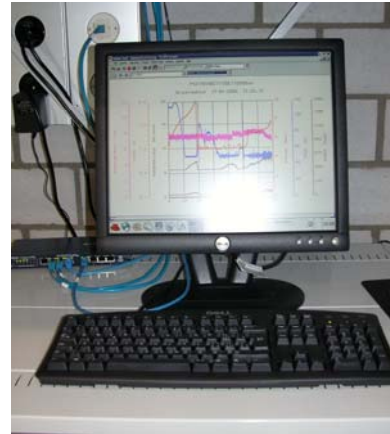


Figura 3.5. Software Lucullus Process Information Management

❖ Condicions de treball

El tanc de reacció s'esterilitza amb vapor d'aigua durant 30 minuts, mentre que el medi de cultiu s'esterilitza per filtració. S'han provat diferents estratègies d'alimentació: alimentació per polsos i/o alimentació continua. La temperatura de treball és de 30 °C i s'ha fixat la pressió d'oxigen al 50 %. La pO_2 es regula amb el flux d'aire i amb l'agitació. En cas que sigui necessari també es pot regular amb el flux d' O_2 pur. Es treballa a pressió atmosfèrica. El pH es manté a 7.0 i es regula amb l'addició d'una solució d'àcid fosfòric al 10 % (v/v).

La formació d'espuma al llarg del procés es controla amb un accessori que s'anomena trencador d'espuma i en cas que no sigui suficient s'utilitzarà un antiespumant, polipropilenglicol (PPG).

3.2.2. Cultius amb cèl·lules no Proliferants

El cultiu amb cèl·lules no proliferants es va escollir com una estratègia alternativa de cultiu.

3.2.2.1 Composició i preparació del medi de cultiu

Les cèl·lules es resuspenen en una solució amortidora de Sørensen (pH= 7,20). Es prepara la solució amortidora de Sørensen a partir de dues solucions mare de KH_2PO_4 (0,5 M) i Na_2HPO_4 (0,5 M) (A i B respectivament). Es mesclen 7,7 mL solució A, 14,1 mL solució B i es porta a un volum final de 500 mL amb aigua desionitzada. S'esterilitza la solució amortidora de Sørensen a l'autoclau (121 °C, 1 atm, 20 minuts).

3.2.2.2 Fonts de carboni

Per als cultius amb cèl·lules no proliferants s'han utilitzat les següents fonts de carboni:

- C11:1 i C11:0
- Extracte de la pasta monodi (descriu a l'apartat 3.2.1.2)

3.2.2.3 Inòcul

La biomassa pel cultiu en condicions no proliferants o inòcul s'obté a partir de 200 mL d'un precultiu de 60 h (en condicions proliferants, medi MM1, 2 % d'inòcul i la concentració corresponent de la font de carboni emprada; 30 °C i 120 rpm), el qual es centrifuga a 8000 x g (Kontron Centrikon T-124, rotor A-6.9, Milà, Itàlia) durant 20 minuts, a 4 °C. Es resuspen la biomassa obtinguda en 100 mL de solució de NaCl (0,9 %) estèril i es manté la suspensió cel·lular en agitació suau durant 20 minuts. D'aquesta manera s'eliminen les restes de font de carboni i nitrats del medi en condicions proliferants. Es torna a centrifugar i es resuspen la biomassa neta en 75 mL tampó Sørensen (es concentra la suspensió cel·lular). S'addiciona la font de carboni en funció de l'estratègia de cultiu. Tot aquest procés s'ha de fer el més ràpid possible i a temperatura baixa (4 °C) per evitar processos de lisis cel·lular o de biodegradació intracel·lular del polímer (PHA). Finalment els matrassos s'incubaran en un agitador orbital a 120 rpm, 30 °C. El temps de cultiu depèn de cada experiment i del substrat emprat (oscil·la entre les 24-96 hores de cultiu).

3.2.2.4. Condicions de cultiu: Matrassos

Per a realitzar els experiments en matrassos s'han utilitzat matrassos de 500 mL amb osques (Anorsa, Barcelona) amb taps de cotó hidròfob. El volum de treball serà de 75 mL de medi de cultiu. Els matrassos seran prèviament esterilitzats a l'autoclau (121 °C, 1 atm, 20 minuts).

3.3 Determinació de la biomassa

La determinació quantitativa de la biomassa en g/L obtinguda en els diferents cultius s'obté gravimètricament mitjançant la mesura del pes sec.

3.3.1 Experiments en matrassos

En el cas dels experiments en matrassos, el pes sec s'obté de 10 mL de medi de cultiu, que es centrifuga (10000 x g; 4 °C; 15 min.) i la biomassa obtinguda es renta amb aigua desionitzada dues vegades. En alguns casos és necessari fer un rentat amb H₂O + 10 % (v/v) d'hexà per tal d'eliminar les restes de font de carboni, així com els diferents pigments que es formen al llarg dels processos: pigment groc fluorescent i soluble en aigua (pioverdina) i un pigment lilós insoluble en aigua. Finalment es resuspen la biomassa en el mínim volum possible d'aigua desionitzada (en aquest cas 2 mL) i es deixa assecar a l'estufa a 100 °C fins a pes constant.

