



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

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Fonts de carboni complexes

Al llarg de la última dècada s'han emprat múltiples espècies de *Pseudomonas* per a la producció de PHA de cadena mitja a partir d'una gran varietat de fonts de carboni d'origen agrícola (Eggink *et al.*, 1992), (Huisman *et al.*, 1989). Els àcids grassos procedents d'olis vegetals, tals com l'àcid làuric, l'àcid mirístic, l'àcid palmític, l'àcid esteàric o l'àcid oleic han estat els més emprats no tan sols per la seva abundància sinó també pel seu relatiu baix cost (De Waard *et al.*, 1993). La majoria d'aquests àcids grassos es troben en forma de mescles en residus industrials derivats de la producció de d'olis vegetals.

Tant l'oleïna (àcid oleic tècnic) com el weichol són productes industrials rics en àcid oleic (60-70 % (p/p)) que s'han emprat com a substrat en diferents estudis de biotransformacions de residus oleaginosos en cultius de *P. aeruginosa* 42A2 (Culleré, 2002) així com també en l'optimització de cultius d'alta densitat (Rodríguez, 2006). Aquests substrats també han estat utilitzats en la producció de polihidroxialcanoats. D'acord amb el resultat obtinguts per Fernández *et al.* (Fernández, 2000), quan es fa créixer la *P. aeruginosa* 42A2 en medi mineral mínim (MM1) amb 20 g/L d'oleïna, agitació (120 rpm) i 30°C, la màxima producció de biomassa i PHA es produeix a les 72 h de cultiu obtenint 4,4 i 2,3 g/L de biomassa i de PHA, respectivament. Aquests valors representen una acumulació de PHA del 53 % (p/p). De tots els substrats assajats i descrits a l'apartat 3.2.1.2 de material i mètodes, per aquest treball s'ha descartat l'oli de fusta (tung oil) ja que presentava rendiments molt baixos de producció de PHA.

4.1.1 Cultius i producció de PHA amb substrats complexos

4.1.1.1 *Extracte pasta monodi (oli monodi)*

En treballs realitzat anteriorment s'han descrit fins a tres productes extracel·lulars resultants de la biotransformació de l'àcid oleic quan es emprat com a substrat en cultius de *P. aeruginosa* 42A2. Els productes foren identificats com a: àcid (E)-10-hidroperoxi-8-octadecenoic, àcid (E)-10-hidroxí-8-octadecenoic (MHOD) i àcid (E)-7,10-dihidroxí-8-octadecenoic (DHOD) (Guerrero *et al.*, 1997).

Tal i com s'explica a l'apartat 3.2.1.2, a l'acidificar el sobrenedant d'un cultiu on s'ha emprat l'àcid oleic com a font de carboni, s'obtenen aquests productes en forma d'un precipitat blanc després de 24 h a 4 °C. A aquest precipitat se l'ha denominat "pasta". Després de l'extracció de la pasta amb cloroform s'obté un oli que conté principalment àcid oleic i dos dels productes de biotransformació abans esmentats, MHOD i DHOD, ja que el tercer compost que es forma, l'hidroperoxi (HOOD), s'hidrolitza en el medi de cultiu com a conseqüència de la precipitació àcida i es transforma ràpidament en el derivat monohidroxilat (Guerrero *et al.*, 1997).

La Figura 4.1 mostra la composició de l'oli obtingut a partir de l'extracció de la pasta amb cloroform. Tal i com es pot veure, aquest oli està constituït principalment per restes d'àcid oleic, pel derivat monohidroxilat (MHOD) i pel derivat dihidroxilat (DHOD).

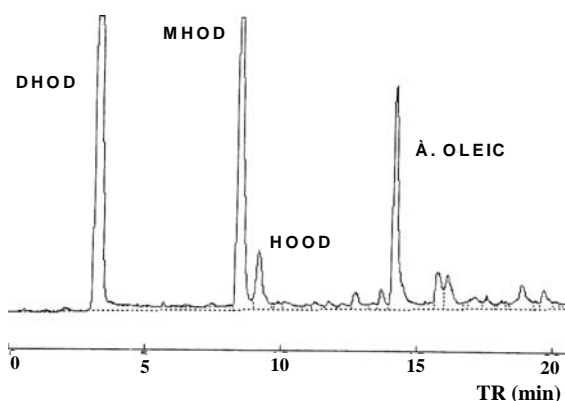


Figura 4.1. Cromatograma (HPLC) corresponent a l'oli obtingut de l'extracció amb cloroform de la pasta. En el cromatograma s'observen els tres productes de la biotransformació (DHOD, MHOD i HOOD) així com també restes de la font de carboni inicial, l'àcid oleic.

Degut a les característiques estructurals d'aquests productes, que contenen grups hidroxil i una insaturació al mig de la cadena, es va creure interessant emprar-los com a font de carboni per a la producció de PHAs funcionalitzats. Amb aquest objectiu es van provar diferents estratègies de cultiu: cultius discontinus, cultius alimentats i cultius en condicions no proliferants.

i. Cultius discontinus

Prenen com a referència les dades obtingudes en els cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid oleic com a substrat, s'han assajat diferents concentracions de "l'extracte monodi": 10 g/L i 20 g/L.

Així doncs, es fa créixer el microorganisme en medi mínim mineral, MM1, en agitació constant a 120 rpm i 30 °C. Aquest medi de cultiu conté una concentració inicial de nitrogen molt baixa, [N]=0,58 g/L. Per tant, es d'esperar que el creixement estigui limitat per la font de nitrogen, però d'altra banda l'acumulació de PHA es veurà afavorida.

En la Figura 4.2 es detallen les cinètiques obtingudes per a les dues concentracions assajades:

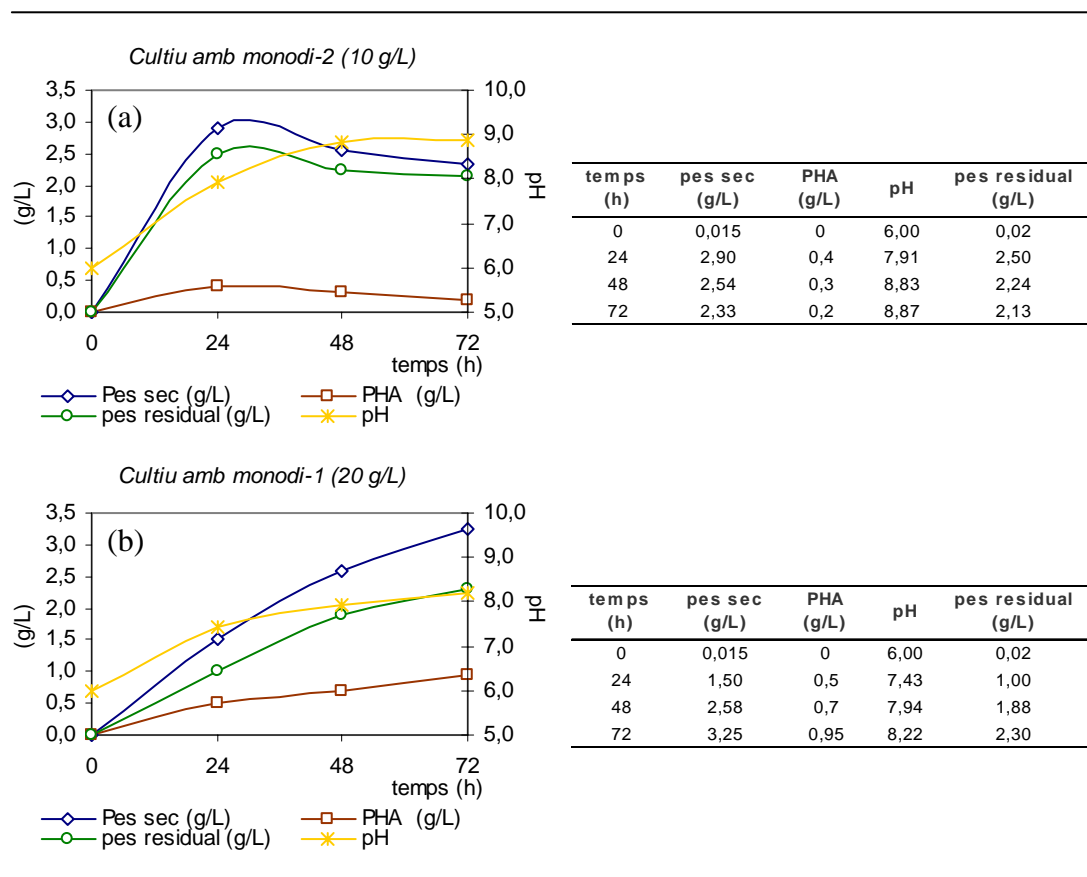


Figura 4.2. Cinètiques de creixement i producció de PHA dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant l'extracte monodi com a font de carboni: (a) 10 g/L i (b) 20 g/L.

En els cultius amb 10 g/L de font de carboni s'observa un creixement molt ràpid i pràcticament a les 24 h de cultiu, la corba de creixement està entrant en fase estacionària,

obtenint-se els valors més alts tant per la biomassa total com per a la producció de PHA: 2,90 g/L i 0,4 g/L, respectivament. A partir de les 24 h de cultiu, el pes sec decreix fins a 2,33 g/L possiblement com a conseqüència de la biodegradació del polímer acumulat. Tal i com s'ha comentat anteriorment a les 24 h de cultiu, la producció de PHA és de 0,4 g/L, que representa un 14 % (p/p), mentre que a les 72 h de cultiu la producció de PHA és de 0,2 g/L (8 % (p/p)). Al llarg de les primeres 24 h de cultiu, el creixement ha estat molt ràpid i s'ha esgotat tota la font de nitrogen del medi, subministrada en forma de nitrats, i per tant el microorganisme no pot continuar creixent. Conjuntament amb la limitació de nitrogen, el consum del PHA acumulat indica una possible limitació de font de carboni, de tal manera que el bacteri aprofita el poder reductor del PHA i el degrada per tal d'obtenir l'energia de manteniment necessària.

En el cultiu amb 20 g/L de substrat s'observa un creixement més lent. A les 24 h de cultiu el pes sec és de 1,5 g/L i la producció de PHA és de 0,5 g/L. La producció de PHA representa un 33 % (p/p) d'acumulació. Si comparem aquests valors amb els obtinguts en el cultiu de 10 g/L, s'observa que malgrat que la producció de la biomassa pels cultius de 20 g/L és la meitat que la que s'obté en el cultiu de 10 g/L, el procés d'acumulació és millor en aquest segon cas, la producció de polímer es multiplica per un factor de 2,5. El fet que s'observi un creixement més lent podria indicar algun tipus de toxicitat o inhibició relacionada amb la concentració inicial de substrat. Els màxims de biomassa i de PHA s'observen a les 72 h de cultiu, on s'obté 3,25 g/L i 0,95 g/L, respectivament, i que representa una acumulació de PHA del 29 % (p/p). D'altra banda si es considera el pes residual a les 72 h de cultiu per ambdós cultius, amb 10 i 20 g/L de substrat, s'obtenen valors molt similars independentment de la concentració inicial de substrat, 2,13 i 2,30 g/L respectivament. De la mateixa manera si es calcula el rendiment cel·lular respecte la font de nitrogen ($Y_{X/N}$, on x és la biomassa residual (g/L) i N la concentració de font de nitrogen), trobem que per el cultiu de 10g/L, el $Y_{X/N}= 3,7$ i que en el cas del cultiu amb 20 g/L el $Y_{X/N}= 3,9$. Així doncs, el fet que els rendiments cel·lulars obtinguts en ambdós casos sigui pràcticament iguals, sembla indicar que creixement està limitat per la concentració inicial de nitrogen.

En ambdues cinètiques, el pH inicial és de 6 i a mesura que el cultiu creix i es va consumint la font de carboni, el pH va augmentant fins a valors bàsics (pH=8-9). Aquest augment del pH és una característica intrínseca de la soca amb la que s'està treballant. Aquest comportament s'anirà repetint a per a tots els altres cultius independentment de la font de carboni.

Està descrit que la relació C/N té un efecte directe sobre la formació de PHA, tot i que el creixement cel·lular es veu afectat negativament. Per tant, es pot considerar que la limitació de nitrogen és un paràmetre important per a la inducció de la síntesi de polímer. D'acord amb Tian *et al.* (2000) la concentració de nitrogen pot ser emprada com un paràmetre per a controlar el creixement cel·lular i la producció de PHA en el cas de *P. mendocina* 0806 (Tian *et al.*, 2000).

ii. Cultiu alimentat (10 g/L+10 g/L)

Considerant els resultats obtinguts en cultiu discontinu es decideix canviar l'estratègia de cultiu, per tal de millorar el rendiment del procés. Per això es subministra els 20 g/L de font de carboni en dos polsos de 10 g/L cadascun. D'aquesta manera, el que s'intenta es millorar el rendiment del procés d'acumulació, ja que la relació (C/N) augmenta amb la segona addició, i a la vegada disminuir el possible efecte d'inhibició per substrat que sembla que es descriu a les primeres hores de cultius quan es treballa a concentracions de substrat altes. En la Figura 4.2 s'hi representa la cinètica del procés. Es comença el cultiu amb 10 g/L de substrat i a les 20 h de cultiu s'addiciona els altres 10 g/L de font de carboni i es segueix l'evolució del cultiu al llarg de les següents 72 hores.

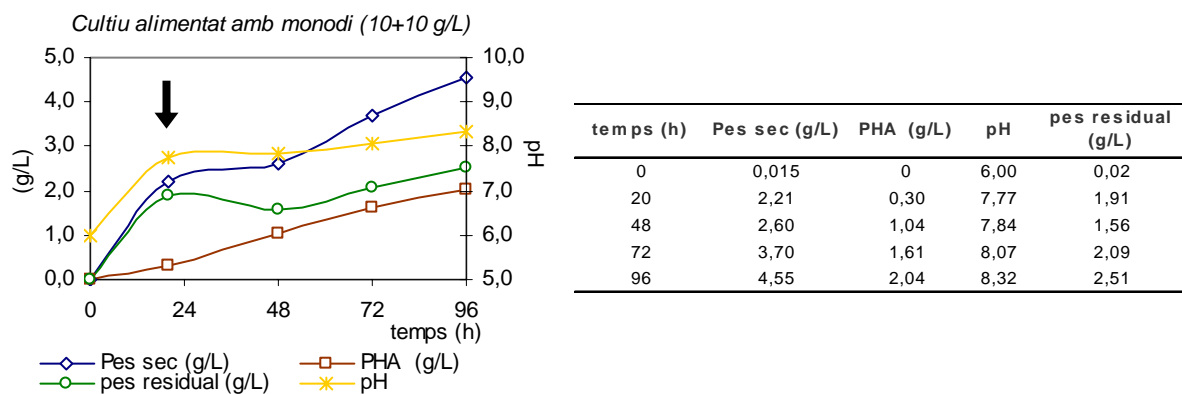


Figura 4.2. Cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant l'extracte monodi com a font de carboni. Cultiu alimentat amb dos polsos de 10 g/L a les 0 i 20 hores de cultiu.

Tal i com es pot observar a la Figura 3.2, al llarg de les primeres 20 hores de cultius s'arriben a valors de biomassa i de PHA molt semblants als obtinguts en el cultiu de 10 g/L, descrit a l'apartat 4.1.1.1. A partir de la segona addició de substrat, a les 48 h de cultiu, s'observa un augment notable del pes sec com a conseqüència de la millora en el procés d'acumulació de PHA, malgrat que els valors de pes residual són semblants als

obtinguts a les 48h en el cultiu discontinu amb 20 g/L. A les 72 h de cultiu s'ha obtingut 1 g/L de PHA per al cultiu discontinu amb 20 g/L de substrat i 1,61 g/L de PHA en el cultiu alimentat amb (10+10) g/L de substrat. Així doncs, aquest increment representa un augment del 66 % en la producció de PHA.

S'ha determinat el consum de font de nitrogen mitjançant un test de nitrats i s'ha comprovat que tant en els cultius discontinus com en el cultiu alimentat, la font de nitrogen ja està pràcticament exhaurida a les 24 h de cultiu.

A la Figura 4.3 s'ha representat el percentatge d'acumulació dels tres processos descrits fins aquest moment: cultius discontinus (10 i 20 g/L) i cultiu alimentat.

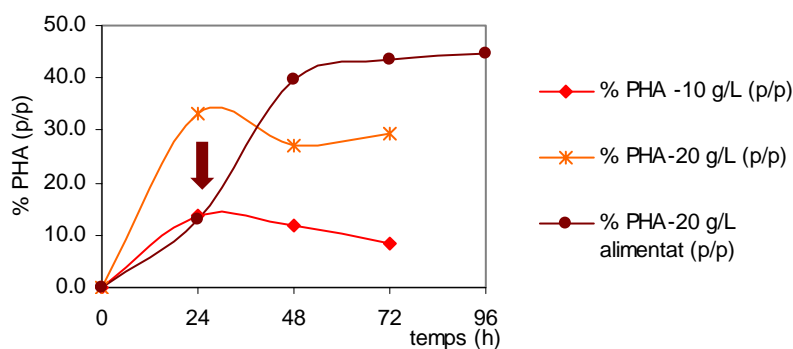


Figura 4.3. Percentatges d'acumulació de PHA per als cultius discontinus amb 10 i 20 g/L i per al cultiu alimentat amb (10+10) g/L emprant l'oli monodi com a font de carboni. La fletxa ens indica la segona addició de substrat en el cultiu alimentat.

S'observa com per el cultiu discontinu amb 10 g/L, l'acumulació de PHA és baixa i el màxim d'acumulació és del 14 % (p/p) a les 24 h de cultiu. A partir de les 24 h, el percentatge d'acumulació decreix fins al 8 % (p/p) indicant una possible despolimerització intracel·lular del polímer.

En els cultius amb 20 g/L, tant en el cultiu discontinu com en el cultiu alimentat, el percentatge màxim d'acumulació de PHA és del 33 % (p/p) i del 45 % (p/p), respectivament. En el cas del cultiu discontinu de 20 g/L, el màxim té lloc a les 24 h de cultiu i es manté al voltant del 30 % (p/p) fins a les 72 h de cultiu. En canvi, en el cultiu alimentat s'observa una acumulació progressiva de PHA al llarg de les primeres 48h, arribant a una acumulació del 40 % (p/p). L'acumulació entre les 24 h i 48 h de cultiu, quan té lloc la segona addició de substrat, és pràcticament del 30 %, indicant així una

millor eficiència en la producció de polímer respecte les primeres i les últimes 24h. Aquest comportament és similar al que s'observa durant les primeres 24 h en el cultiu discontinu amb 20 g/L.

El procés d'acumulació de PHA en els diferents microorganismes productors de PHA pot tenir lloc tant en la fase exponencial del creixement com en la fase estacionària. En el cas de *P. aeruginosa* 42A2 i emprant l'extracte monodi com a substrat i règim d'alimentació discontinu (10 g/L i 20 g/L), el procés d'acumulació té lloc a la fase exponencial. Per tant, sembla ser que *P. aeruginosa* 42A2 creix i acumula paral·lelament. No així en el cultiu alimentat on s'observa que el PHA és acumulat tant a la fase exponencial com a la fase estacionària. Els resultats obtinguts en les diferents cinètiques, suggereixen que el procés d'acumulació de polímer depèn de les condicions culturals i sobretot de la proporció relativa entre alguns nutrients.