3.3.2 Experiments en bioreactor

Per les mostres del bioreactor, malgrat que també s'han fet mesures gravimètriques de la biomassa, el procediment és diferent. Es filtra el cultiu (amb un sistema de buit) i la biomassa es recull sobre filtres de policarbonat (0,2 µm de mida de porus, Nuclepore, Sterico AG, Dietikon, Suïssa). Els filtres són prèviament rentats amb MgCl₂ (10 mM), assecats durant 24 h a 100 °C. Es refreden en un dessecador amb silicagel fins a temperatura ambient i es taren. Un cop es tenen els filtres nets i pesats es filtren 5 mL de cultiu amb un sistema de buit, büchner i placa filtrant de manera que la biomassa queda retinguda al filtre. El filtre, prèviament tarat, es deixa assecar a 100 °C tota la nit i finalment es pesa.

En el cas del bioreactor també es determina espectrofotomètricament el creixement del cultiu. Es fan mesures de densitat òptica a $\lambda=540$ nm.

3.4 Determinació de la font de nitrogen residual

La determinació de la font de nitrogen residual es fa mitjançant la determinació de nitrats en el sobrenedant. Aquesta determinació es realitza amb el kit Aquamerck 8032 (Merck) o amb les tires Merckoquant 1.10020 Nitrate Test (strips). El rang de detecció d'aquests tests és de 10-500 mg/L.

3.5 Determinació de la font de carboni residual (TOC)

En el cas dels experiments en bioreactor es farà un seguiment de la font de carboni residual del medi mitjançant mesures de TOC (Total Organic Carbon). Les mesures del TOC es realitzen amb un equip Shimadzu TOC-5050A (Reinach, Suïssa). Es centrifuguen 2 mL de medi de cultiu en un eppendorf (10000 x g; 4 °C; 5 min.). Es decanta el sobrenedant i es filtra sobre un filtre d'acetat de cel·lulosa (0,45 µm de mida de porus, Disposable Syringe Filter Corning, Japó). Així eliminem possibles restes d'antiespumant (PPG) del sobrenedant, ja que interferirien en les mesures de TOC.

La resposta de l'equip és lineal entre 10-100 ppm, per tan en la majoria dels casos es necessària una dilució (1:50 v/v) de la mostra.

3.6. Determinació qualitativa i quantitativa del polímer (PHA)

3.6.1. Determinació qualitativa dels grànuls de PHA. Tinció amb roig nil

La tinció amb roig nil permet l'observació directe al microscopi de fluorescència de les inclusions lipídiques. D'aquesta manera es pot seguir l'estat fisiològic de les cèl·lules, així com el procés d'acumulació intracel·lular. És especialment útil en els cultius amb bioreactor (Gorenflo *et al.*, 1999).

S'agafen 2 mL de cultiu en un eppendorf i s'hi addicionen dues gotes del reactiu de roig nil (es prepara una solució 0,25 mg/mL de roig nil en dimetilsulfòxid, DMSO). S'agita amb un vòrtex i es centrifuga (140000 rpm, 4 °C, 5 min.) en una centrifuga Eppendorf model 5417R (Dr. Vaudaux, Schönenbuch, Suïssa). Es decanta el sobrenedant i es renta la biomassa amb 2 mL de MgCl₂ (10 mM) per tal d'eliminar les restes de roig nil. Es torna a centrifugar amb les mateixes condicions. Es decanta i es resuspen en MgCl₂. La mostra s'observa en el microscopi òptic de fluorescència Leica DM 600B TL (Leica microsystem CMS GmbH, Glattbrugg, Suïssa).

3.6.2. Determinació quantitativa del polímer

Abans de poder quantificar i caracteritzar el polímer és necessari processar la mostra. Així doncs, es liofilitza la biomassa per tal de facilitar l'extracció del polímer. El polímer extret es purifica mitjançant una precipitació en metanol fred. Un cop purificat es caracteritza amb l'ajut de diferents tècniques estructurals.

3.6.2.1 Liofilització de la biomassa.

Es centrifuga el cultiu (8000 x g; 4 °C; 15min.) per tal de separar la biomassa del sobrenedant. A continuació es fan successius rentats de la biomassa amb H₂O o H₂O/hexà (9:1 v/v) en cas que sigui necessari. Un cop es té la biomassa neta, es dissolt en un volum mínim d'aigua desionitzada i es congela a -20 °C. També es pot congelar directament la biomassa sense dissoldre.

Les mostres congelades es liofilitzen en un liofilitzador Cryodos-50 (Telstar, Terrassa, Espanya) a -50 °C i 10⁻² mbar de pressió.

3.6.2.2 Extracció del polímer

L'extracció del polímer de les mostres liofilitzades es fa amb cloroform i amb temperatura segons el mètode descrit per Valentin *et al.*, 2000 (Valentin *et al.*, 2000). Es reparteix la biomassa liofilitzada en tubs de rosca de pyrex i es disposen en el bloc tèrmic (Boeckel Scientific, Feasterville, PA, USA) a 100 °C durant 3 hores. Un cop passat el temps d'extracció, es deixa refredar i es filtre per tal d'eliminar les restes cel·lulars. El filtrat es concentra a sequedat al rotavapor (Rotavapor-R, Büchi, Flawill, Suïssa) a 40 °C i 600 mm Hg .