D'acord amb els resultats obtinguts en els apartats anteriors, amb cultius discontinus i alimentats, s'ha vist que la relació C/N és un paràmetre que influeix directament en el procés d'acumulació de PHA. S'ha comprovat que els millors resultats de producció de PHA s'han obtingut en els cultius alimentats, concretament amb la segona addició de substrat quan la font de nitrogen estava totalment exhaurida i per tant el cultiu estava en condicions no proliferants. Així doncs, considerant els resultats obtinguts en aquests experiments es va decidir treballar en condicions no proliferants (condicions NP). Al treballar en condicions no proliferants es substitueix el medi mínim mineral (MM1) per una solució amortidora de Sørensen (pH=7.21) i per tant es treballa en un medi en absència total de nitrogen.

L'objectiu de treballar en règim no proliferant es basa en que una relació (C/N) alta afavoreix el procés d'acumulació vs. el creixement cel·lular (Zinn *et al.*, 2001), (Culleré, 2002), (Hartmann, 2005).

iii. Cultiu en condicions no proliferants (NP)

Per a treballar en règim de cultiu no proliferant (NP) es preparen precultius en condicions proliferants amb 10 g/L de substrat (veure apartat 4.1.1.1). A les 24 h es recull el cultiu, es centrifuga (8000 rpm, 4 °C, 15 minuts) per tal de recuperar les cèl·lules i la biomassa es renta amb NaCl (0,9 %) durant 30 minuts i agitació suau, en condicions d'esterilitat per tal d'eliminar les restes del medi mineral així com també restes de font de nitrogen. Seguidament es torna a centrifugar per tal de recuperar la biomassa. La biomassa obtinguda de 400 mL de cultiu es resuspen en 80 mL de solució amortidora

Sörensen. D'aquesta manera els cultius es concentren entre quatre i cinc vegades respecte els cultius inicials. A partir d'aquest moment es considera l'inici dels cultius en condicions no proliferants i s'addicionen 10 g/L de la font de carboni.

La cinètica del cultiu en condicions No Proliferants es mostra a la Figura 4.4:

temps (h)	pes sec (g/L)	PHA (g/L)	pH	pes residual (g/L)	UFC/mL
0	12,71	3,20	7,20	9,51	1,78E+10
24	7,28	0,80	6,74	6,48	3,65E+10
48	6,33	0,35	6,85	5,98	1,25E+10
72	6,20	0,20	6,97	6,00	3,20E+10

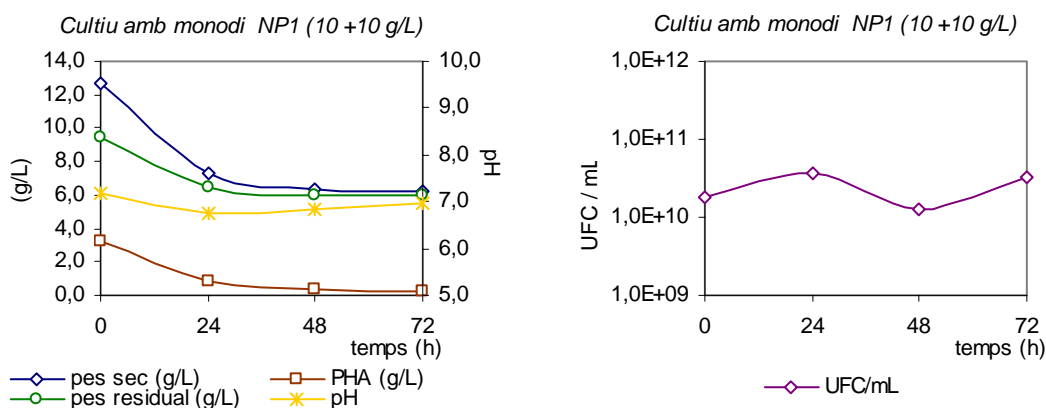


Figura 4.4. Cinètica de creixement i producció de PHA emprant com a substrat oli monodi en cultius no proliferant (NP). Per verificar que els cultius estan en condicions no proliferants es fa un recompte de viables (UFC/mL) cada 24 h.

Cal tenir en compte que s'està treballant amb un sistema polifàsic, la qual cosa fa que existeixin certes dificultats mecàniques a l'hora de processar les mostres, sobretot en els temps inicials de cultiu quan l'oli encara no està emulsionat.

En la Figura 4.4 s'observa com el recompte de viables (UFC/mL) al llarg de tot el procés en condicions no proliferants es manté constant. En canvi, en el cas del pes residual es mostra un fort decreixement durant les primeres 24 hores en condicions no proliferants i després s'estabilitza. Tant la biomassa residual (entenen per biomassa residual la diferència de pes entre la biomassa total ó pes sec (g/L) i el PHA produït (g/L) com el recompte de viables confirmen que no hi ha creixement.

Després de l'addició de la font de carboni en condicions no proliferants s'observa un descens considerable de la biomassa. Aquesta pèrdua de pes es pot explicar parcialment amb el descens del percentatge de polímer acumulat, és a dir, amb la

despolimerització intracel·lular del PHA (veure a la Figura 4.4). D'acord amb Ren *et al.* (2005) (Ren *et al.*, 2005), aquesta variació en el percentatge d'acumulació de PHA pot ser deguda a una despolimerització parcial o total del polímer acumulat. L'enzim responsable d'aquesta hidròlisi del PHA és la PHA-depolimerasa, que actua sobre el polímer acumulat hidrolitzant-l'ho i alliberant al medi de cultiu els monòmers en forma d'àcid 3-OH-alcanoic. Lee *et al.* (1999) ja demostraren que l'àcid (R)-3-OH-butíric (R3HB) pot ésser produït eficientment via despolimerització *in vivo* del polihidroxibutirat, en les condicions de cultiu adequades. En el seu estudi amb *Alcaligenes latus* demostren que treballant a pH=3-4 s'indueix l'activitat de la polihidroxibutirat depolimerasa i a la vegada es bloqueja la via per la qual la cèl·lula pot reutilitzar els monòmers 3RHB per a sintetitzar de nou el polímer (Lee, 1999).

Actualment, el mecanisme i la regulació de la degradació intracel·lular dels mcl-PHAs són bastant desconeguts. No obstant, es coneix que les polimerases són proteïnes intracel·lulars associades al grànul de PHA i que el seu pH òptim és entre pH 8-10. Ren *et al.* (2005) han realitzat estudis emprant *Pseudomonas putida* GPo1 i han demostrat que el pH inicial òptim per a la despolimerització d'un mcl-PHA és a pH 11 on s'obté una hidròlisi del polímer del 90 % en tan sols 9 h (Ren *et al.*, 2005).

D'altra banda s'ha descrit que en règims no proliferants, la mida i el pes de les cèl·lules disminueix.

De totes maneres, considerant els resultats obtinguts en els tres règims de cultius, queda palès que, almenys per aquesta font de carboni, el cultiu en medi no proliferant no és la millor estratègia de cultiu per a la producció de PHA ja que l'oli que s'ha addicionat en condicions no proliferants no és assimilat pel microorganisme. En canvi, en estudis previs del grup realitzats per Culleré *et al.* (2002) treballant en bioreactor retroalimentat i condicions NP s'havien aconseguit resultats molt bons d'acumulació de PHA quan es treballava amb àcid oleic com a substrat (Culleré *et al.*, 2001).

4.1.1.2 Àcid linoleic

El següent substrat que es va utilitzar va ser l'àcid linoleic comercial (60 % (p/p)). L'àcid linoleic és un àcid gras poliinsaturat (C18:2 $\Delta^{9,12}$) i això el fa potencialment interessant a l'hora d'obtenir un polímer funcionalitzat ja que la presència de dobles enllaços fa que les cadenes laterals siguin més reactives i susceptibles de ser derivatitzades a posteriori per síntesi química.

Per aquesta font de carboni s'han assajat dues concentracions inicials de substrats: 10 g/L i 20 g/L (Figura 4.5).

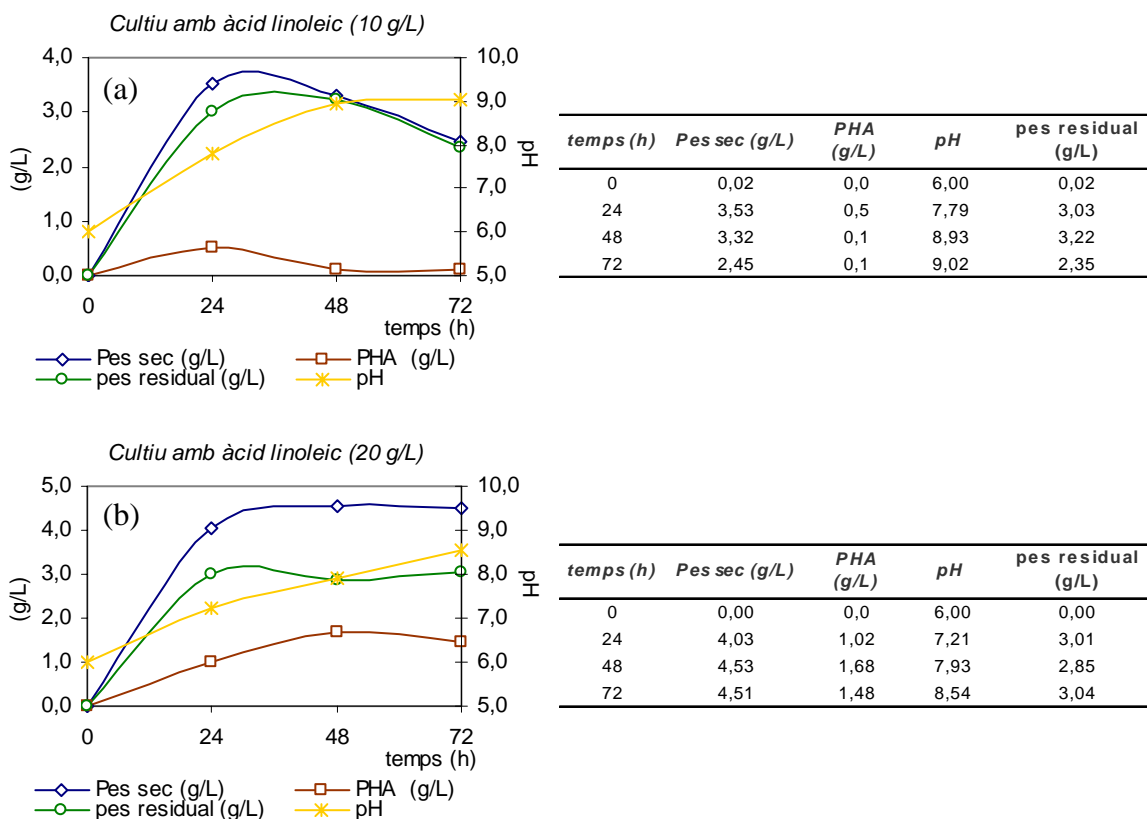


Figura 4.5 Cinètiques de creixement i producció de PHA emprant com a substrat diferents concentracions d'àcid linoleic (60%) com a font de carboni. S'han estudiat dues concentracions, (a) 10 g/L i (b) 20 g/L. També s'han fet mesures de pH

Les gràfiques (Figura 4.5 (a) i (b)) mostren les cinètiques de creixement i de producció de PHA per ambdós cultius, amb 10 i 20 g/L d'àcid linoleic com a font de carboni. En el cultiu amb 10 g/L de linoleic es pot observar com en 24 h el cultiu arriba a la fase estacionària i amb una producció de biomassa i de polímer de 3,53 i 0,5 g/L, respectivament. A l'igual que el descrit amb la font de carboni anterior, sembla ser que a partir de les 24 h de cultiu, existeix limitació de nitrogen i de font de carboni, tal i com suggereix el descens en el percentatge d'acumulació de PHA, possiblement degut a la degradació intracel·lular del PHA.

En el cultiu amb 20 g/L de linoleic, la producció de biomassa total (pes sec) és de 4 g/L i la producció de polímer és d'1 g/L. Això vol dir una acumulació respecte el pes

cel·lular sec del 25 % (p/p), arribant a un percentatge d'acumulació del 37 % (p/p) i 33 % (p/p), a les 48 h i 72 h de cultiu, respectivament.

La Figura 4.6 mostra les cinètiques d'acumulació per a les dues concentracions d'àcid linoleic assajades. Es pot comprovar, que en el cultiu amb 10 g/L d'àcid linoleic, el percentatge d'acumulació és molt baix (14 % (p/p)) i com va disminuint amb el temps com a conseqüència de la degradació intracel·lular del polímer.

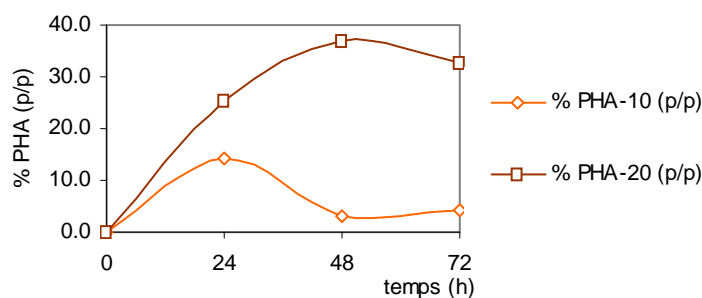


Figura 4.6 Representació gràfica dels percentatges d'acumulació de PHA aconseguits en els cultius amb àcid linoleic (60%) com a font de carboni. %PHA-10, percentatge d'acumulació de PHA en el cultiu amb 10 g/L de linoleic; %PHA-20, percentatge d'acumulació en els cultius amb 20 g/L d'àcid linoleic.

En canvi, amb el cultiu amb 20 g/L d'àcid linoleic el percentatge d'acumulació és del 37 % (p/p) a les 48h de cultiu.

Els percentatges d'acumulació de PHA obtinguts treballant amb *P. aeruginosa* 42A2 són superiors als descrits a la bibliografia per De Waard *et al.* (1993) que en cultius de *P. putida* KT2442 obtenen una acumulació de PHA del 17,8 % (p/p) quan utilitzen àcid linoleic com a substrat (De Waard *et al.*, 1993).

Tot i que la producció de biomassa i PHA (4,53 g/l i 1,68 g/L, respectivament a les 48 h de cultiu) és alta, els rendiments globals del procés indiquen que el microorganisme només utilitza un 30 % de la font de carboni ($Y_{x/c}=0,30$) per aquests processos.

Es va analitzar amb HPLC el sobrenedant del cultiu a diferents temps, i es va observar que a mesura que es consumeix la font de carboni, en el sobrenedant apareixen d'altres productes que foren identificats com a productes de la biotransformació de l'àcid linoleic (veure Figura 4.7). En el nostre grup de treball ja havien estat estudiats els productes de la biotransformació de l'àcid oleic (Culleré *et al.*, 2001), (Culleré, 2002) i

identificats (Guerrero *et al.*, 1997). Malgrat que no hi havia antecedents de les biotransformacions sobre àcid linoleic per la *P. aeruginosa* 42A2, si que havia estat descrita per a d'altres soques de *Pseudomonas aeruginosa*, com per exemple la *Pseudomonas aeruginosa* PR3 (Kim *et al.*, 2000), (Koritala and Bagby, 1992), (Kuo *et al.*, 1998).

Quan s'utilitza àcid oleic com a substrat de les biotransformacions s'obtenen els derivats mono- i dihidroxilat, així doncs, considerant l'estructura química de l'àcid linoleic i d'acord amb la bibliografia era d'esperar que quan s'utilitza aquest segon substrat, els productes de biotransformació que es formen són els derivats mono- i trihidroxilats de l'àcid linoleic.

Es va observar que durant l'extracció del sobrenedant amb cloroform, es formava una interfase bastant gruixuda de color blanc. Es va separar aquesta interfase i es va extreure amb MeOH qualitat HPLC. Aquesta solució metanòlica es va filtrar i conjuntament amb la fracció orgànica de l'extracció del sobrenedant es van analitzar separadament per HPLC.

Tal i com es pot observar a la Figura 4.7(a), a les 24 h de cultiu encara hi ha font de carboni però també s'observa la formació dels derivats monohidroxilats ($t_r=8-9$ min, on t_r és temps de retenció.). Tal i com es pot veure, hi ha més d'un producte monohidroxilat, ja que el substrat que s'ha utilitzat contenia un 60 % d'àcid linoleic però també un 30 % d'àcid oleic. Així doncs, sembla ser que es formen els derivats monohidroxilats de l'àcid linoleic i de l'àcid oleic. En el cas de l'àcid linoleic, cal considerar tots els isòmers òptics i de posició. La reacció d'oxidació de l'àcid linoleic no és una reacció ni regioselectiva ni estereoespecífica, per tant és d'esperar que hi haurà una barreja d'isòmers. A l'inici del cromatograma, $t_r=2-4$ min., s'observa un pic petit que podria correspondre als derivats di- i trihidroxilats.

A les 48 h de cultiu, ja s'ha consumit tota la font de carboni, així com també els derivats monohidroxilats i en canvi es manté el pic dels di- o trihidroxilats.

En la Figura 4.7(b), es poden veure els cromatogrames corresponents a les anàlisis de la fracció metanòlica obtinguda de l'extracció de la interfase.

Els cromatogrames mostren que els derivats di- i trihidroxilats estan localitzats en aquesta fracció. En el cromatograma corresponent a les 24h, es veu clarament un pic intens a un temps de retenció de $t_r=2,3$ min que correspon als derivats trihidroxilats procedents de la biotransformació de l'àcid linoleic.

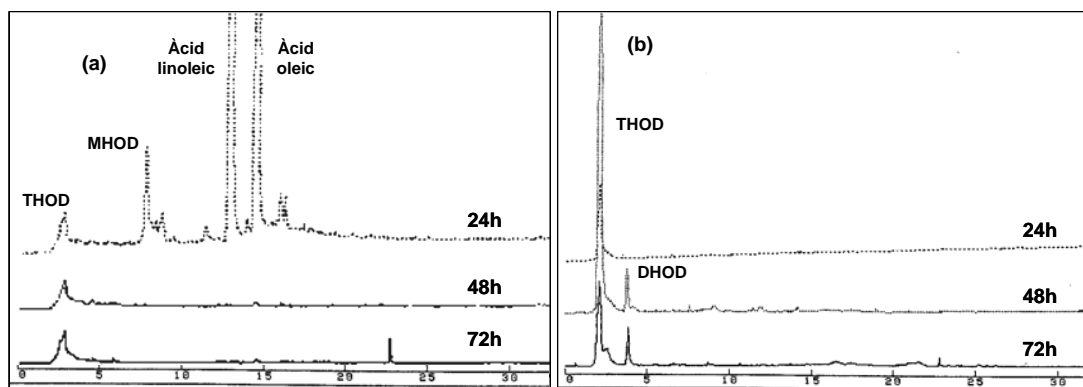


Figura 4.7 Cromatograma dels productes de biotransformació en cultius d'àcid linoleic. (a) Fracció clorofòrmica de l'extracció dels sobrenedants a diferents temps de cultiu: 24h, 48h i 72h. (b) Fracció metanòlica de l'extracció de la interfase a diferents temps de cultiu: 24h, 48h i 72h. On THOD, DHOD i MHOD indiquen els derivats trihidroxilats, dihidroxilats i monohidroxilats, respectivament.

No és fins a les 48 h, quan es detecta un segon pic ($t_r = 4,1$ min) que correspon possiblement al derivat dihidroxilat de l'àcid oleic. Per a l'assignació de cadascun dels pics s'han utilitzat patrons comercials (àcid oleic, àcid linoleic) i en per als productes de biotransformació s'ha utilitzat àcid ricinoleic i els productes ja caracteritzats procedents de la biotransformació de l'àcid oleic.

Tot i que la caracterització estructural dels productes de la biotransformació de l'àcid linoleic per *P. aeruginosa* 42A2 encara s'està estudiant, si que s'han realitzat algunes anàlisis preliminars per tal de caracteritzar aquests productes, s'ha confirmat per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses, que els productes presents en l'extracció metanòlica són una barreja de derivats trihidroxilats (THOD) i del derivat dihidroxilat (DHOD). Algun dels productes de la biotransformació que s'han pogut caracteritzar són: l'àcid 9,12,13-trihidroxi-10E-octadecenoic (THOD) i l'àcid 9,10-dihidroxi-12E-octadecenoic (DHOD) (veure annex).

De totes maneres, cal tenir en compte la complexitat d'aquestes anàlisis ja en el cas de *P. aeruginosa* PR3, Kim *et al.* (2000) han descrit fins a 16 isòmers diferents de THOD, ja que es formen l'àcid 9,10,13-trihidroxi-(11E)-octadecenoic i l'àcid 9,12,13-trihidroxi-(10E)-octadecenoic, així com els seus corresponents isòmers òptics (Kim *et al.*, 2000).

4.1.3 Oli de llinosa

L'oli de llinosa és un substrat complex que conté una barreja d'àcids grassos, saturats i insaturats. La principal característica d'aquest substrat és l'alt contingut en àcids grassos poliinsaturats: àcid linoleic (24,10 %) i àcid linolènic (47,40 %).

L'alt contingut en àcid linolènic (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) d'aquest substrat suggereix que una part del polímer que produeixi contindrà cadenes poliinsaturades, conferint així més reactivitat al polímer.

S'han realitzat les cinètiques de creixement i de producció de PHA per a diferents concentracions inicials de substrats. Les concentracions inicials de que s'han estudiat són les següents: 10, 15 i 20 g/L. Per a les tres concentracions d'oli de llinosa assajades, el pH inicial del medi de cultiu és de pH=6 aproximadament i aquest va augmentant fins arribar a pH=8,5-9,0. A mesura que s'ha anat augmentant la concentració de substrat s'ha fet més difícil de treballar amb els cultius ja que a partir de les 24h de cultiu s'ha observat la formació d'un greix que ha dificultat la manipulació de les mostres (Figura 4.8).

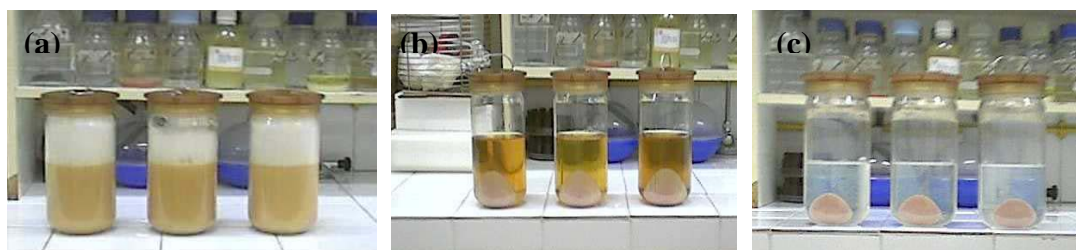


Figura 4.8. Cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli de llinosa com a substrat. (a) es mostra la formació d'escuma en els cultius degut a la formació de productes de biotransformació; (b) Després de separar les cèl·lules per centrifugació, el sobrenedant té un color groc molt intens i s'observa la formació d'un greix que envolta la biomassa; (c) la imatge mostra l'aspecte de la biomassa neta després de successius rentats amb hexà i aigua.

En la Figura 4.9 hi ha representades les cinètiques dels cultius per a les diferents concentracions d'oli de llinosa assajades. En la Figura 4.9(a), per a la concentració més baixa de substrat, és a dir 10 g/L, la producció de polímer és baixa i fins i tot a partir de les 24 h s'observa procés de biodegradació intracel·lular del material acumulat.

Malgrat la disminució en el percentatge d'acumulació de PHA, s'observa un augment de la biomassa total degut a l'augment progressiu de la biomassa residual. Per tant, els resultats semblen indicar que el microorganisme utilitza la font de carboni només per a créixer.

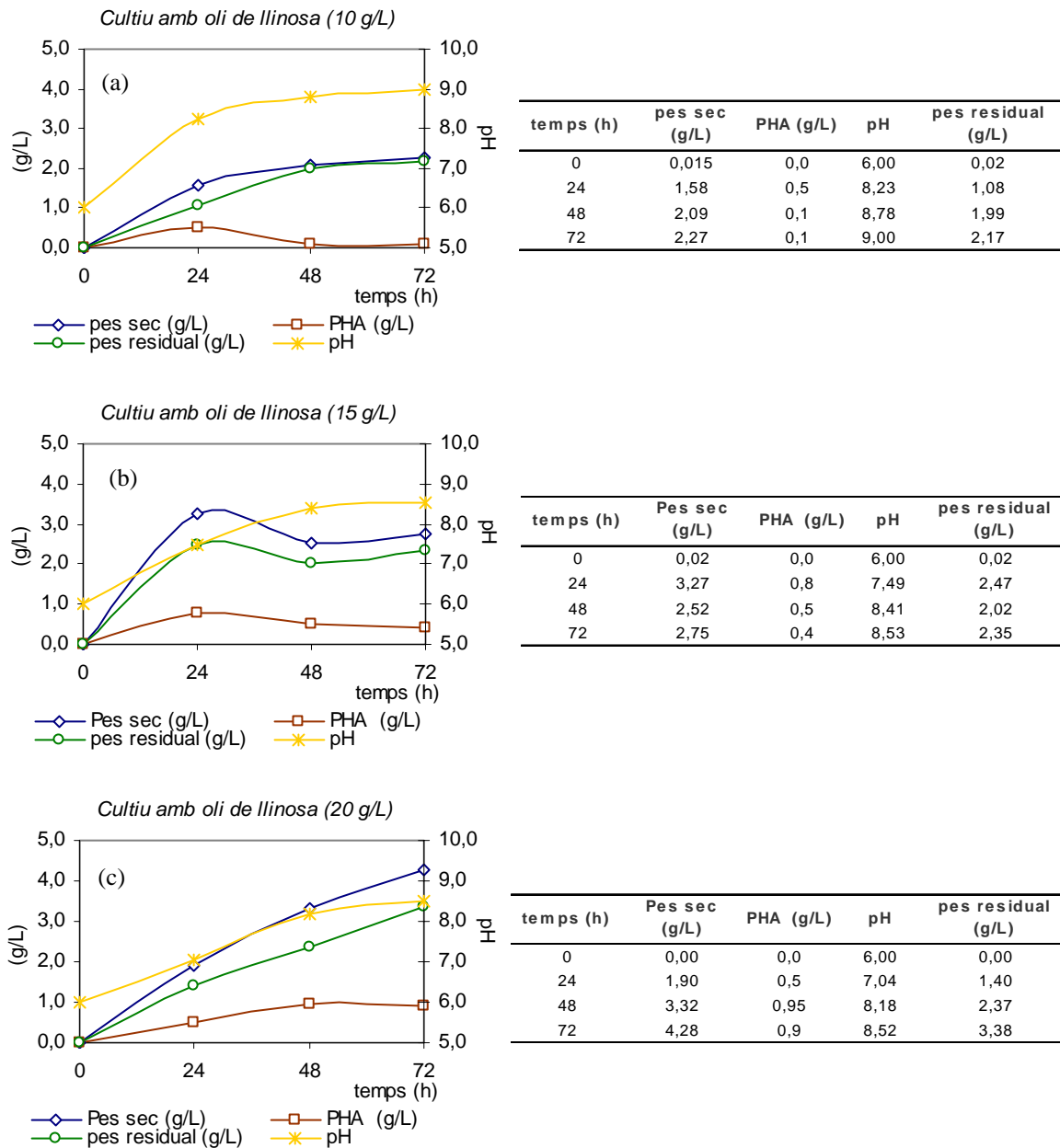


Figura 4.9. Cinètiques de creixement (pes sec (g/L) i de producció de polímer (PHA (g/L) per a diferents concentracions de substrat (oli de llinosa): (a) 10 g/L, (b) 15 g/L i (c) 20 g/L. En els tres processos s'han fet mesures del pH del medi.

Així doncs, d'acord amb els resultats obtinguts, la concentració de substrat assajada no és l'adequada per a la producció de polímer, ja que malgrat que s'obté una biomassa residual de 2,17 g/L a les 72 h de cultiu, paral·lelament també s'observa, una despolimerització intracel·lular important. A les 24 h de cultiu, el percentatge

d'acumulació de PHA és del 32 % (p/p) mentre que a les 72 h de cultiu ha disminuït fins a 4,5 % (p/p).

En els cultius amb 15 g/L de substrat (Figura 4.9(b)) es repeteix el perfil anterior. A les 24 h de cultiu es troba el màxim de biomassa total i d'acumulació, arribant a valors de 3,27 g/L i 0,8 g/L, respectivament. A partir d'aquest moment té lloc un procés de biodegradació del PHA, i s'observa un decreixement en la concentració de polímer, dels 0,8 g/L a les 24 h a 0,4 g/L a les 72 h. El pes residual es manté pràcticament constant malgrat la despolimerització del polímer. Aquest fet, podria suggerir que la cèl·lula està emprant el poder reductor del PHA acumulat per a conservar els nivells d'energia de manteniment basal necessaris per al bacteri.

Els millors resultats tant de biomassa (g/L) com de producció de PHA (g/L) es troben per a la concentració de substrat més alta (20 g/L). Es pot observar un creixement més lent però progressiu arribant a les 72 h de cultiu a valors de 4,28 g/L de biomassa total i de 0,9 g/L de PHA.

La Figura 4.10 mostra una gràfica comparativa dels percentatges d'acumulació obtinguts en les tres cinètiques descrites anteriorment.

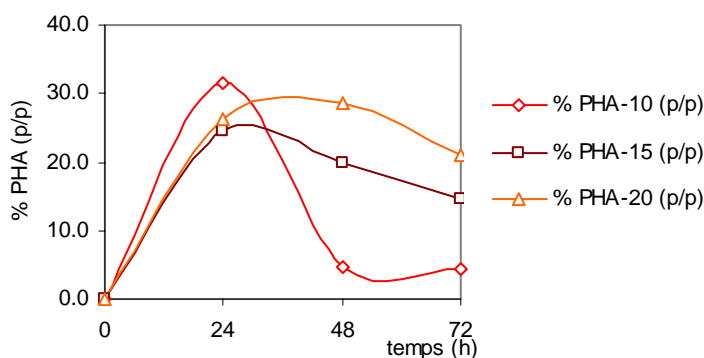


Figura 4.10 Cinètica d'acumulació de PHA, expressada en percentatges de PHA [(g/L PHA)/(g/L pes sec)*100] per a cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrat l'oli de llinosa: 10 g/L (%PHA-10), 15 g/L (%PHA-15) i 20 g/L (%PHA-20).

Tal i com es pot observar a la Figura 4.10, el percentatge d'acumulació en el cultiu amb 10 g/L és del 30 % a les 24 h de cultiu però decreix ràpidament de tal manera que a les 48 h de cultiu només es detecta una acumulació de PHA del 5 % (p/p).

Per a les altres dues concentracions d'oli de llinosa assajades, 15 g/L i 20 g/L, també s'observa un descens suau del percentatge d'acumulació de PHA. Per aquests dos

processos els òptims d'acumulació es troben a les 24 h i amb un percentatge d'acumulació del 25 % (p/p) en el cas del cultiu amb 15 g/L d'oli de llinosa i a les 48 h de cultiu i amb un 30 % (p/p) per als cultius amb 20 g/L d'oli de llinosa.

Els resultats obtinguts estan en concordança amb els obtinguts per Casini *et al.* (1997) que treballant amb *P. putida* KT2442 i oli de llinosa com a substrat, obtenen a les 48h de cultiu, una producció de biomassa de 3 g/L i un percentatge d'acumulació de PHA del 20 % (p/p) (Casini *et al.*, 1997). Ara bé, en termes d'eficiència, Casini *et al.* obtenen millors resultats ja que la concentració inicial de substrat és només de 6 g/L.

A l'igual que en el cas de l'àcid linoleic, s'ha analitzat el sobrenedant del cultiu i s'ha comprovat que 48 h de cultiu, la font de carboni estava exhaurida i que s'havien format el que semblen productes de biotransformació procedents de la hidroxilació dels àcids grassos poliinsaturats, components majoritaris de l'oli de llinosa. Així doncs, sembla que la *P. aeruginosa* 42A2 quan es fa créixer amb àcid oleic, àcid linoleic i àcid linolènic, no només és capaç de sintetitzar PHA sinó que també utilitza la font de carboni per a produir productes hidroxilats extracel·lulars com els ja descrits en els cultius amb àcid oleic i àcid linoleic.

De forma anàloga als cultius amb àcid linoleic, els sobrenedants dels cultius amb oli de llinosa també s'han analitzat per HPLC. S'ha agafat una alíquota de 5 mL de cultiu i després d'eliminar les cèl·lules per centrifugació s'ha realitzat l'extracció del sobrenedant amb cloroform. A diferència del que passava a l'extracció dels sobrenedants dels cultius amb àcid linoleic, en els sobrenedants dels cultius amb oli de llinosa no s'observa la formació de la interfase blanca. A continuació, a la Figura 4.11 es mostren els cromatogrames obtinguts de la fracció clorofòrmica a diferents temps de cultiu.

La Figura 4.11(a) correspon a l'extracció del sobrenedant de 24 h de cultiu. A les 24 h de cultiu, la font de carboni no ha estat consumida completament tal i com es pot observar en el cromatograma. En els temps de retenció $t_r=12-18$ min., apareixen l'àcid linolènic, àcid linoleic i àcid oleic mentre que a $t_r=23-25$ min. es detecta la presència de triacilglicèrids. La presència d'aquests triacilglicèrids es pot explicar fàcilment ja que el substrat es subministra en forma d'àcids grassos esterificats (triglicèrids) que s'acaben hidrolitzant en el medi de cultiu per acció d'enzims lipases generant així els àcids grassos lliures. A $t_r=2,3-6$ min. ja es comencen a detectar la formació dels productes hidroxilats de la biotransformació. En aquest cas però semblen que són THOD i DHOD.

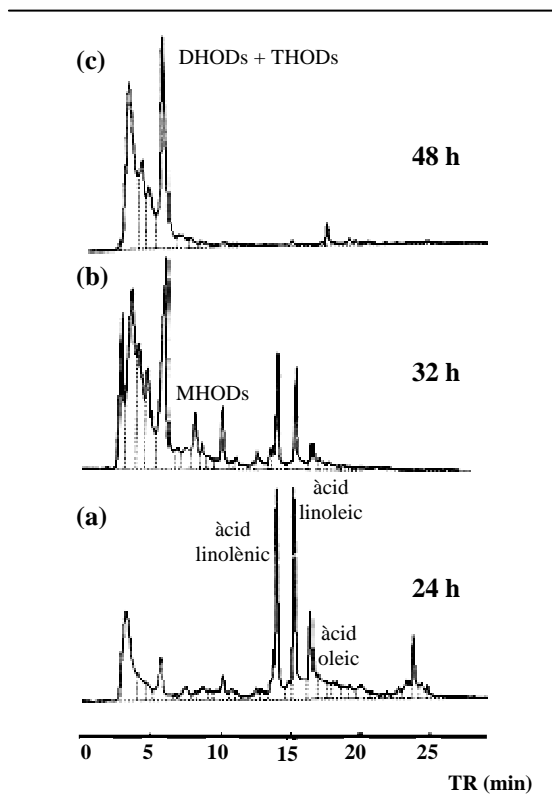


Figura 4.11 Cromatogrames (HPLC) dels productes de biotransformació en cultius amb oli de llinosa. Extracció orgànica del sobrenedant a diferents temps de cultiu: 24, 32 i 48 h

A les 32 h de cultiu (Figura 4.11(b)), les restes de triacilglicèrids han desaparegut però encara queden restes d'àcid linolènic, àcid linoleic i àcid oleic. Cal destacar l'augment de productes hidroxilats, $tr=2,3-10$ min. Tot i que no s'han pogut identificar tots si que es pot afirmar que hi ha diferents tipus de MHOD ($tr=8-10$ min), diferents tipus de DHOD ($tr=4-6$ min) i finalment també diferents tipus de THOD ($tr=2-4$ min). Aquesta major diversitat és deguda a la complexitat del substrat de partida, que conté dos tipus d'àcids grassos poliinsaturats (àcid linolènic (47 %) i àcid linoleic (24 %), així com també un percentatge d'àcid oleic (19 %). Finalment la Figura 4.11(c), mostra el cromatograma de l'extracció de sobrenedant a les 48h de cultiu, on es pot observar com s'ha consumit pràcticament tota la font de carboni i part dels derivats hidroxilats. La família de MHOD ha desaparegut i es mantenen el grup de DHOD i de THOD.

4.1.2. PHAs: Estructura i Propietats

Els PHAs obtinguts a partir de les diferents fonts de carbonis assajades, com són l'oli monodi, l'àcid linoleic i l'oli de llinosa, han estat caracteritzats químicament emprant diferents tècniques analítiques i espectroscòpiques. Així doncs, un cop els PHAs han estat purificats mitjançant la precipitació en metanol fred, s'han analitzat per FTIR, RMN i finalment per CG-EM per tal de determinar-ne la composició monomèrica. A més a més, també s'han estudiat les propietats tèrmiques, determinant la temperatura de fusió (T_m), la temperatura de transició vítria (T_g) i temperatura de descomposició (T_d) per a cadascun dels polímers emprant l'anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) i l'anàlisi termogravimètrica (TGA). El pes molecular dels polímers han estat determinats mitjançant la cromatografia de permeació de gel (GPC).

En els apartats següents s'analitzaran i es caracteritzaran els polímers obtinguts a partir dels diferents substrats assajats mitjançant diferents tècniques. Els polímers obtinguts presenten composicions monomèriques semblants per això s'ha escollit per la seva complexitat monomèrica, el PHA-L (obtingut de l'oli de llinosa) com a model en la interpretació dels resultats en les diferents tècniques.