3.6.2.3 Quantificació del polímer

En els experiments en matrassos, la quantificació del polímer es fa gravimètricament. Es congela la biomassa neta obtinguda de 10 mL de cultiu i s'extreu el polímer de les cèl·lules liofilitzades seguint el procediment descrit a l'apartat (3.6.2.2). Així doncs, es pesa el polímer extret (mg) i dividit pel volum de l'alíquota (mL) ens donarà la concentració de polímer al cultiu (g/L).

En el cas dels cultius en bioreactor, la quantificació del polímer s'ha fet per cromatografia de gasos. La quantificació es fa conjuntament amb la hidròlisi del PHA, de manera que no només tenim una quantificació absoluta de producció de PHA sinó que a més a més tenim la quantificació de la composició monomèrica del polímer.

❖ Quantificació del PHA per cromatografia de gasos

La quantificació del PHA per a les mostres obtingudes dels cultius en bioreactor, es farà per cromatografia de gasos. El polímer extret ha de ser hidrolitzat abans de poder ésser analitzat per cromatografia. En aquest cas s'utilitza com a mètode d'hidròlisi, la

propanòlisi (veure apartat 3.7.2.3), obtenint així els derivats èster propílics dels 3-OH-monòmers.

Per a les anàlisis s'utilitzà un cromatògraf HR GC MEGA 2 Series (Fision Instruments, Rodano, Itàlia) amb columna SPB-35 (Supelco, Büchs, Suïssa) de 30m x 0,32mm x 0,25mm.

El gradient de temperatures utilitzat és: [80 °C (1 min)-10 °C/min-240 °C (1min)], la temperatura del detector de FID és de 285 °C i la de l'injector és de 250 °C. S'utilitza He (3 mL/min) com a gas portador. Es punxa 1µL en split:splitless (1:10). Els cromatogrames són tractats amb el software Chrom-Card.

Els derivats 3-OH-propilèsters són identificats emprant patrons comercials. La quantificació es realitza mitjançant una recta de calibratge feta amb una barreja del patró intern i cadascun dels estàndards comercials després de la propanòlisi. Per als monòmers que no són comercials s'interpolen els factors de resposta (Hartmann, 2005).

3.7. Caracterització del PHA

El polímer extret es purifica mitjançant una precipitació en metanol fred. Un cop purificat es caracteritza amb l'ajut de diferents tècniques estructurals.

Per a la caracterització estructural dels polímers s'empraran les següents tècniques estructurals: la Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) i l'Espectroscòpia d'infraroig (FTIR) ens donaran informació de l'estructura polimèrica. Per a les anàlisis per Cromatografia de gasos acoblada a Espectrometria de Masses (CG-EM) és necessària la hidròlisi i la derivatització del polímer. Aquesta tècnica ens permetrà determinar la composició monomèrica dels diferents PHAs.

3.7.1 Purificació del polímer

Els polímers són purificats seguint el protocol descrit per Huijberts *et al.*, (1992). Els PHAs són purificats per precipitació en MeOH fred (-20 °C). S'addiciona la solució de polímer/CHCl₃ (el polímer es resuspen en la mínima quantitat de cloroform) gota a gota sobre el metanol fred (la relació CHCl₃/MeOH és $\geq 1/10$ (v/v)) i en agitació. El polímer purificat queda precipitat al fons del baló. Es decanta el metanol i es renta el polímer precipitat amb metanol fred i net (Huijberts *et al.*, 1992). Finalment el polímer purificat és assecat en una estufa amb buit a 30°C i 30 mbar de pressió durant 24 h o bé sota corrent de N₂ (Carbuos Metàlics, Barcelona, Espanya).

Un cop purificat el polímer s'ha de guardar sota atmosfera inert (N_2) al congelador ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

3.7.2 Hidròlisi del polímer

Per tal de determinar la composició monomèrica del polímer obtingut és necessari el trencament dels enllaços èster mitjançant hidròlisi àcida. S'ha treballat amb tres mètodes diferents: Metanòlisi ($H_2SO_4/MeOH$ i $BF_3/MeOH$), amb el qual s'obtenen els èsters metàlics dels àcids 3-OH-alcanoics i amb la reacció de propanòlisi ($HCl/PrOH$), en canvi, s'obtenen derivats èsters propílics.

3.7.2.1 Metanòlisi amb $H_2SO_4/MeOH$

Es dissolen 5-6,5 mg PHA purificat en 2,7 mL de $CHCl_3$ en un tub de pyrex amb tap de rosca. A continuació s'hi addicionen 2,3 mL de MeOH i 0,4 mL H_2SO_4 . Es deixa al bloc tèrmic a $100\text{ }^\circ\text{C}$, 3 hores. Passat el temps de reacció, es deixa refredar i s'hi addiciona 1,35mL H_2O .

Es traspasa el contingut del tub en un embut de decantació (Anorsa, Barcelona, Espanya) i es fa una extracció líquid-líquid amb cloroform. Es renta dues vegades la fase aquosa amb cloroform i es recull la fase orgànica sobre Na_2SO_4 anhidre. La fase clorofòrmica conté els derivats 3-hidroximetilèsters (Brandl *et al.*, 1988).

3.7.2.2 Metànolisi amb $BF_3/MeOH$

Es dissolen 10 mg de polímer purificat (o bé 20-40 mg biomassa liofilitzada, el pes de biomassa liofilitzada que s'utilitza per a les anàlisis depèn del percentatge d'acumulació de PHA) en 1 mL del reactiu de $BF_3/MeOH$ (10 % MeOH, Fluka, Suïssa) i 1 mL de la solució de l'estàndard intern. S'utilitza com a estàndard intern l'àcid 2-etil-2-hidroxi-butíric (Sigma, USA). La solució del patró intern es prepara en diclorometà i a una concentració de 10 mg/mL. S'agita la mostra fins a tenir el polímer completament solubilitzat.

Es treballa amb tubs de pyrex de tap de rosca. Un cop afegits tots els reactius es posa la mostra a l'estufa a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durant 20 h. Passat el temps de reacció es deixa refredar i se li addiciona 2 mL de diclorometà (CH_2Cl_2) i 2 mL d'una solució saturada de NaCl. S'agita vigorosament i es separen les dues fases per centrifugació suau. Es decanta la fase aquosa i la fase orgànica es filtra sobre una barreja de Na_2SO_4 anhidre + Na_2CO_3 , (Ruth *et al.*, 2006). La fase orgànica conté els derivats èsters metàlics dels monòmers.

3.7.2.3 Propanòlisi amb HCl/PrOH

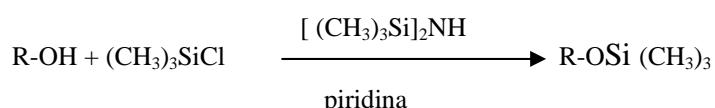
Es posen 10 mg del polímer purificat (20-40 mg de biomassa liofilitzada) en tub pyrex de tap de rosca i s'hi addiciona 1 mL d'una solució n-propanol/HCl (80:20 v/v) i 1 mL de la solució de l'estàndard intern (10 mg/mL de l'àcid 2-etil-2-hidroxi butíric preparada en diclorometà). S'agita la dissolució fins a dissoldre completament el polímer. Es deixa a l'estufa a 80 °C durant 16 hores. Passat el temps de reacció es deixa refredar i s'addiciona 1,35 mL d'aigua desionitzada. Es torna a agitar amb l'ajuda del vòrtex i es deixa reposar perquè es separin les fases. Finalment es retira la fase aquosa i la fase orgànica es recull sobre una barreja de Na₂SO₄ anhidre + Na₂CO₃, (Furrer *et al.*, 2007). La fase orgànica conté els derivats èster propílics dels 3-OH-monòmers.

3.7.3 Derivatització del polímer: reacció de sililació

Per a la caracterització monomèrica del polímer és necessària la derivatització del grup hidroxil. La conversió d'aquest grup a trimetilsilanol dona unes fragmentacions característiques a espectrometria de masses (per impacte electrònic). D'aquesta manera, es pot localitzar i confirmar la posició del grup -OH dins la cadena alquíl·lica.

A partir del polímer hidrolitzat en forma derivat èster metàlic dels 3-hidroxiàcids s'obtidran els trimetilsilil derivats (derivats TMS).

Aquesta reacció s'ha de dur a terme en condicions totalment anhidres. La reacció que té lloc és la següent:



La reacció s'ha de realitzar en vitrines perquè es desprenen vapors. Es dissolen 5 mg del polímer hidrolitzat en 1 mL de piridina (reactiu en excés) (Aldrich, Steinhem, Alemanya) i s'addicionen 0,2 mL d'hexametildisilazà (Sigma, St. Louis, USA) i 0,1 mL de trimetilclorosilà (Aldrich, Steinhem, Alemanya). Es deixa la reacció durant dues hores en agitació constant i homogènia. Passades les dues hores, s'atura la reacció addicionant 5 mL d'aigua i 5 mL d'hexà i es fa una extracció líquid-líquid en embut de decantació. Es renta la fase aquosa tres vegades amb hexà i finalment es recull la fase orgànica sobre Na₂SO₄ anhidre. S'evapora el dissolvent i es fa passar una corrent de N₂ sobre la mostra per tal de mantenir-la lliure d'humitat. És molt important que no hi hagi aigua a la mostra perquè el grup trimetilsilil es perd fàcilment.

3.7.4 Tècniques estructurals

3.7.4.1 Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier (FTIR)

L'espectroscòpia d'infraroig s'ha utilitzat com a tècnica complementària per a identificar l'estructura dels PHAs. En alguns dels experiments també s'ha utilitzat com a eina per a seguir una reacció química i el corresponent canvi estructural (p.e. reacció d'entrecruament).