4.1.2.1. Espectroscòpia d'Infraroig (FTIR)

Les bandes vibracionals característiques d'aquests polièsters, PHA-monodi (polímer obtingut emprant l'oli monodi) i del PHA-linoleic (polímer obtingut a partir de l'àcid linoleic), es resumeixen a continuació (els espectres es mostren a l'annex)

. Tal i com observar, tots els polièsters presenten bandes vibracionals molt semblants. Aquestes bandes s'analitzaran en detall en el cas concret del PHA-L (oli de llinosa).

i. PHA de l'extracte monodi (PHA-monodi)

IR (film, cm^{-1}): 2960, 2925, 2854, 1741, 1172, 724

ii. PHA de l'àcid linoleic (PHA-linoleic)

IR (film, cm^{-1}): 3450, 3010, 2960, 2929, 2860, 1743, 1465, 1383, 1174, 725

iii. PHA de l'oli de llinosa (PHA-L)

La Figura 4.12 mostra l'espectre de FTIR per al PHA-L, polímer sintetitzat emprant oli de llinosa com a font de carboni. L'espectre mostra les bandes de vibració

característiques per aquests compostos. L'assignació de les bandes vibracionals es fa d'acord als valors teòrics tabulats en les taules de determinació estructural (Pretsch *et al.*, 1998).

L'espectre de FTIR (Figura 4.12) per al PHA obtingut a partir de l'oli de llinosa mostra les bandes característiques d'un polièster. Tot i que aquesta tècnica no permet resoldre l'estructura del polímer si que és una tècnica ràpida per a confirmar la presència dels grups funcionals de l'estructura. En el nostre cas, s'observa una banda molt intensa a 1743 cm^{-1} que correspon a la vibració de tensió C-O del grup carbonil (C=O). També es confirma la presència de l'enllaç èster amb la banda a 1170 cm^{-1} que correspon a la vibració de tensió C-O del grup èster. Les vibracions de tensió (C-H) associades a les cadenes alquíliques apareixen a la zona de 2850 i 2929 cm^{-1} per als grups CH_2 i a 2960 cm^{-1} apareix la banda corresponent a la vibració de tensió del grup CH_3 (Taula 3.2). Mentre que la presència de cadenes insaturades es confirma amb les bandes a 3011 i 1654 cm^{-1} , que d'acord amb la bibliografia estan associades a la vibració de tensió (C-H)_{C=H} i a la vibració de tensió (C=C), respectivament.

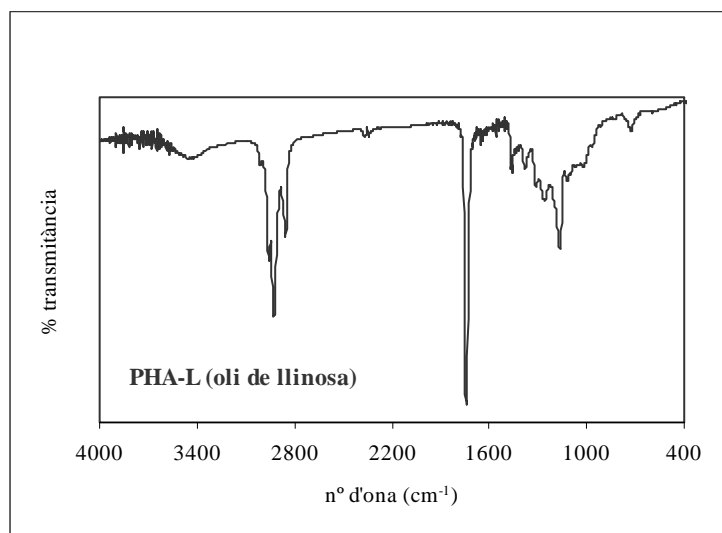


Figura 4.12 FTIR. Espectre del PHA-L sintetitzat per *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli de llinosa com a substrat.

Tant en l'espectre de FTIR del PHA-linoleic (veure annex) com en l'espectre de PHA-L (Figura 4.12), s'observa una banda ampla en la zona de $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, que d'acord amb la bibliografia correspon a la vibració de tensió (O-H) dels grups hidroxil i/o hidroperoxi. L'aparició d'aquesta banda en ambdós polímers suggereix que possiblement els PHAs

han començat a oxidar-se com a conseqüència de la reacció de les cadenes laterals insaturades amb l'oxigen atmosfèric. Aquest fenomen ha estat descrit per Lazzari *et al.*, (1999) en el cas dels olis secants (substrats rics en àcids grassos poliinsaturats) (Lazzari, 1999), (Agbenyega *et al.*, 1991).

En la Taula 4.1, hi ha recollides les principals bandes vibracionals associades a aquest tipus de polímers:

Taula 4.1 FTIR. Assignació de les bandes vibracionals on : ν , vibració de tensió o stretching; δ , vibració de deformació o bending; wag, wagging; γ , rocking o torsió.; a, mode vibracional asimètric; s, mode vibracional simètric.

Posició de la banda (cm^{-1})	Assignació bandes de vibració (IR)
3400-3650	$\nu(\text{O-H})$
3011	$\nu(\text{C-H})=\text{CH}$
2960	$\nu_a(\text{C-H})\text{CH}_3$
2926	$\nu_a(\text{C-H})\text{CH}_2$
2855	$\nu_a(\text{C-H})\text{CH}_2$
1740	$\nu(\text{C=O})$
1658	$\nu(\text{C=C})$
1464	$\delta(\text{CH}_2)$
1418	wag(CH_2) - CH_2 -CO-O-
1378	wag(CH_2)
1240	$\nu_a(\text{C-C-O})$
1164	$\nu(\text{C-O})$
1100	$\nu_a(\text{O-CH}_2\text{-C})$
723	$\gamma(\text{CH}_2)_n$ - + wag (C-H)=CH

4.1.2.2. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

En aquest apartat es discutiran les estructures dels següents PHAs: PHA-monodi, PHA-linoleic i PHA-L. Tot i que són polímers diferents si que en algun dels casos presenten una composició monomèrica molt semblant. El PHA-L és el polímer que presenta més diversitat i complexitat monomèrica, per això s'ha utilitzat com a model per a la descripció detallada de la interpretació dels espectres.

i. PHA-monodi

La majoria de les senyals són senyals complexes i no es pot determinar la seva multiplicitat. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 0,90 (t), 1,25 (m), 1,60 (m, H4), 2,5 (m, H2) i 5.2 (m, H3).

En la Figura 4.13 es mostra l'espectre de ^1H -RMN per al PHA-monodi. Tal i com es pot observar malgrat que s'ha emprat una font de carboni funcionalitzada com a substrat (amb insaturacions i grups hidroxil), el PHA resultant té la totalitat de les cadenes laterals saturades. El fet que la composició monomèrica del polímer no reflecteix la composició del substrat emprat no respon al descrit fins al moment en la síntesi de PHAs a partir d'àcids grassos (De Waard *et al.*, 1993),(Ashby *et al.*, 1998). Quan s'utilitzen àcids grassos de cadena llarga (LCFAs) per a la producció de PHAs, el substrat és degradat via el cicle de la β -oxidació fins a obtenir-se els intermediaris de cadena mitjana (Huisman *et al.*, 1989).

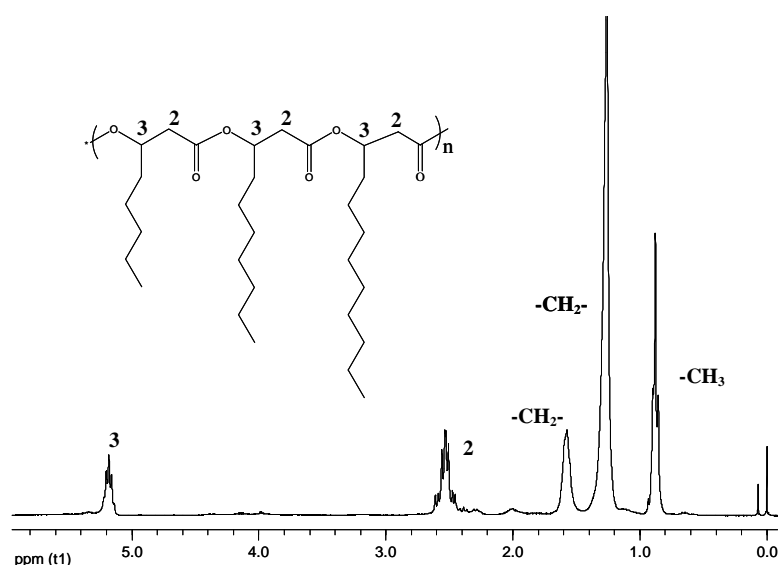


Figura 4.13. Espectre de ^1H -RMN del PHA-monodi purificat obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli monodi com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini- 300 (300 MHz).

Els resultats obtinguts suggereixen que en el cas de la síntesi del PHA emprant l'oli monodi com a substrat, per *P. aeruginosa* 42A2 no té lloc via β -oxidació sinó que es podrien utilitzar d'altres rutes metabòliques com per exemple la síntesi dels àcids grassos o bé d'altres rutes típiques de substrats no relacionats. En la Figura 3.12, que correspon a l'espectre de protó d'aquest polímer, s'aprecien senyals molt poc intenses relacionades amb la presència de protons olefínics i protons metilètics veïns a un grup hidroxil (2.0 ppm; 5.3 ppm; 4.0-4.1 ppm). Aquest fet fa pensar que possiblement existeix un percentatge gairebé inapreciable de les cadenes laterals del polímer que podrien mantenir els grups funcionals del substrat original.

En la Figura 4.13, s'han assignat sobre l'estructura química del polímer, els protons més característics com els protons metilènics (H2) adjacents al grup àcid que apareixen a 2.5 ppm o el protó metínic (H3) de l'enllaç èster. La gran majoria dels protons alifàtics de les cadenes laterals apareixen entre 1.2-1.4 ppm, a 1.6 ppm apareixen els protons metilènics (CH₂) en posició H4 i els protons metílics (CH₃) ressonen a 0.90 ppm.

A continuació és mostra l'espectre de ²D-COSY, que ens permet reconstruir l'estructura del polímer (Figura 4.14).

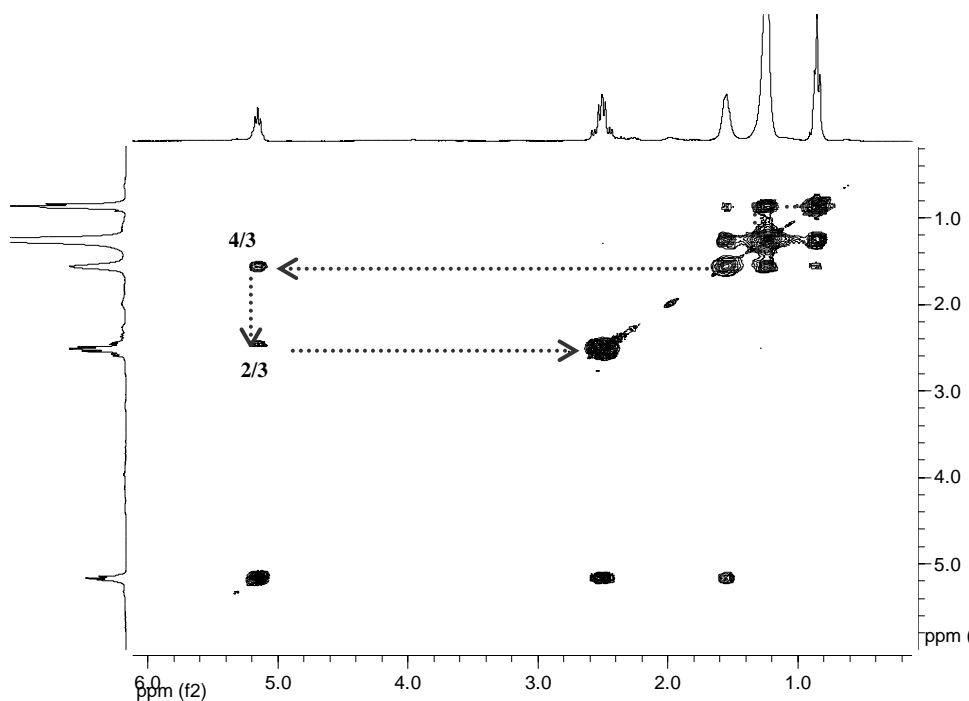


Figura 4.14. Espectre ²D-COSY del PHA-monodi purificat obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli monodi com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini- 300 (300 MHz).

En l'espectre d'homocorrelació ¹H-¹H (Figura 4.14) es pot veure com els protons del grup metil (0.9 ppm) correlacionen amb els protons de la resta de CH₂ de la cadena alifàtica i aquests a la vegada mostren acoblament directe amb els protons del grup CH₂ que ressonen a 1.6 ppm i que estan en la posició 4 de la cadena. En l'espectre, estan indicats els crosspeaks entre els protons H4/H3 i H3/H2 que situen l'enllaç èster en posició β respecte el grup àcid.

En la Figura 4.15 es mostra l'espectre de ¹³C-RMN, on han estat assignades les principals senyals de C.

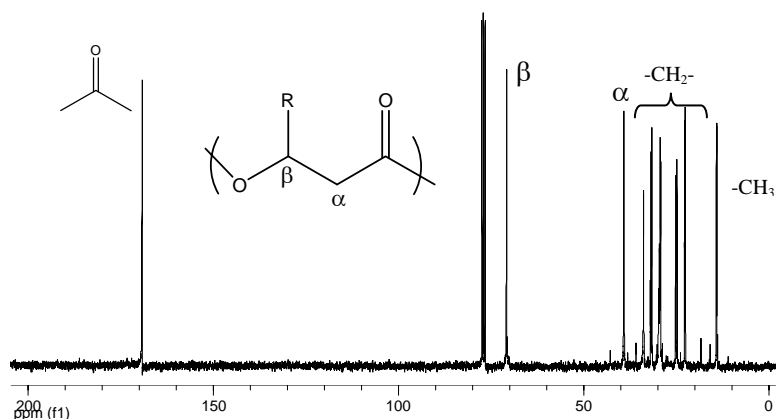


Figura 4.15. Espectre de ^{13}C -RMN del PHA-monodi purificat obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli monodi com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini- 300 (75 MHz).

ii. *PHA linoleic*

Tal i com s'ha indicat a l'apartat 3.2.1.2 de material i mètodes, l'àcid linoleic (60%), emprat en els cultius de *P. aeruginosa* 42A2 per a la producció de PHA, conté un 30 % d'àcid oleic. L'àcid oleic és una excel·lent font de carboni per a la producció d'aquests biopolímers tal i com ha estat descrit anteriorment en d'altres estudis (Haba *et al.*, 2007), (Bassas *et al.*, 2006), (Rodríguez, 2006), (De Waard *et al.*, 1993).

La majoria de les senyals són senyals complexes on no es pot determinar la multiplicitat de les senyals. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 0,90 (t, CH_3), 1,25 (m, $(\text{CH}_2)_n$), 1,60 (m, H4), 2,35 (m, H4'';H4'''), 2,5 (m, H2; H2';H2''; H2'''), 2,8 (m, H7'''), 5,2 (m, H3; H3'; H3''; H3'''), 5,3-5,6 (m, protons olefínics).

L'anàlisi de l'espectre de ^1H RMN mostra una gran diversitat monomèrica així com també la presència de cadenes laterals mono- i poliinsaturades (Figura 4.16). Les senyals que apareixen a 2,0 i 2,35 ppm corresponen als protons dels grups CH_2 adjacents a un doble enllaç. La senyal de 2,35 ppm correspon als protons H4'' i H4''' dels monòmers amb un doble enllaç en la posició 5. La senyal de 2,8 ppm correspon als protons d'un grup CH_2 en posició dial·lílica. Els protons olefínics ressonen a la regió de 5,3-5,5 ppm mentre que la senyal a 5,2 ppm correspon a la senyal del protó terciari de l'enllaç èster (H3';H3'';H3''') així com també a tots els protons en posició 3 (H3) de les cadenes saturades. Aquest senyal confirma la formació de l'enllaç èster del polímer.

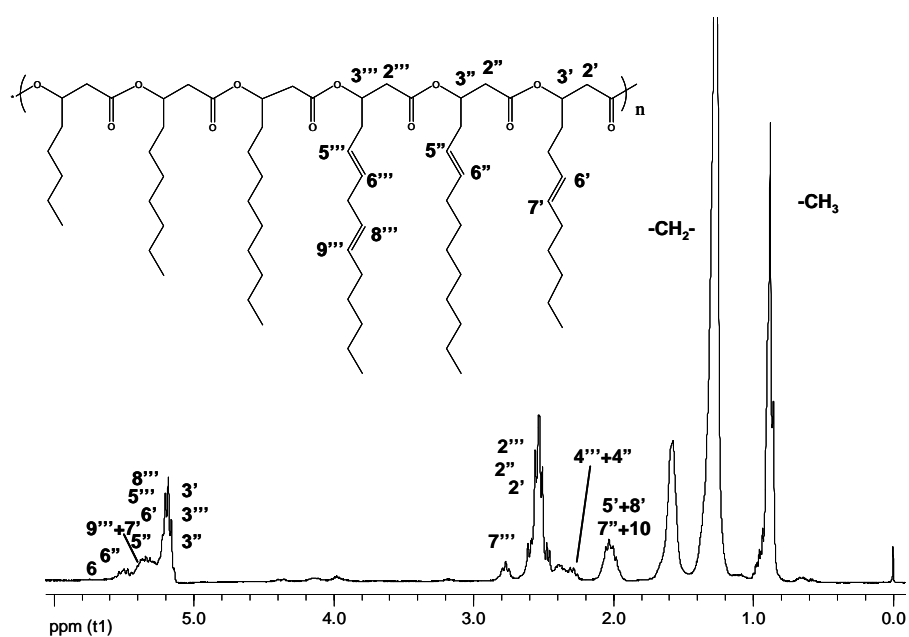


Figura 4.16. Espectre de ^1H -RMN del PHA-linoleic purificat obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid linoleic (60%) com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini- 300 (300 MHz).