Els espectres, majoritàriament s'han realitzat amb un Espectròmetre d'infraroig per transformada de Fourier, Bomem MB-120 amb divisor de feix de bromur potàssic (KBr) amb font Glowbar i detector DTGS. L'equip disposa d'un condensador de feix i un microscopi SPECTRA-TECH amb detector propi MCT.

Els espectres han estat adquirits amb un rang espectral de 350-4000 cm^{-1} i s'han fet 30 acumulacions per espectre, en el cas dels experiments on s'ha hagut d'utilitzar el microscopi, el rang espectral és de 720-4000 cm^{-1} i s'han fet 100 acumulacions per espectre.

Per a les mostres sòlides s'ha emprat una cel·la de diamant (com a suport) i han estat mesurades amb el condensador de feix i/o amb el microscopi.

Per a les mostres solubles en cloroform s'ha utilitzat com a suport de la mostra una "pastilla de KBr" que ha estat impregnada amb la solució clorofòrmica del polímer.

Els espectres han estat adquirits i processats en el software GRAM32 (Galactic Industries).

Les mostres procedents dels experiments en fermentador han estat analitzades amb un espectròmetre BIO-RAD, FTS-175. Els espectres s'han realitzat en mode de Reflexió Total Atenuada de reflexió simple (ATR) amb l'accessori del "Golden Gate" amb cristall de diamant. El divisor de feix és de KBR estàndard (6000-400 cm^{-1}) i la font és Permaglow (TM). Les dades han estat adquirides amb el software Digilab resolutions Pro 4.0.

Amb aquesta tècnica s'ha obtingut informació estructural de forma ràpida i qualitativa dels tipus de grups funcionals que tenim a la nostra mostra. Principalment, s'ha determinat la presència d'enllaços èster (entre 1170 i 1280 cm^{-1}), de dobles enllaços (3076 i 1640 cm^{-1}), de grups carbonils (1740 cm^{-1}) i de grups hidroxil (3450 cm^{-1}).

3.7.4.2. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

La Ressonància Magnètica Nuclear dóna informació estructural dels polímers. Es dissolen entre 10 mg (^1H -RMN) i 50 mg (^{13}C -RMN) del polímer purificat en 0,7 mL de cloroform deuterat (CDCl_3) i emprant tetrametilsilà (TMS) com a substància de referència. En el cas de les mostres que necessiten de la sonda d'HRMAS es treballa amb 5 mg de mostra/50 μL CDCl_3 , en un rotor de 50 μL .

Per a dur a terme aquestes anàlisis s'han emprat diferents equips del Servei de Ressonància dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona i del Swiss Federal Laboratories for Material Testing and Research, (EMPA, Dübendorf, Suïssa):

- Gemini 300 (300MHz), (Facultat de Farmàcia, SCT-UB)
- Bruker 400 (400MHz), (Facultat de Farmàcia, SCT-UB)
- Bruker ASX-400 (400MHz), (EMPA, Dübendorf, Suïssa)
- Bruker DMX-500 amb sonda de detecció inversa HRMAS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ equipada amb gradient d'angle màgic, (PCB, SCT-UB). (www.rmn.ub.es).

La sonda d'HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) ens permet realitzar l'anàlisi de mostres heterogènies (amb les quals no es pot emprar ni la sonda per a líquids ni la sonda de sòlids). El principi bàsic de la sonda d'HRMAS consisteix en fer girar la mostra a velocitats de gir compreses entre 2 i 7 kHz en l'angle màgic ($3\cos^2\theta-1=0$, ($\theta=54.74^\circ$)). En aquestes condicions de gir s'elimina l'eixamplament de la línia provocat per les diferències de susceptibilitat magnètica que es troben en les mostres heterogènies com les nostres. Aquest tipus de sondes permeten obtenir espectres amb bona resolució de mostres amb mobilitat limitada.

Els espectres s'han processat emprant el software XWin32 i el MestreC.

S'han realitzat experiments mono i bidimensionals així com també experiments d'homo i heterocorrelació: ^1H , ^{13}C (també amb inverse gated decoupling mode), DEPT, COSY, HETCOR, HsQC, HMBC.

3.7.4.3 Cromatografia de gasos acoblada a Espectrometria de Masses (CG-EM)

Aquesta tècnica (Cromatografia de gasos acoblada a Espectrometria de Masses,(CG-EM) ens permet determinar la composició monomèrica dels diferents polímers.

Es dissolen els èsters metàlics dels β -hidroxiàcids sililats, obtinguts de la hidròlisi dels 5-6,5 mg de polímer, en 350 μ L de cloroform.