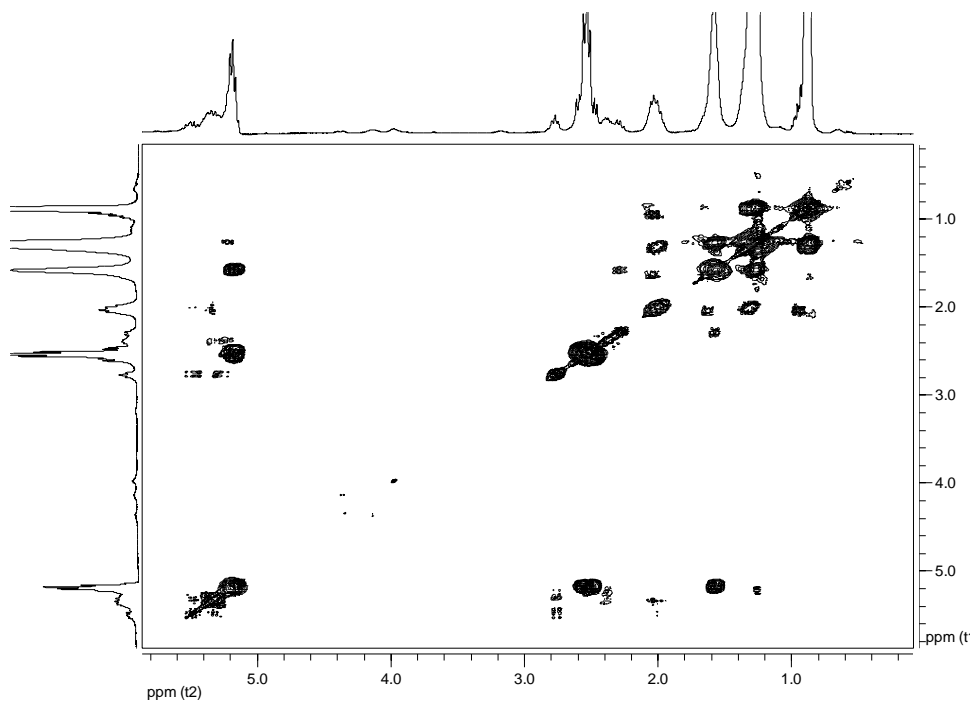


Figura 4.17. Espectre COSY del PHA-linoleic purificat obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid linoleic (60%) com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini- 300 (300 MHz).

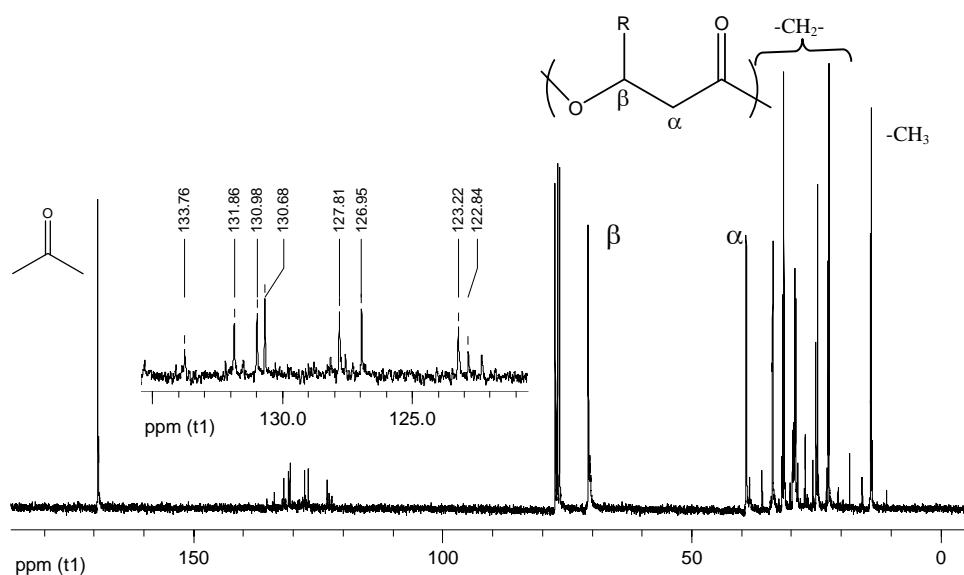


Figura 4.18. Espectre de ^{13}C -RMN del PHA-linoleic purificat obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid linoleic (60%) com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini- 300 (75 MHz). En l'espectre es pot veure ampliada la zona olefínica.

En l'espectre de ^{13}C -RMN (Figura 4.18) hi ha assignades les principals senyals de C. Tal i com es pot observar, s'ha ampliat la regió olefínica (120-140 ppm) i s'ha fet l'assignació dels carbonis olefínics (Taula 3.3) d'acord amb els experiments realitzats i la bibliografia consultada (De Waard *et al.*, 1993),(Pretsch *et al.*, 1998).

Taula 4.2. ^{13}C RMN. Taula de desplaçaments químics de la regió olefínica. D'acord amb de Waard et al. (1993) el monòmer C14:1 es forma a partir de l'àcid oleic i els monòmers C12:1 i C14:2 es formen a partir de l'àcid linoleic (De Waard *et al.*, 1993). On C14:1, 3-hidroxi-5-cis-tetradecenoat; C12:1, 3-hidroxi-6-cis-dodecenoat; C14:2, 3-hidroxi-5-cis-8-cis-tetradecadienoat.

carboni	monòmers 3-OH-alcenoats		
	C14:1	C12:1	C14:2
5	122.84		123.22
6	133.76	127.81	131.86
7		130.98	
8			126.95
9			130.68

Aquests resultats demostren l'existència dels monòmers C_{14:1}, C_{12:1} i C_{14:2}. Tot i que amb els experiments de ressonància realitzats no es pot quantificar el percentatge de cada

monòmer, si que qualitativament la relació d'intensitat entre les senyals suggereixen que el PHA obtingut a partir de l'àcid linoleic, majoritàriament conté cadenes laterals saturades, tot i que s'ha determinat la presència de com a mínim tres tipus diferents de monòmers insaturats.

iii. *PHA de l'oli de llinosa (PHA-L)*

El PHA-L, com a conseqüència de la composició de l'oli de llinosa, presenta una gran diversitat monomèrica. Conjuntament amb les anàlisis de CG-EM i de RMN s'ha pogut determinar l'existència de fins a 11 monòmers diferents. En la Figura 4.19, es mostra l'espectre de ^1H -RMN, així com també l'estructura química d'alguns dels monòmers més característics del PHA-L. En l'annex es poden trobar les estructures de tots els monòmers que componen el PHA-L. En l'espectre de ^1H -RMN es pot distingir clarament entre dues senyals diferents de metils ($-\text{CH}_3$).

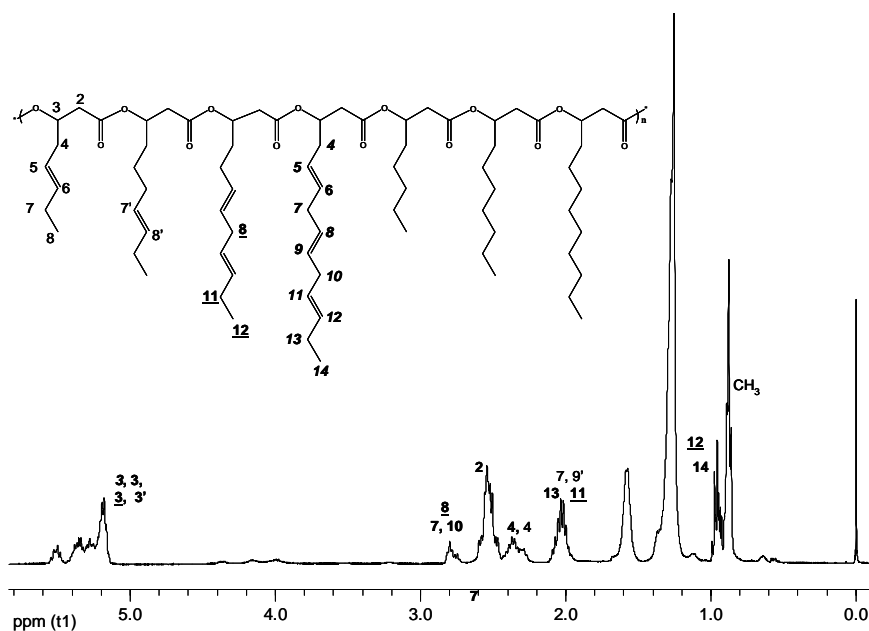


Figura 4.19 Espectre de ^1H -RMN enregistrat en l'equip Mercury-400 (400MHz). En aquest cas, l'estructura química només mostra els monòmers més característics del PHA-L, tot i que les anàlisis han demostrat l'existència dels següents monòmers $\text{C}_{8:0}$, $\text{C}_{8:1}$, $\text{C}_{10:0}$, $\text{C}_{10:1}$, $\text{C}_{12:0}$, $\text{C}_{12:1}$, $\text{C}_{12:2}$, $\text{C}_{14:0}$, $\text{C}_{14:1}$, $\text{C}_{14:2}$ i $\text{C}_{14:3}$.

La senyal que surt a camps més baixos correspon als protons metàlics en posició β a un doble enllaç (0,95 ppm) mentre que la senyal dels metils corresponents a les cadenes laterals saturades o que el doble enllaç està en d'altres posicions dins la cadena apareix a 0.90 ppm. Tot i així, són senyals complexes on no es pot definir multiplicitat. En el cas

dels metils en posició homoal·lílica, la complexitat de la multiplicitat de la senyal suggereixen l'existència de diferents tipus de metils homoal·lílics possiblement degut a la diferència entre les longitud de cadena dels monòmers.

Per exemple, els monòmers $C_{8:1}$ i $C_{14:3}$ ambdós contenen metils en posició homoal·lílica, però segurament els protons metàlics ressonen lleugerament diferent com a conseqüència de la proximitat del grup èster en el cas del monòmer $C_{8:1}$. A 2.0 ppm ressonen el protons dels metilens veïns a un doble enllaç i a 2.8 ppm ressonen els protons dels metilens en posició dial·lílica.

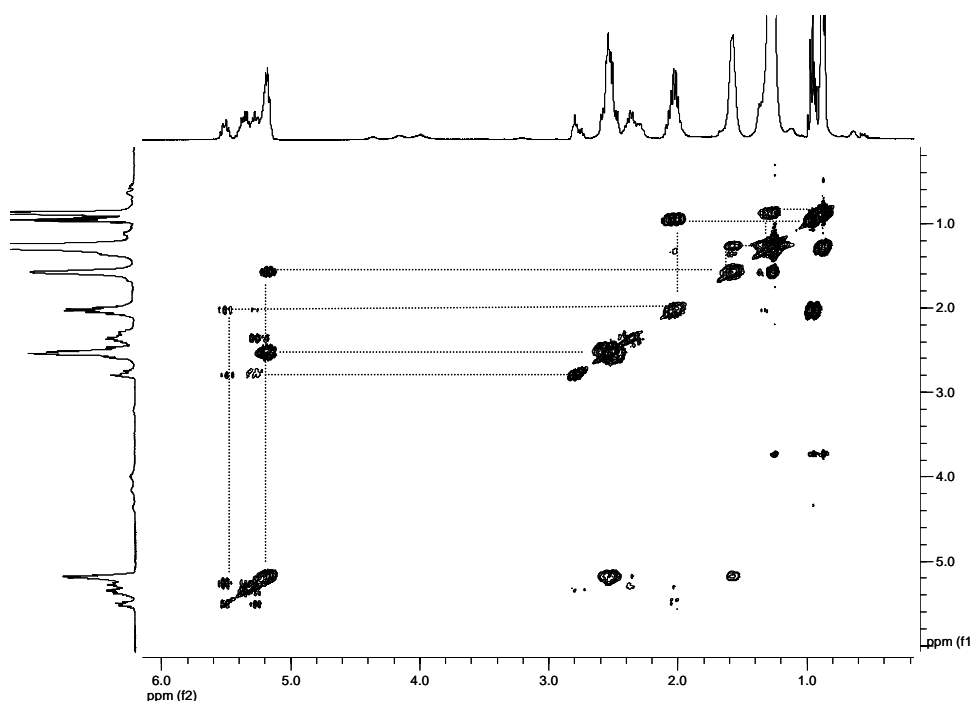


Figura 4.20. Espectre COSY enregistrat a l'equip Mercury-400 (400 MHz). Les correlacions H-H més significatives estan indicades per la línia discontinua.

L'espectre COSY ha confirmat part de les estructures però degut a la complexitat i a la mida del polímer, la informació ha estat complementada mitjançant els espectres d'heterocorrelació HsQc i HMBC.

L'espectre de ^{13}C mostra una gran diversitat de senyals a la zona olefínica (120-140 ppm) i per tant confirma la gran diversitat de monòmers mono i poliinsaturats en l'estructura monomèrica.

L'espectre HMBC ens ajuda a complementar la informació estructural obtinguda fins al moment, ja que permet veure l'heterocorrelació a dos i tres enllaços. La Figura 4.21 mostra l'espectre HMBC on la zona olefínica ha estat ampliada per facilitar l'anàlisi

de l'espectre. Tal i com es verificarà més endavant amb les anàlisis de CG-EM, la concentració de monòmers insaturats és molt baixa respecte la dels monòmers saturats, la qual cosa fa que la intensitat de les senyals dels carbonis olefínics sigui molt baixa i en alguns dels casos inexistents. Així doncs, en la Figura 4.21 només es mostren les heterocorrelacions H-C dels següents monòmers: C_{8:1}, C_{10:1}, C_{14:2} i C_{14:3}. Els crosspeaks corresponents a les correlacions a llarga distància estan assignats amb dos números: el primer fa referència al H i el segon fa referència al C.

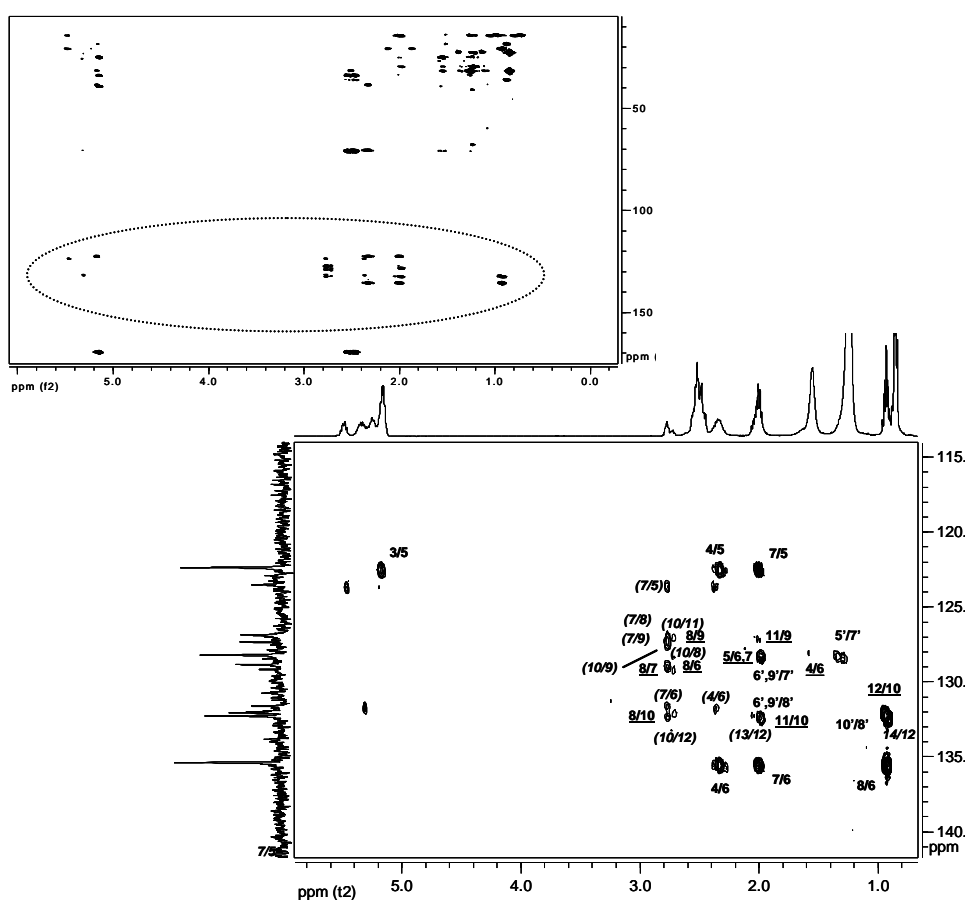


Figura 4.21 Espectre HMBC amb ampliació de la regió olefínica amb els seus corresponents espectres monodimensionals de ^1H i ^{13}C . On cada monòmer té la següent nomenclatura: C_{8:1} Δ^5 , número estàndard; C_{10:1} Δ^7 , números amb cometa; C_{12:2} $\Delta^{6,9}$, números subratllats i C_{14:3} $\Delta^{5,8,11}$, números entre parèntesis i cursiva.

De forma general, es pot dir que els crosspeaks a 0,95 ppm mostren la proximitat de carbonis olefínics a aquests grups metil, que els crosspeaks a 2,3 ppm indiquen l'existència d'estructures amb una insaturació en posició 5 i que els crosspeaks a 2,8 ppm

corresponen a la heterocorrelació a llarga distància entre els carbonis olefínics i els protons en posició dial·lílica.

La resolució de les estructura monomèrica del C_{8:1} s'ha fet de la següent manera: Tal i com es pot veure a la Figura 4.21, el carboni olefínic a 135,53 ppm correlaciona amb els protons metilènics a 0,95 ppm, amb els protons al·lílics a 2,0 ppm i amb els protons al·lílics en posició 4 a 2,35 ppm. A més a més, també s'observa un crosspeak entre els protons al·lílics en posició 4 i el carboni olefínic que ressona a 122,38 ppm i aquest carboni olefínic a la vegada correlaciona amb els protons al·lílics (2,0 ppm). També es pot observar correlació entre el carboni olefínic a 122,38 ppm i la senyal dels protons en posició 3. Per tant, totes aquestes correlacions indiquen que el doble enllaç només pot estar en posició 5 i que la cadena finalitza amb un grup metil en posició 8.

Les altres estructures han estat resoltes de la mateixa manera, tot i que en alguns dels casos les intensitats de la senyals eren molt baixes. En aquests casos, s'ha utilitzat informació d'altres tècniques així com també informació bibliogràfica.

4.1.2.3. Cromatografia de gasos-Espectrometria de masses (CG-EM)

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la composició dels mcl-PHAs és molt variada, de manera que les cadenes laterals poden ser totalment saturades o bé contenir insaturacions o d'altres grups funcionals. En general, però es tracta de cadenes alquíliques de longitud mitjana. Malgrat que la determinació estructural per ¹³C-RMN és una eina molt potent i ha estat extensament aplicada, en el cas dels mcl-PHAs no és suficient ja que els desplaçaments químics per als carbonis són molt semblants entre ells i els espectres de ¹H-RMN que s'obtenen presenten un perfil massa complex per tal d'extreure'n informació estructural precisa. Per tant, per tal de poder estudiar l'estructura complexa d'aquests polímers és necessari realitzar anàlisis de ressonància magnètica nuclear de dues dimensions (2D-RMN) homo i heteronuclears. Malgrat ser experiments molt precisos es necessita gran quantitat de mostra i temps d'anàlisis bastant llargs. Per això la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses ha esdevingut una bona alternativa. Aquesta tècnica estructural no necessita grans quantitats de mostra i els temps d'anàlisis són relativament curts. S'ha demostrat que amb la derivatització química de la mostra es facilita la interpretació dels perfils de fragmentació que s'obtenen en els espectres de masses (Eglinton *et al.*, 1968; McCloskey, 1969; Kidwell and Bleman, 1982). Així doncs, en el cas dels nostres polímers, abans de ser caracteritzats per CG-EM,

s'hidrolitzen mitjançant una metanòlisi per tal d'obtenir els derivats èsters metàlics dels monòmers, que són compostos més volàtils.