Les anàlisis per CG-EM es realitzen en un cromatògraf TRACE GC (ThermoFinnigan, USA) equipat amb injector automàtic AS3000 autosampler i columna HP-5 (Crosslinked 5% Phe silicone, Hewlett-Packard) de (25 m x 0.20 mm id, 0.50 μ m). S'injecta 1 μ L de mostra amb sistema d'injecció de Split (1:30) i temperatura de l'injector de 250 $^{\circ}$ C. El programa de temperatures utilitzat és: [35 $^{\circ}$ C (2 min)-8 $^{\circ}$ C/min-310 $^{\circ}$ C (10min)] i la temperatura del detector és de 300 $^{\circ}$ C. S'utilitza un espectròmetre de masses com a detector i heli (He) com a gas portador amb un flux d'1 mL/min. El cromatògraf de gasos està acoblat a un Espectròmetre de masses TRACE-DSQ (ThermoFinnigan, Waltham, MA, USA). Transfer Line: 280 $^{\circ}$ C. La temperatura de la font d'ionització és de 250 $^{\circ}$ C per impacte electrònic (EI) i de 200 $^{\circ}$ C per ionització química (CI). En les anàlisis per ionització química s'utilitza metà (CH_4), com a gas reactiu. En el cas de la ionització per impacte electrònic (EI) la mostra es bombardeja amb una energia de 70 eV. El rang de masses és de 60-700 uma.

Els resultats obtinguts de les anàlisis per CG/EM (EI) (impacte electrònic) ens donaran informació estructural dels monòmers. Els pesos moleculars dels monòmers es determinaran per CG-EM (IQ) (ionització química amb metà). Mitjançant la integració del TIC s'obté la quantificació relativa de la composició monomèrica del polímer.

Les fragmentacions característiques, i per tant les esperades per aquest tipus d'estructura en espectrometria de masses per impacte electrònic són les següents (Lee and Choi, 1995):

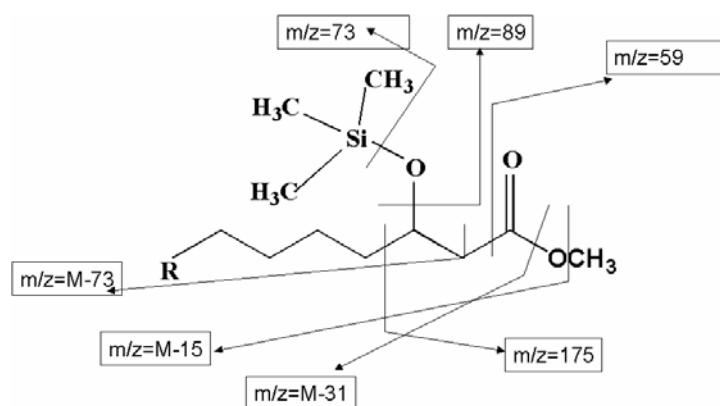


Figura 3.6. Esquema de les fragmentacions característiques per impacte electrònic (EI) dels derivats TMS dels èsters metàlics dels 3-OH-monòmers. On M és el pes molecular dels monòmers.

3.7.5. Microscòpia

Mitjançant diferents tècniques de microscòpia (TEM i AFM) s'estudiaran tant els grànuls de PHA (inclusions lipídiques) com el propi material (polímer purificat i tractat). Tots els assajos s'han realitzat als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

3.7.5.1. Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM)

La microscòpia electrònica de transmissió ens permetrà fer un estudi de la formació dels grànuls de PHA. Abans però de l'observació al microscopi, les cèl·lules han de ser tractades: fixació de la mostra i osmificació.

❖ Procés de fixació de la mostra

S'agafa 1 mL de cultiu i s'hi addiciona 1 mL de glutaraldehyd (5 %) (es prepara doblement concentrat i en solució tampó fosfat (PB) (0,2 M)). Es deixa que la mostra i el fixador estiguin en contacte 10 minuts aproximadament. Seguidament es centrifuga a 1000-2000 rpm, 4 °C i 5 minuts (el temps mínim necessari perquè baixin les cèl·lules i no es produeixi lisis cel·lular).

Es decanta el sobrenedant i es resuspen la biomassa amb la solució del fixador al 2,5 % (glutaraldehyd (5 %) + tampó fosfat (0,1 M)). Es repeteix l'operació fins a tres vegades. És convenient que durant l'últim procés de fixació es deixi la biomassa en contacte amb el fixador (2,5 %) almenys dues hores. Un cop fets els rentats amb el fixador es procedeix a fer els rentats amb tampó fosfat (0,1 M). Es deixa la solució amortidora de fosfats en contacte amb les cèl·lules 10 minuts. Es torna a centrifugar i es decanta. Es repeteix el procediment quatre vegades. Un cop finalitzats els rentats es deixa la mostra en tampó fosfat a 4 °C fins que es realitzi l'osmificació.

El procés de fixació no és necessari en el cas de treballar amb polímer pur i/o amb el polímer tractat fotoquímicament.

❖ Procés d'osmificació

Es prepara una solució de (1 % OsO_4 +0,8 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) a partir de la solució concentrada de (4 % OsO_4 +3,2 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Per això, s'agafa 0,5 mL de la solució concentrada de (4 % OsO_4 +3,2 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) + 1 mL de la solució amortidora de PB (0,2 M)+ 0,5 mL aigua mQ.

S'addiciona a la mostra prèviament fixada, la solució de (1% OsO_4 + 0,8% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) fins a cobrir la biomassa, es deixa en gel 1,30-2 h i es tapa amb paper d'alumini. Passades les dues hores es centrifuga i es decanta el sobrenedant. La biomassa es renta quatre vegades amb solució amortidora PB (0,1 M).