Els derivats èsters metàlics dels àcids 3-OH-alcanoic presenten les següents fragmentacions característiques quan s'analitzen per CG-EM:

- i. $m/e = 103$, que correspon al trencament en α al grup 3-hidroxi.
- ii. $m/e = 74$, que correspon al fragment que es forma amb la transposició de McLafferty.

Malgrat que aquestes fragmentacions són molt típiques per aquest tipus de compostos, és difícil determinar mitjançant aquestes o d'altres fragmentacions dels derivats èsters metàlics dels àcids 3-hidroxi-alcanoic informació estructural de la llargada de la cadena alquíllica (Figura 4.22). És per això, que es fa necessària una segona derivatització dels monòmers.

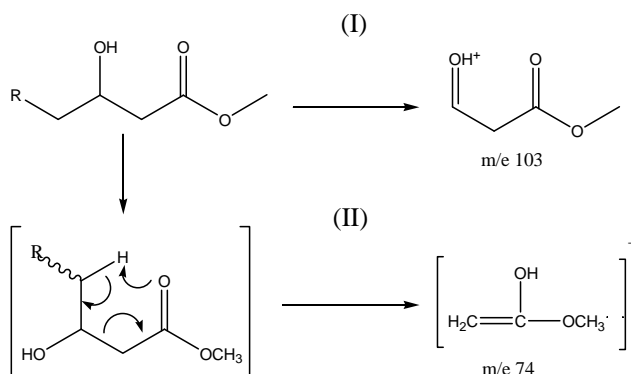


Figura 4.22 Fragmentacions característiques per als derivats èsters metàlics dels àcids 3-OH-alcanoic. (I) trencament en α al grup hidroxi; (II) transposició de McLafferty.

La derivatització dels èsters metàlics dels monòmers als seus derivats trimetilsilil (TMS) facilita la interpretació dels perfils de fragmentació, especialment en el cas dels monòmers saturats i insaturats dels PHAs de cadena mitja.

L'espectre de masses per als derivats TMS dels èsters metàlics dels 3-hidroxi-alcanoats presenten fragmentacions característiques degut al trencament en α al grup trimetilsilanol ($-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$). Les fragmentacions que s'observen són les corresponents al fragment, $m/e = 175$ [$(\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+=\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$] i al fragment que correspon a la pèrdua de pes de $[M-73]$ [$\text{RCH}=\text{O}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_3$]. El pic corresponen al fragment de $m/e = 175$ és més intens que el

m/e [M-73] ja que el parell electrònic dels àtoms d'oxigen afavoreixen l'estabilització de les càrregues positives. La intensitat relativa entre aquests dos pic decreix a mesura que augmenta la longitud de les cadenes alquíliques.

En general aquests tipus de compostos presenten fragmentacions, de baix pes molecular (Lee and Choi, 1995). Les fragmentacions esperades per als derivats TMS dels èsters metílics dels àcids 3-OH-alcanoic són les descrites en la Taula 4.3.

Taula 4.3 Fragmentacions no relacionades amb l'ió molecular i de baix pes molecular característiques d'aquests tipus de compostos trimetilsililats.

m/e	fragment
73	$[(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+]$
89	$[(\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+]$
131	$[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SiO}_2]^+$
133	$[\text{C}_5\text{H}_{13}\text{SiO}_2]^+$
159	$[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{SiO}_3]^+$

Per altra banda, les fragmentacions relacionades amb l'ió molecular per aquests compostos són les descrites a la Taula 4.4.

Taula 4.4 Fragmentacions relacionades amb l'ió molecular On M, correspon a l'ió molecular de cada monòmer.

m/e	fragment
[M-15]	Pèrdua d'un metil del grup trimetilsilil
[M-31]	Pèrdua d'un metoxi del grup metil ester
[M-47]	Pèrdua de MeOH del fragment m/e=[M-15] seguida de transició metaestable

En la Figura 4.23 hi ha descrites les principals fragmentacions dels derivats TMS dels èsters metílics dels àcids 3-hidroxialcanoic, així com també les seves estructures.

En general, el pic base (és a dir el pic més intens del espectre de masses) dels derivats TMS d'aquests compostos és el pic de m/e = [M-15], sobretot en el cas dels monòmers amb cadenes alquíliques de més de 10 àtoms de carboni.

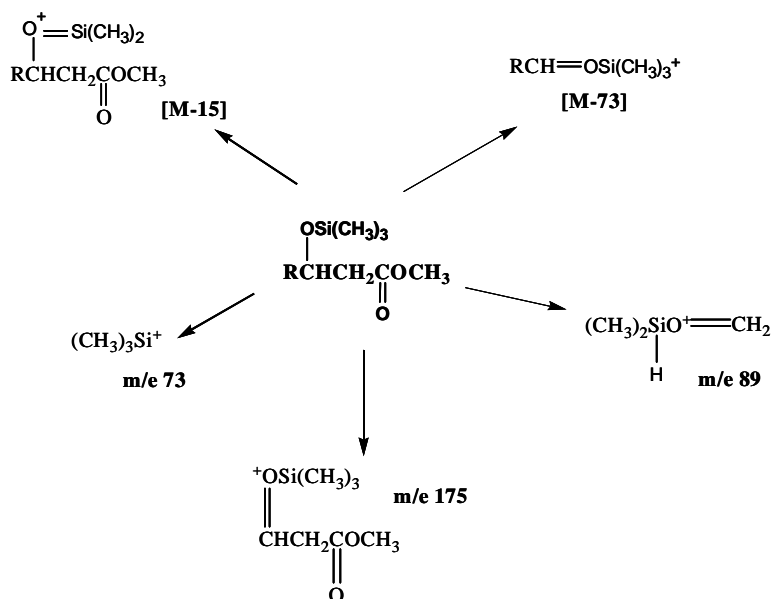


Figura 4.23 Fragmentacions característiques dels derivats TMS dels èsters metàlics dels àcids 3-hidroxicarboxílics. On M és el pes molecular de cada monòmer.

A continuació es mostren els resultats obtinguts en les anàlisis de CG-EM. La composició dels polímers, PHA-monodi i PHA-linoleic, s'ha resumit en la Taula 4.5 i una vegada més el polímer obtingut de l'oli de llinosa, PHA-L, s'ha utilitzat d'exemple per a mostrar com s'han analitzat els cromatogrames i els espectres de masses.

i. PHA-linoleic i PHA-monodi

La composició dels polímers obtinguts dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli monodi i àcid linoleic com a font de carboni ha estat resumida en la Taula 4.5 Tal i com es pot observar, el polímer que s'obté a partir de l'oli monodi és un polímer amb les cadenes laterals totalment saturades malgrat que el substrat de partida contenia un alt percentatge d'àcids grassos hidroxilats i insaturats. El polímer està constituït principalment per als monòmers C_{8:0} (32.7%), C_{10:0} (28.9%) i C_{12:0} (25.3%). Aquest resultat està en concordança amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de RMN (apartat 4.1.2.2).

El PHA-linoleic, d'acord amb els resultats obtinguts per CG-EM, conté un 80 % de les cadenes laterals saturades de les quals C_{8:0} i C_{10:0} representen el 35.1 i el 39.6 %, respectivament. Els monòmers insaturats que han estat identificats són C_{12:1} (7.9 %), C_{14:1} (5.6 %) i C_{14:2} (6.5 %).

Taula 4.5. CG-EM. Composició monomèrica dels PHAs sintetitzats per *P. aeruginosa* 42A2 quan es fa créixer en medi MM1 i emprant oli de llinosa, oli monodi i àcid linoleic com a substrats.

Monomer	Pes molecular (g/mol)	oli de llinosa	oli monodi	àcid linoleic
C6:0	218	0.4	3.1	nd
C8:0	246	33.7	32.7	35.1
C8:1	244	5.6	nd	nd
C10:0	274	24.3	38.9	39.6
C10:1	272	7.0	nd	nd
C12:0	302	4.9	25.3	5.3
C12:1	300	1.4	nd	7.9
C12:2	298	4.8	nd	nd
C14:0	330	0.4	nd	nd
C14:1	328	6.4	nd	5.6
C14:2	326	2.8	nd	6.5
C14:3	324	8.3	nd	nd
% monomers saturats		63.8	100.0	80.0
% monomers insaturats		36.2	0.0	20.0

En un estudi realitzat per De Waard *et al.*, (1993) es demostra que en el cas de *P. putida* KT2442 quan es fa créixer en àcid linoleic (95 % pur.) s'obtenen els monòmers C_{14:2} (15.9 %) i C_{12:1} (16.9 %) i quan s'utilitza àcid oleic (95 % pur.) el monòmer insaturat que s'obté és el C_{14:1} (15.5 %) (De Waard *et al.*, 1993). En el cas de *P. aeruginosa* 42A2 i emprant àcid linoleic (60 % pur., que conté fins a un 30 % d'àcid oleic) s'han detectat els tres monòmers insaturats (C_{12:1}, C_{14:1} i C_{14:2}) en la composició del polímer. Tot i que el monòmer C_{14:1} s'obté en un percentatge comparable a l'obtingut per De Waard *et al.*, els monòmers procedents de l'àcid linoleic, C_{12:1} i C_{14:2}, s'obtenen en un percentatge inferior. Resultats semblants als obtinguts per De Waard *et al.*, han estat descrits per van der Walle *et al.* quan s'ha fet créixer *P. putida* KT2442 en una mescla d'àcid linoleic i àcid oleic (molt semblat a l'emprada en els cultius amb *P. aeruginosa* 42A2) (Van der Walle *et al.*, 1999).

ii. *PHA-L (oli de llinosa)*

Tal i com es mostra en el cromatograma del PHA obtingut a partir de l'oli de llinosa (Figura 4.24), el polímer està compost principalment per monòmers $C_{8:0}$ i $C_{10:0}$. També s'ha detectat la presència de $C_{6:0}$, tot i que en menys extensió. En la part ampliada del cromatograma es s'observa la formació de monòmers de cadena més llarga, C_{12} i C_{14} , així com els seus corresponents monòmers mono- i poliinsaturats.

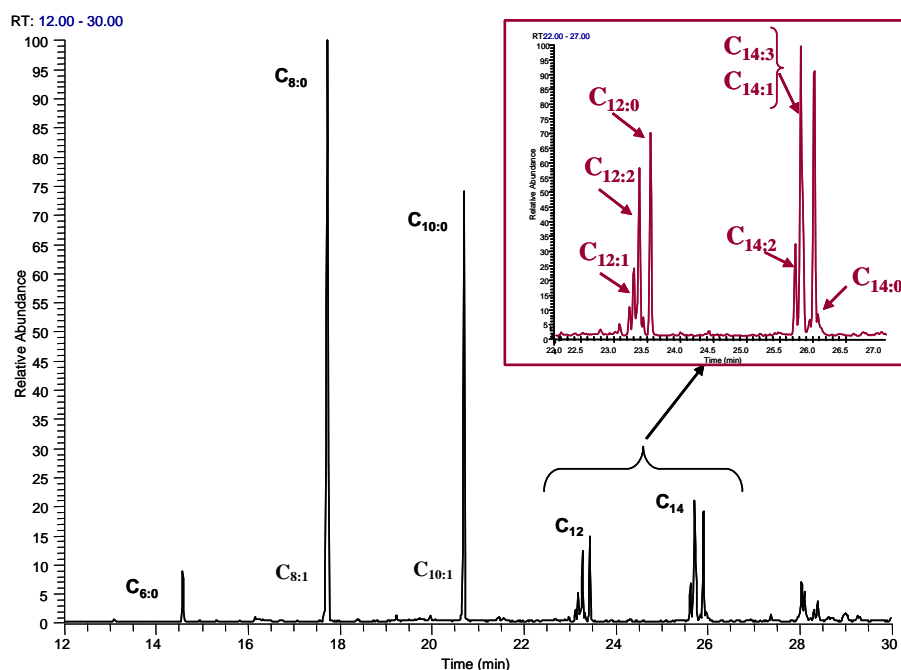


Figura 4.24 Cromatograma del PHA-L. En la Figura estan indicats tots els monòmers. On $C_{6:0}$ correspon al TMS derivat de l'hexanoat de metil; $C_{8:0}$, TMS derivat de l'octanoat de metil; $C_{10:0}$, TMS derivat del decanoat de metil. Tal i com es pot observar, la família dels TMS derivats èster metílics del dodecanoat i del tetradecanoat està ampliada a la part superior dreta del cromatograma. En l'ampliació s'observa la presència de cadenes mono-, di i tri- (en el cas del tetradecanoat metil èster) insaturades.

Els monòmers han estat identificats per espectrometria de masses d'impacte electrònic i el seu pes molecular ha estat confirmat per ionització química amb metà, confirmant-se en la majoria dels casos la presència dels pics $[M+1]$, $[M+29]$ i $[M+41]$.

Anàlisi en més detall dels pics cromatogràfics, que inicialment s'havien assignat als monòmers $C_{8:0}$ i $C_{10:0}$, han demostrat l'existència d'una barreja entre el monòmer saturat i del monòmer insaturat. Els pics no s'han pogut resoldre cromatogràficament i per tal de poder fer una quantificació relativa de les àrees, s'ha fet un seguiment d'un ió

característic de cadascun dels monòmers, anàlisi del SIM (Selected Ion Monitoring), que a permès obtenir la proporció relativa de cada monòmer present en el pic.

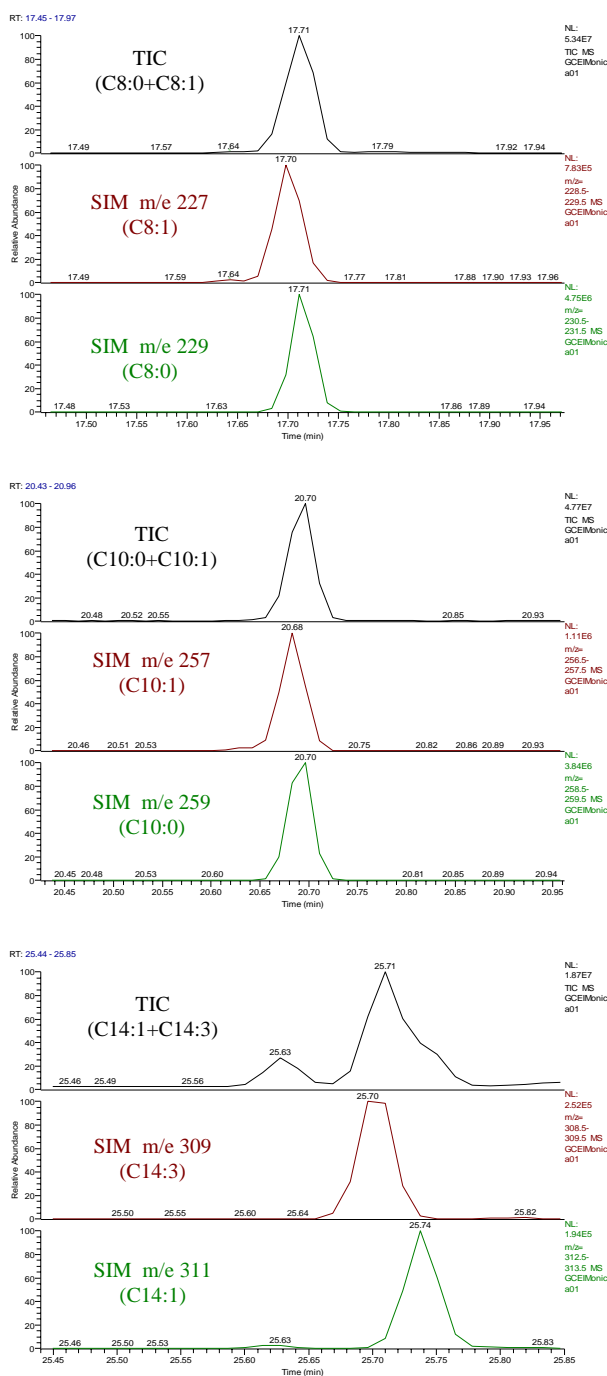
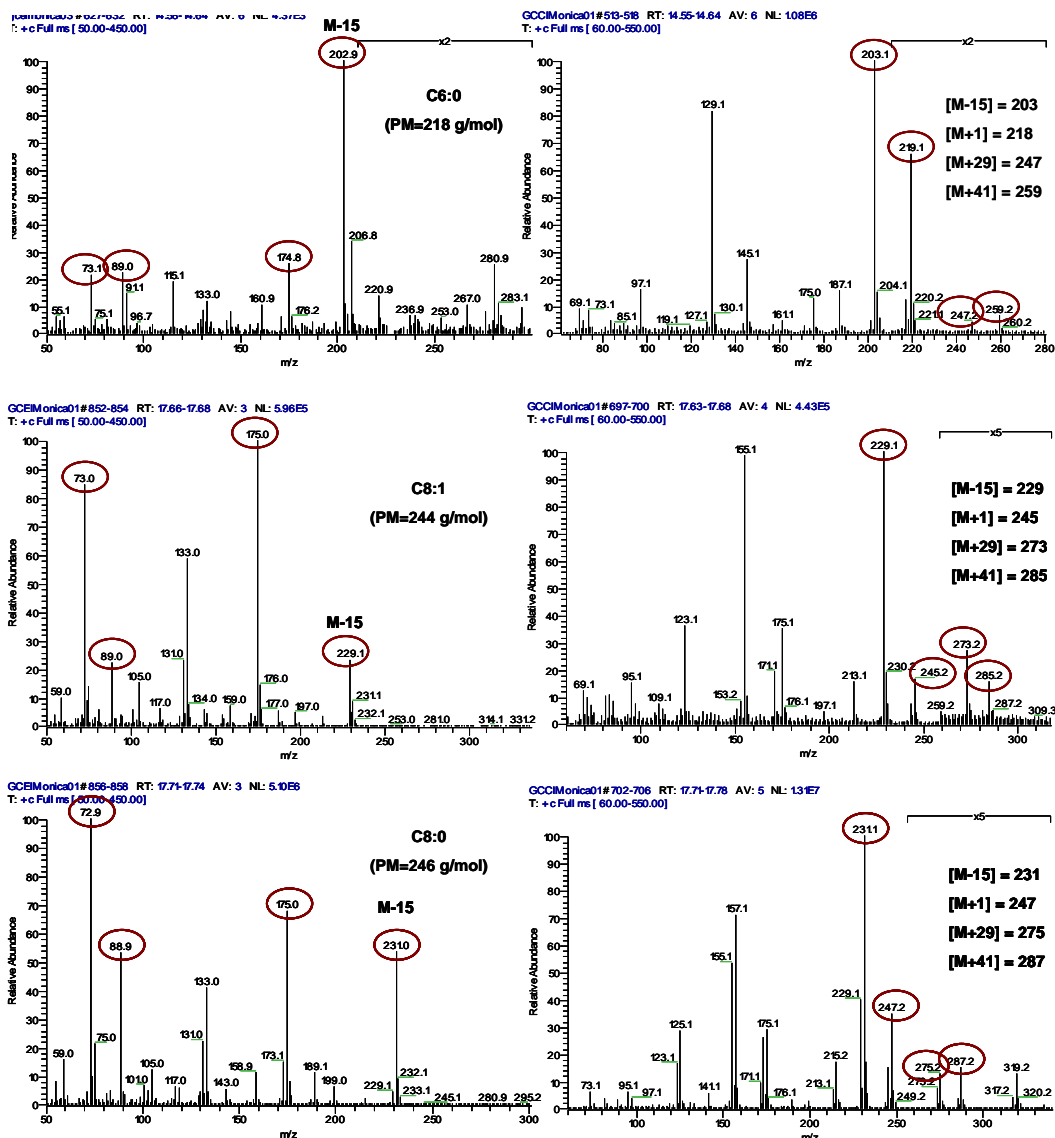


Figura 4.25 CG-EM. En cada Figura es mostra en negre el TIC (total ion current) per al pic no resolt i en vermell i verd, el SIM (selected ion recording) per a cadascun dels components de la parella de monòmers que volem separar (C_{8:0}+C_{8:1}; C_{10:0}+C_{10:1}; C_{14:1}+C_{14:3}).