Les cèl·lules tenyides són incloses en agar pur (Difco, MI, EEUU) al 2,5% mitjançant el mètode de la bombolla. A continuació es deshidraten emprant un gradient creixent d'acetona pura anhidra (de 50 % al 100 %). Finalment les mostres són incloses en resina Spurr i es deixa polímeritzà 48 h a 60 °C (Spurr, 1969).

Els talls ultrafins (30-90 nm) són realitzats amb una fulla de diamant (Diatome, Biel, Suïssa) en un ultramicròtom Ultracut FC4E (Reichert-Jung (LEICA), Wetzlar, Alemanya). Els talls es col·loquen en reixetes de coure i s'hi aplica acetat d'uranil al 2% durant 30 minuts. Algunes de les mostres també es tenyeixen amb citrat de plom (Reynolds, 1963).

Les mostres són observades a 80kV en un microscopi electrònic de transmissió Jeol JEM 1010 amb cambra digitalitzadora d'alta resolució i mecanisme d'inclinació de mostres (+60°/-60°) per a reconstruccions tridimensionals. Les imatges foren adquirides amb una càmera Megaview III i un programa de digitalització d'imatges (SoftImaging).

3.7.5.2. Microscòpia de Força Atòmica (AFM)

L'equip que s'ha utilitza en els estudis tant del polímer com per als bacteris és un Microscopi AFM MultiMode amb un controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA, USA). Totes les imatges han estat enregistrades en mode "tapping" emprant puntes rectangulars de Silici (radi nominal de 15 nm) de 42 N/m (300 KHz de freqüència de ressonància) o 0,5 N/m (50KHz de freqüència de ressonància) de duresa i una velocitat d'escaneig de 1Hz. S'ha utilitzat una punta dura o més tova depenen de la mostra. Les lectures s'han realitzat a l'aire i a temperatura ambient.

❖ Preparació de les mostres de PHA

Es preparen dues dissolucions del polímer en cloroform de diferent concentració: 0,01 i 0,001 mg/mL. Es dipositen 10-20 μL de la solució de PHA sobre el suport de vidre (Microscope cover glasses, ref. 0111520, de 12mm de diàmetre i gruix No.1 (0.13-0,16mm), MARIENFIELD superior, Laboratory glassware, Alemanya). Es deixa assecar a l'estufa a 30°C durant 24 hores.

Abans d'observar les mostres al microscopi de força atòmica, es sotmeten a tractament fotoquímic:

- Tractament fotoquímic: S'exposa la mostra a radiació UV ($\lambda=300$ nm) i s'estudien diferents temps de reacció.

❖ Preparació de les mostres biològiques

Es centrifuguen 2 mL de cultiu a 1000-2000 rpm i es separa la biomassa. La biomassa es renta amb NaCl (0.9 %) dues vegades i finalment es torna a centrifugar. Per a l'observació de la mostra en el microscopi d'AFM, la biomassa es resuspen en un volum petit d'aigua bidestil·lada (MilliQ, Waters, USA). Es dipositen 10 μ L de la suspensió bacteriana sobre un suport de mica i es deixa assecar. Un cop la mostra està adsorbida al suport es renta amb aigua bidestil·lada i s'asseca.

3.7.6 Propietats Tèrmiques

L'anàlisi tèrmica comprèn un conjunt de tècniques que mesuren el canvi d'una propietat física d'una substància en funció de la temperatura, mentre la mostra es sotmet a un programa predefinit d'escalfament o refredament, o el canvi d'una propietat física d'una substància en funció del temps a una temperatura determinada.

Es fa un estudi de les característiques tèrmiques dels polímers obtinguts mitjançant l'Anàlisi Calorimètrica Diferencial (DSC) i per Termogravimetria (TG).

3.7.6.1 Anàlisi Calorimètrica Diferencial (DSC)

L'anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) mesura la potència calorífica absorbida o alliberada en funció de la temperatura o del temps. La mostra i la referència és a la mateixa temperatura, fins i tot durant els fenòmens tèrmics. Es mesura l'energia necessària que s'ha de subministrar per a mantenir una diferència de temperatura nul·la entre la mostra i la referència.

Aquestes anàlisis ens permet determinar algunes de les propietats termodinàmiques del material: la temperatura de transició vítria (T_g (°C)), temperatura de fusió (T_f (°C)), la variació de la capacitat calorífica (Δc_p) o l'entalpia de descomposició (ΔH) entre d'altres.

Les anàlisis es duen a terme en un calorímetre DSC-30 de Mettler Toledo (Greinfesee, Suïssa). Es treballa amb un gradient de temperatura de 10 °C/min i un cabal d'aire 80 mL/min. En alguns experiments es treballa amb atmosfera inert (80 mL/min de N₂). El software d'adquisició de dades i gràfiques és el Mettler Toledo STAR^e System. Es necessiten 5-10 mg de mostra. Es treballa amb gresol d'alumini.

3.7.6.2 Termogravimetria (TG)

La termogravimetria (TG) mesura la pèrdua de pes del polímer en funció de la temperatura o del temps a una temperatura determinada.

Aquesta tècnica ens permet fer un estudi del comportament del polímer amb la temperatura. Es fa un estudi de la pèrdua de massa amb la temperatura.

S'utilitza una Termobalança TGA-SDTA 851e/SF/1100 de Mettler Toledo (Greinfesee, Suïssa). Es treballa amb un gradient de temperatura de 10°C/min. i un cabal d'aire de 50mL/min. També s'han realitzat anàlisis amb atmosfera inert (50 mL/min de N₂). El software d'adquisició de dades i gràfiques és el Mettler Toledo STAR^e System. Es necessiten 5-10 mg de mostra. Es treballa amb gresols d'alúmina.

3.7.7 Determinació del Pes Molecular

Els pesos moleculars dels PHAs es determinen per cromatografia de Permeació de Gel (GPC). En aquest treball s'han emprat dos equips diferents:

❖ Equip Alliance Waters 2690 (MA, USA), que consta d'una bomba Waters Model 510, amb injector de mostres Waters, amb un volum d'injecció de 50 µL, columna Water Styragel 5E, forn per columna Krnton Instruments Oven Controller 480, detector d'índex de refracció Knauer i processador Merck Hitachi D-2520 GPC integrator (Química, S.A. Montcada i Reixac, Barcelona). Com a dissolvent de les mostres i fase mòbil s'utilitza THF (Panreac, Espanya). La temperatura de treball és de 40 °C i el flux és de 0,5 mL/min. La temperatura del detector és de 47 °C i la pressió de 2,0 bar. La concentració de la mostra és de 0,4 mg/mL i el volum d'injecció és de 50 µL.

Es preparen patrons de poliestirè (TSK standards) (0,2 mg/mL, d'acord amb les especificacions de la columna), amb un rang de pesos moleculars de Mw (18100-355000 Da).

❖ Viscotek TDA 302 (Viscotek, Waghausele-Kirrlach, Alemanya) amb detector d'índex de refracció (RI) i light-scattering. El volum d'injecció és de 100 µL i es treballa amb un sistema de tres columnes PSS ((3x) PSS 8 x 300 mm, 5 mm de mida de partícula; SDV 10e3 A, SDV 10e5 A, SDV 10e6 A). La temperatura de treball és de 35 °C i el flux és de 1 mL/min. Per a la recta de calibratge s'utilitza un kit comercial de 12 estàndards de poliestirè (PSS Polymer-standards-Service GmbH, ReadyCal-Kit, Mainz, Alemanya) amb un rang de pesos moleculars de ($M_w=480-2500000$ Da). La concentració de la mostra és de 3,5- 4,0 mg /mL.

3.7.8. Tècniques fotoquímiques

Els PHAs de cadena mitjana que contenen grups insaturats a les cadenes laterals tendeixen a autooxidar-se amb el temps donant lloc a una reacció d'entrecruament de les cadenes (reacció de crosslinking). Aquesta reacció té lloc a temperatura ambient. Aquesta transformació del material li confereix una major uniformitat a la matriu del polímer, donant lloc a la millora de les propietats fisicoquímiques del polímer. De fet la reacció d'entrecruament és utilitzada com un mètode per a controlar les propietats dels polímers. La irradiació fotoquímica és una alternativa a la síntesis química. Malgrat que els mètodes químics són prou eficients introdueixen productes no desitjats en el sistema (reaccions secundàries). Per tal d'estudiar aquest procés, així com els possibles processos oxidatius, es preparen diferents films del polímer i se'ls sotmet a diferents tractaments: (a) procés natural i (b) tractament amb radiació ultravioleta UV ($\lambda=300\text{nm}$).

3.7.8.1. Preparació del films

La preparació dels films serà diferent en funció de la tècnica utilitzada per al seu anàlisi .

Els films per AFM els preparem sobre un suport de vidre rodó, per això es preparen solucions diluïdes del polímer en cloroform (0,01 g/L i 0,001 g/L). Es disposen 10 µL de la solució de PHA sobre el suport i es deixa assecar a l'estufa a 30°C durant 24 hores.

Per a la resta de tècniques es prepara una solució en cloroform del polímer. Es dissolen 1.5 g de polímer en 15 mL de cloroform i es disposa sobre el suport de vidre fins a tenir un film de 0,1-0,15 mm de gruix. Es deixa evaporar el dissolvent a la cambra de 30 °C durant 24 hores.

3.7.8.2. Irradiació amb llum ultravioleta (UV)

Per a la irradiació dels films de PHA s'ha utilitzat un reactor de fotoquímica Rayonet Photochemical Reactor (The Southern New England Ultraviolet Company, Conneticut, USA) amb 16 làmpades de potència nominal de 4.8 W i treballant a una diferència de potencial de 110-120 volts. La longitud d'ona de treball és de 300 nm. Els films preparats sobre el suport de vidre es deixen dins el reactor fotoquímic a diferents temps de reacció (3, 6, 15 i 24 h).



Figura 3.7. Film de PHA de 0,1-0,15 mm de gruix dipositat sobre un suport de vidre.