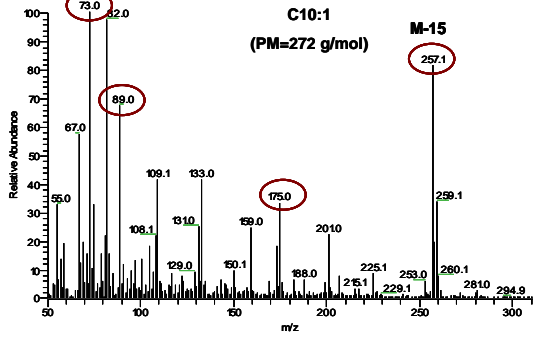
La proporció relativa obtinguda entre els dos pics ha estat aplicada a l'àrea total del pic per a poder fer la quantificació de cadascun dels monòmers. Aquesta metodologia també s'ha aplicat en el cas de la parella de monòmers C_{14:1} i C_{14:3}.

Tal i com s'ha explicat a l'apartat 4.1.2.3, cadascun dels monòmers s'han identificat mitjançant l'espectre de masses d'impacte electrònic, buscant les fragmentacions característiques per aquestes estructures. Paral·lelament, el pes molecular dels monòmers ha estat confirmat amb l'espectre de masses d'ionització química amb metà. A continuació es mostren els espectres de masses, d'impacte electrònic (EI) (columna de l'esquerra) i ionització química (CI-CH₄) (columna de la dreta), obtinguts per a cadascun dels monòmers.

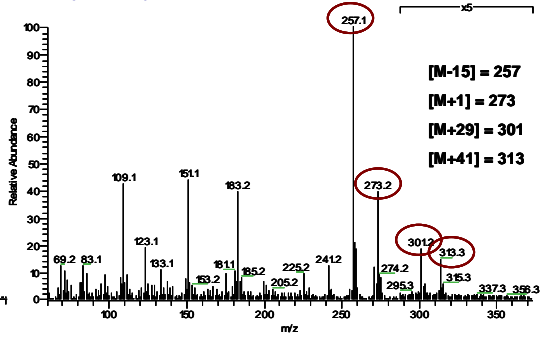


4. Resultats i Discussió

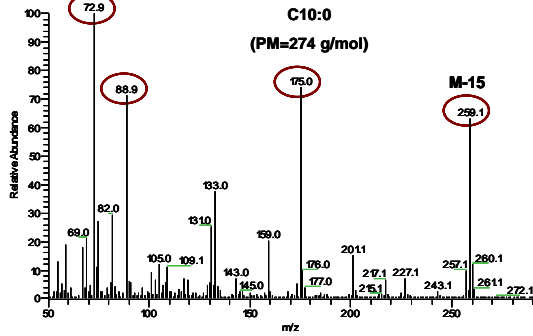
GCEIMonica01#1069-1071 RT: 20.63-20.66 AV: 3 NL: 6.69E4
T: +c Full ms [50.00-450.00]



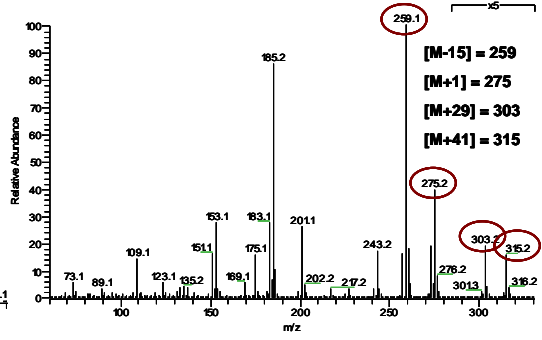
GCCIMonica01#877-879 RT: 20.63-20.67 AV: 3 NL: 4.70E5
T: +c Full ms [60.00-550.00]



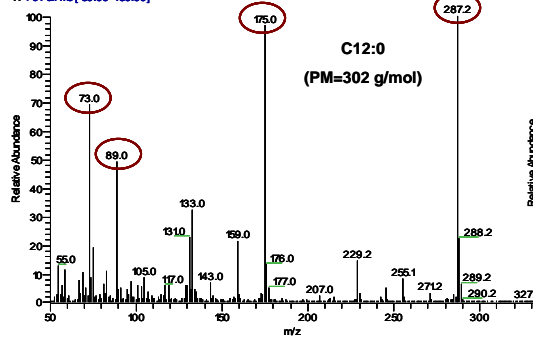
GCEIMonica01#1074-1075 RT: 20.70-20.71 AV: 2 NL: 3.76E8
T: +c Full ms [50.00-450.00]



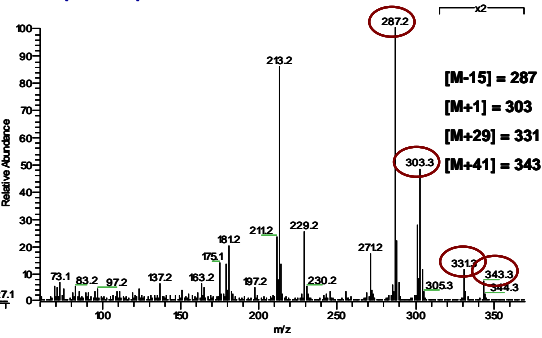
GCCIMonica01#882-884 RT: 20.72-20.75 AV: 3 NL: 8.78E8
T: +c Full ms [60.00-550.00]



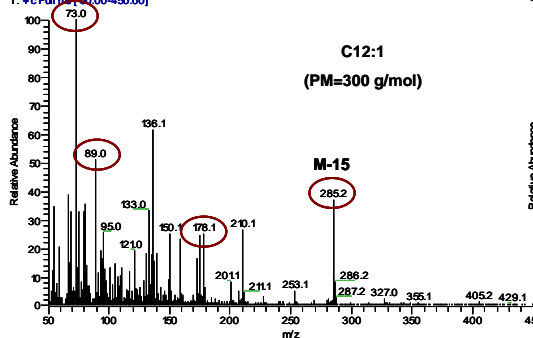
GCEIMonica01#1271-1277 RT: 23.40-23.48 AV: 7 NL: 3.62E5
T: +c Full ms [50.00-450.00]



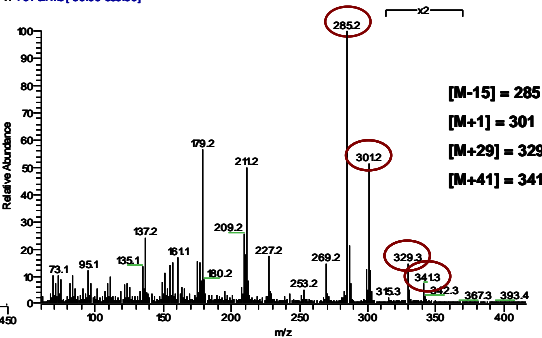
GCCIMonica01#1042-1049 RT: 23.39-23.51 AV: 8 NL: 1.1E8
T: +c Full ms [60.00-550.00]



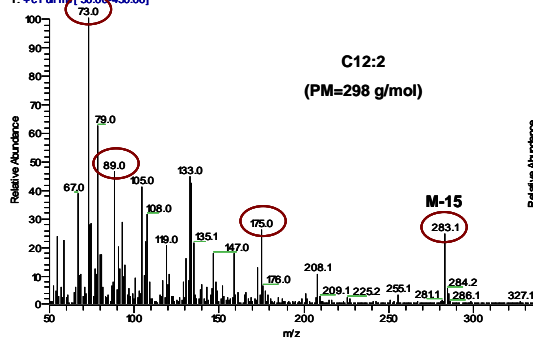
GCEIMonica01#1254-1258 RT: 23.16-23.22 AV: 5 NL: 1.2E5
T: +c Full ms [50.00-450.00]



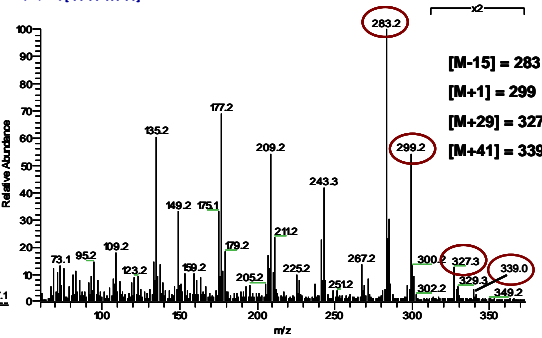
GCCIMonica01#1030-1032 RT: 23.19-23.22 AV: 3 NL: 6.33E5
T: +c Full ms [60.00-550.00]

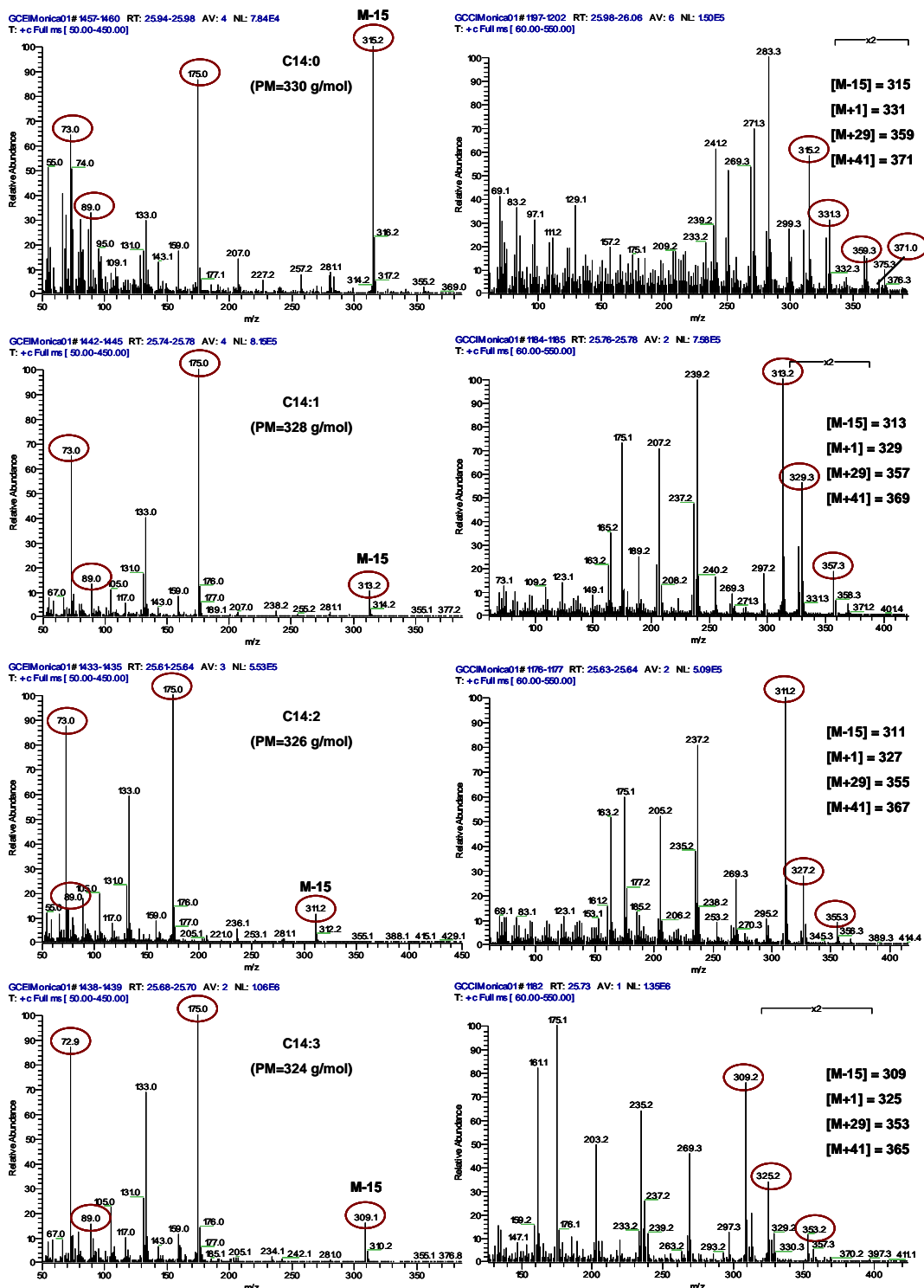


GCEIMonica01#1259-1264 RT: 23.23-23.30 AV: 6 NL: 2.9E5
T: +c Full ms [50.00-450.00]



GCCIMonica01#1033-1037 RT: 23.24-23.30 AV: 5 NL: 4.85E5
T: +c Full ms [60.00-550.00]





A la Taula 4.6 es mostren els resultats obtinguts de la quantificació relativa dels monòmers del PHA-L, així com també els pesos moleculars dels corresponents derivats TMS dels èsters metàlics de cadascun dels monòmers.

Monomer	Pes molecular (g/mol)	PHA-L (%)
C6:0	218	0.4
C8:0	246	33.7
C8:1	244	5.6
C10:0	274	24.3
C10:1	272	7.0
C12:0	302	4.9
C12:1	300	1.4
C12:2	298	4.8
C14:0	330	0.4
C14:1	328	6.4
C14:2	326	2.8
C14:3	324	8.3
% monomers saturats		63.8
% monomers insaturats		36.2

Taula 4.6 CG-EM. Composició monomèrica del PHA-L obtingut en el cultiu amb *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli de llinosa com a substrat.

Per a la producció d'aquest polièster s'ha emprat l'oli de llinosa. No obstant, tot i que aquest substrat conté una proporció molt alta d'àcids grassos mono- i poliinsaturats (90 %), tal i com es pot comprovar en la Taula 4.6, en el nou polímer sintetitzat, el contingut de monòmers insaturats representa tan sols del 36 % dels monòmers totals del polímer.

Tot i que la longitud de cadena dels diferents monòmers varia entre unitats de C₆ i C₁₄, el polímer que s'obté està bàsicament constituït per unitats C_{8:0} (33,7 %) i C_{10:0} (24,3%). Aquest fet és bastant comú en les espècies de *Pseudomonas* (Sudesh and Doi, 2000). També ha estat detectada la presència de monòmers C_{6:0} (0,4 %), tot i que en un percentatge molt petit. Pel que fa als monòmers insaturats, s'ha de destacar la presència dels monòmers monoinsaturats C_{8:1}, C_{10:1} i C_{14:1} que representen un 5,6 %, 7.0 % i un 6,4%, respectivament, de la composició total del polímer. Finalment, degut a l'alt contingut d'àcid linolènic en el substrat de partida, el polímer també conté cadenes poliinsaturades, concretament s'han pogut detectar unitats amb tres dobles enllaços (C_{14:3}) i amb dos dobles enllaços (C_{12:2} i C_{14:2}) que representen un 8.3 % i un 7.6 %, respectivament.

Si es compara la composició del PHA sintetitzat per *P. aeruginosa* 42A2 emprant oli de llinosa com a substrat amb d'altres PHAs produïts per d'altres microorganismes emprant la mateixa font de carboni, tot i que la diversitat monomèrica és semblant, si que difereix lleugerament en el contingut total de monòmers insaturats, que per el cas de *P. putida* representa més del 50% de la composició monomèrica (Casini *et al.*, 1997), (Van der Walle *et al.*, 1999), (Ashby *et al.*, 2000).

De totes maneres, quan *P. aeruginosa* 42A2 es fa créixer a 37 °C enlloc de 30 °C, el percentatge de monòmers insaturats en el polímer és del 45 % , lleugerament superior a l'obtingut en els cultius a 30 °C que era del 36 %. Aquesta relació entre la temperatura de cultiu i la composició monomèrica del PHA ja s'havia observat anteriorment en cultius amb *P. aeruginosa* 47T2 (Haba *et al.*, 2007).

4.1.2.4. Propietats Tèrmiques i Pes molecular

Els polímers, PHA-linoleic i PHA-L, obtinguts dels cultius amb àcid linoleic i oli de llinosa han estat analitzats per calorimetria diferencial per tal de determinar-ne la temperatura de transició vítria (T_g), la temperatura de fusió (T_m) i la temperatura de descomposició (T_d). Paral·lelament també s'ha determinat el pes molecular d'ambdós polímers per cromatografia de permeació de gel (GPC). En la Taula 4.7 es mostren els resultats obtinguts:

Taula 4.7 En la Taula es mostren els resultats obtinguts en les anàlisis de calorimetria diferencial (DSC) i els pes molecular dels polímers (GPC). On T_g, temperatura de transició vítria; T_m, temperatura de fusió; T_d, temperatura de descomposició; M_w, pes molecular en massa; M_n, pes molecular en nombre i PI, índex de polidispersitat.

PHA	Substrat	T _g (°C)	T _m (°C)	T _d (°C)	M _w (KDa)	M _n (KDa)	PI
PHA- linoleic	àcid linoleic (60%)	-57	nd	295	115	55	2,1
PHA-L	oli de llinosa	-51	nd	294	126	60	2,1

Ambdós polímers mostren temperatures de transició vítria molt baixes, -51 i -57 °C, per al PHA-L i el PHA-linoleic, respectivament. Aquests valors són característics per a mcl-PHA i fa que els polímers siguin pràcticament amorfs, és a dir, molt poc cristal·lins. El fet de tenir una T_g per sota de 0 °C fa que a temperatura ambient siguin materials tous i enganxosos i per tant que les seves aplicacions potencials siguin molt limitades (Ashby *et al.*, 1998). Els alguns casos s'ha pogut determinar la T_m que presenta valors entre 40-

60 °C. La longitud dels monòmers, és dir cadenes laterals llargues influeixen en les propietats polimèriques, disminuint el grau de cristal·linitat i fent que el material presenti un comportament viscoelàstic en un rang ampli de temperatures relativament baixes. D'altres factors que poden influir a decidir si un polímer serà cristal·lí o amorf és la diversitat monomèrica i la concentració de dobles enllaços en l'estructura del polímer (Ashby *et al.*, 1998). Casini *et al.* en el seu estudi del PHA obtingut a partir d'oli de llinosa hidrolitzat suggereixen que l'alta concentració de dobles enllaços en configuració *cis* dificulta la cristal·lització del polímer (Casini *et al.*, 1997). El PHA sintetitzat per *P. putida* KT2442 a partir d'aquest substrat és un polímer amorf amb una Tg de -57 °C i sense Tm. Tot i que aquest PHA presenta una distribució de pesos moleculars (Mn 70 KDa; Mw 170 KDa) molt semblant a la que s'obté per al polímer sintetitzat per *P. aeruginosa* 42A2 (Mn 60 KDa; Mw 126 KDa), l'índex de polidispersitat (PI) és notablement inferior en el cas de *P. aeruginosa* 42A2 (PI= 2,1) respecte als obtinguts en els polímers sintetitzats per *P. putida* KT2442 (PI=2,8). D'altra banda, Ashby *et al.* obté un PHA a partir d'oli de llinosa amb característiques molt semblants (Tg -50 °C i PI =2.0), però amb un pes molecular més petit (Mn 30 kDa i Mw 60 kDa) (Ashby *et al.*, 2000). En canvi quan *P. putida* KT2442 es fa créixer en una barreja d'àcids grassos enriquida en àcid linoleic (tall oil fatty acids, TOFA) s'obté un polímer amb una Tg de -60 °C i amb una índex polidispersitat de 2,3 (Van der Walle *et al.*, 1999). Val a dir que les diferències en la composició dels dos polímers no és suficient com per a veure canvis substancials en les característiques tèrmiques d'aquests PHAs. En canvi, el polímer que s'obté en cultius de *P. resinovorans* NRRL B-2649 emprant oli de coco, és un PHA amb més del 98 % de les cadenes laterals saturades que presenta una Tg de -40 °C i una Tm de 44 °C (Ashby *et al.*, 1998).

Ambdós PHAs, PHA-L i PHA-linoleic, presenten una temperatura de descomposició (Td) entre 294-298 °C, que d'acord amb els resultats de la termogravimetria, aquest pic endotèrmic està associat a un pèrdua del 75-80 % del pes total dels polímers (veure annex).

4.1.3. Estudi de la reacció d'entrecruament del PHA d'oli de llinosa

L'oli de llinosa està classificat com un oli secant. Els olis secants són barreges naturals de diferents triglicèrids d'àcids grassos. Els àcids grassos saturats més comuns en aquests tipus d'oli són: àcid làuric (C12:0), àcid mirístic (C14:0), àcid palmític

(C16:0) i àcid esteàric (C18:0) i els corresponents poliinsaturats de C18:0 (àcid oleic, C18:1; àcid linoleic, C18:2 i àcid linolènic C18:3). La capacitat d'assecar-se d'aquests olis és proporcional a la concentració d'àcids grassos insaturats que contenen. La presència dels dobles enllaços els permet reaccionar amb l'oxigen de l'aire i entre les cadenes de manera que formen una matriu polimèrica en forma de xarxa.

Des del s.XV, aquests tipus d'olis han estat estudiats i molt emprats, especialment l'oli de llinosa, que té la seva màxima aplicació en el camp de la pintura. Malgrat que els mecanismes d'enduriment de l'oli de llinosa han estat àmpliament estudiats, encara s'està lluny de ser entesos completament. A grans trets, es considera tot el procés com una reacció d'autooxidació seguida d'un procés de polimerització. Després d'un període d'inducció, degut a antioxidants naturals, aquest oli és capaç d'absorbir grans quantitats d'oxigen donant lloc a la formació de compostos tipus peròxid. El procés d'oxidació, tal i com s'ha esmentat anteriorment, està relacionat amb la presència de dobles enllaços, amb un primer pas de formació de compostos tipus hidroperòxid i/o fins i tot peròxids cíclics. El procés de polimerització consisteix bàsicament en la reacció intermolecular dels radicals que es formen de la descomposició dels grups peròxid (inestables) i la conseqüent formació d'estructures d'entrecreuament. Val a dir que malgrat que un film d'oli de llinosa s'asseca i endureix en pocs dies, el procés d'assecat i totes les reaccions que porta associades, continuen durant anys. A mesura que la reacció d'entrecreuament va avançant es va produint un enduriment del material. D'altra banda, aquest enduriment del material està regulat per la presència de cadenes no reactives que actuen com a "agents plastificants" (Lazzari, 1999).

Degut a l'alt percentatge de cadenes insaturades, el polímer que s'obté (PHA-L) a partir de l'oli de llinosa, és un polímer on les cadenes laterals conserven algunes de les insaturacions (de manera que trobem cadenes mono-, di- i fins i tot tri-insaturades) i aquest fet fa que s'obtingui un polímer elastomèric (gomós) i que es doni aquest tipus de reacció. La presència de dobles enllaços a les cadenes laterals afavoreix la reacció d'entrecreuament (crosslinking). Aquesta reacció es coneguda i emprada en alguns casos per a poder controlar les propietats dels polímers. Aquest fenomen d'entrecreuament de les cadenes confereix més uniformitat a la matriu polimèrica (Ashby *et al.*, 1998), això fa pensar que induint l'entrecreuament de les cadenes laterals es pot millorar les propietats del material. Fins ara s'han emprat tant mètodes químics (producció de peròxids, S-vulcanització) com físics (radiació amb feix d'electrons) per a aquesta finalitat. Els

mètodes químics tenen com a desavantatge la producció de productes secundaris i contaminants del sistema, no així, els mètodes fotoquímics (radiació UV, radiació- γ , irradiació amb feix d'electrons, etc.) que poden ser una alternativa més neta.

Per això es va decidir estudiar si aquest procés tenia lloc en el polímer obtingut a partir de l'oli de llinosa i si es podien millorar les propietats del polímer.

Es realitzaren diferents aproximacions: (1) procés natural i (2) tractament amb radiació ultravioleta ($\lambda=300$ nm).

Per a les dues aproximacions, s'ha fet un seguiment de l'evolució de la reacció d'entrecreuament en els polímers mitjançant diferents tècniques fisicoquímiques i estructurals. Els polímers obtinguts han estat caracteritzats per Ressonància Magnètica Nuclear (NMR), Cromatografia de gasos - Espectrometria de masses (CG-EM) i Espectroscòpia d'infraroig per Transformada de Fourier (FTIR). Els pesos moleculars han estat determinats per Cromatografia de Permeació de Gel (GPC), i les propietats tèrmiques han estat avaluades mitjançant l'anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) i la termogravimetria (TG).

4.1.3.1. Procés Natural

Els polímers orgànics són inestables en presència d'oxigen, calor i radiació ultravioleta. Aquest fenomen és conegut com a procés d'autooxidació o d'envelliment dels plàstics. El polímer es degrada generant radicals lliures sota la influència de la temperatura i/o de la llum ultravioleta. Aquests radicals, en presència d'oxigen, es transformen en espècies hidroperoxi molt reactives que acceleren el procés de degradació mitjançant la generació de més radicals.

Els polímers amb dobles enllaços a la cadena principal o especialment a les cadenes laterals són més susceptibles a l'acció de l'oxigen, la calor i/o la radiació ultravioleta com a conseqüència de l'elevada reactivitat dels dobles enllaços.

El procés d'assecat o de curat ("drying process") de l'oli de llinosa segueix el mecanisme d'oxidació dels hidrocarburs que està promogut pels àtoms d'hidrogen en posició dialílica a dos dobles enllaços. Així doncs, la formació d'hidroperòxids és relativament fàcil en molècules com l'àcid linoleic o l'àcid linolènic, els quals contenen un i dos grups metilens, respectivament, situats entremig de dos dobles enllaços no conjugats. El radical pentadienil amb configuració W pot reaccionar per ambdós extrems donant lloc a mescles de diferents espècies d'hidroperòxids, amb configuració conjugada

cis, *trans* i que acaben isomeritzant cap a la formació de productes *trans*, *trans* (Lazzari, 1999).

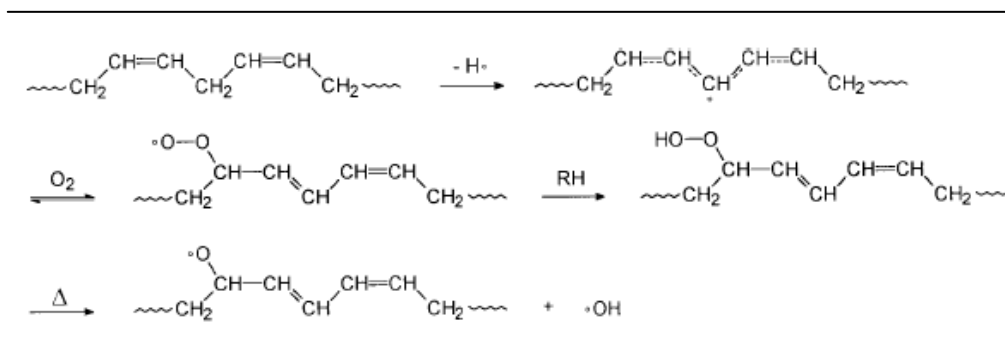


Figura 4.26 Esquema del mecanisme d'entrecreament d'acord amb Lazzari et al. (Lazzari, 1999). El radical pentadienil, amb configuració de W, reacciona amb l'oxigen donant lloc a espècies hidroperòxid.

De forma anàloga al descrit per l'oli de llinosa és d'esperar que el PHA produït a partir d'aquest substrat presenti un comportament semblant. En el cas del polímer el percentatge de cadenes insaturades és molt inferior i per tant la reacció d'autooxidació és donarà en menys extensió i probablement els canvis estructurals no seran tan evidents.

El polímer natiu, és a dir, el polímer purificat obtingut dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 amb oli de llinosa ha estat caracteritzat a l'apartat 4.1.2.

Després d'ésser caracteritzat es va deixar envellir una mostra d'aquest polímer exposant-lo a les condicions ambientals del laboratori, és a dir exposat a la llum solar i a temperatura ambient. Es prenen mostres al cap de 3 i 6 mesos i s'analitzen els polímers. Ambdues mostres del polímer, al cap de 3 i 6 mesos, són pràcticament insolubles en cloroform, i adquireixen textura de gel en contacte amb el solvent orgànic.

i. Espectroscòpia d'Infraroig (FTIR)

El polímer natiu (PHA-L) i el polímer que s'ha deixat assecat durant 6 mesos (PHA-crossl.) han estat analitzats per FTIR, per tal d'avaluar els possibles canvis estructurals com a conseqüència de la reacció d'entrecreament.

En la Figura 4.27 es poden apreciar els canvis estructurals deguts a la reacció dels dobles enllaços amb l'oxigen atmosfèric. La banda vibracional a 3008 cm^{-1} associada a la vibració de tensió $(\text{C-H})_{\text{C}=\text{C-H}}$ desapareix totalment i per contra s'observa la formació de noves bandes a la regió de $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ així com també un eixamplament de la banda

del carbonil a 1740 cm^{-1} degut a la formació de nous compostos tipus aldehids i cetones associats en els processos d'oxidació.

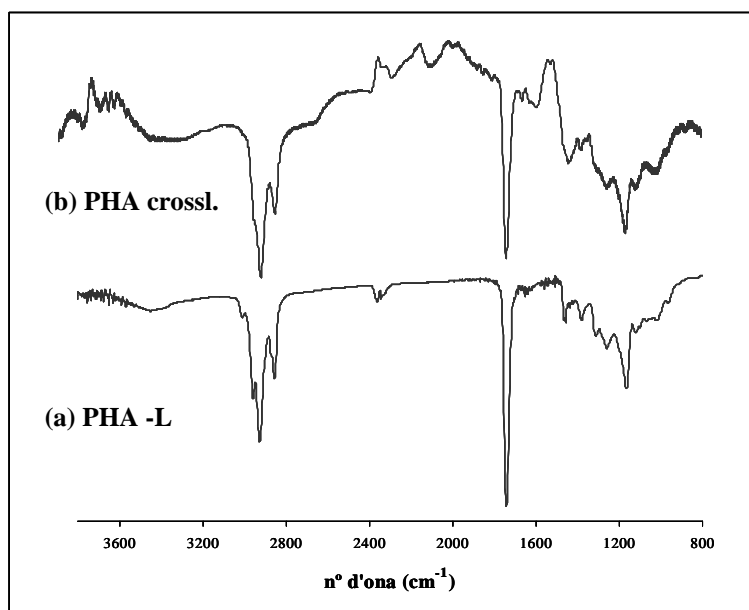


Figura 4.27 Espectres de FTIR del polímer natiu (PHA-L) i del polímer curat obtingut al cap de 6 mesos de procés natural (PHA-crossl.).

D'acord amb Lazzari *et al.*, l'aparició de bandes a 1630 cm^{-1} pot ser deguda a la formació de dobles enllaços conjugats. Per altra banda també es veu clarament l'aparició d'una banda ampla centrada a $3350\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ degut a vibració de tensió O-H dels grups hidroxils i dels grups hidroperoxi. Els canvis observats a nivell estructural són molt semblants als observats per Lazzari *et al.*, en el seu estudi d'estabilitat dels processos d'assecat i degradació de l'oli de llinosa (Lazzari, 1999).

ii. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

Tant el polímer natiu (PHA-L) com els polímers curats (PHA-crossl.) al llarg de 3 i 6 mesos han estat analitzats, també, per ressonància magnètica nuclear. En la Figura 4.28 es mostren els espectres de ^1H per a cadascun dels polímers. Degut a la complexitat de la regió associada als grups metil, s'ha cregut convenient ampliar-la per tal de veure en més detall els canvis que tenen lloc durant el transcurs de la reacció d'entrecruament.

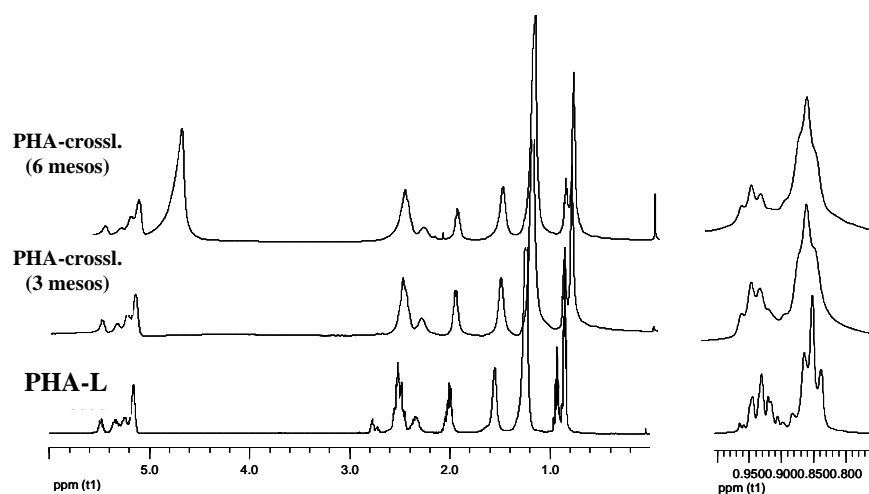


Figura 4.28 Espectres de ¹H-RMN del polímer natiu (PHA-L) i del polímer curat (PHA-crossl.) després de 3 i 6 mesos del procés de curat natural. Els espectres han estat enregistrats en CDCl₃ en l'equip Inova-500 (500 MHz) per el cas del PHA-L i en el Bruker DMX-500 (500 MHz) amb sonda HRMAS en el cas dels PHA-crossl (3 i 6 mesos). (a) espectres de ¹H complets; (b) ampliació de la regió compresa entre 0.85-0.95 ppm corresponent a la zona dels protons metílics (CH₃).

En la Figura 4.28 es veu clarament com a la senyal a 2,8 ppm corresponent als protons en posició dial·lílica desapareix completament a la vegada que també disminueix la intensitat i diversitat de les senyals de protons olefínics (5,3-5,5 ppm). Cal destacar que a mesura que augmenta el temps d'exposició a l'aire, la senyal dels metils en posició homoal·lílica també va disminuint, tal i com es pot observar en l'ampliació de l'espectre. Els resultats obtinguts indiquen que els monòmers poliinsaturats són més sensibles a la reacció d'entrecruament, degut a la presència de protons en posició dial·lílica, ja que al cap de tres mesos ha reaccionat completament. En canvi, els monòmers monoinsaturats, com el C_{8:1}, C_{10:1} i C_{12:1}, al cap de 6 mesos tot i que disminueixen no desapareixen del tot. En l'espectre de ¹H-RMN s'observa una senyal molt intensa i ampla a 4,9-5,0 ppm que no s'ha pogut identificar. Tot fa pensar que és una impuresa externa i que no pertany a l'estructura del polímer.

En l'espectre de ¹³C-RMN dels PHA-crossl., les senyals dels carbonis olefínics corresponents als monòmers poliinsaturats han desaparegut i només s'observen, tot i que molt febles, les senyals dels carbonis olefínics corresponents als monòmers monoinsaturats C_{8:1} i C_{10:1} que apareixen a 135,5, 132,3, 128,2 i 122,3 ppm (veure annex).

L'espectre d'heterocorrelació a un enllaç, HsQc, mostra correlació directe entre el pic de 2,8 ppm i els pics de 25,57 i 25,73 ppm. De la mateixa manera, existeix transferència directa de coherència entre el pic de 2,0 ppm i el pic de 22,96 ppm (veure annex). Les senyals d'aquests carbonis alifàtics, també desapareixen en els espectres dels polímers PHA-crossl. de 3 i 6 mesos.

iii. CG-EM: Composició monomèrica

A continuació es mostra la Taula 4.8 amb la composició monomèrica obtinguda de les anàlisis de CG-EM tant del polímer natiu (PHA-L) com del polímer després de 6 mesos de procés de curat.

Taula 4.8 Composició monomèrica del polímer natiu, sense tractament, (PHA-L) i del polímer entrecruat obtingut als 6 mesos del procés natural (PHA-crossl.).

monomer	PHA-L	PHA crossl.
C6:0	3.0	1.6
C8:1	3.8	4.2
C8:0	39.7	44.2
C9:0	//	0.7
C10:1	3.5	2.9
C10:0	25.8	33.1
C12:1	2.0	3.3
C12:2	4.0	//
C12:0	4.9	7.3
C14:1	0.9	2.1
C14:2	2.7	//
C14:3	9.3	0.0
C14:0	0.5	0.5
% saturats	73.9	87.5
% insaturats	26.1	12.5

Les anàlisis de CG-EM mostren que al cap de 6 mesos, el PHA-crossl. no conté cap dels monòmers poliinsaturats (C_{14:3}, C_{14:2} i C_{12:2}) i que el contingut dels monòmers monoinsaturats (C_{8:1}, C_{10:1} i C_{14:1}) ha disminuït considerablement. No obstant, s'ha de destacar el lleuger increment del monòmer C_{12:1}. Aquests resultats estan en concordança amb els resultats obtinguts de les anàlisis de RMN. Després de 6 mesos d'exposició a l'aire i en presència de llum natural, el contingut de monòmers insaturats del polímer ha disminuït del 26,1 % fins al 12,5 %.

iv. Propietats tèrmiques: DSC i TG

Els estudis tèrmics realitzats en el film del PHA natiu així com en els films que s'han deixat assecar de forma natural mostren un increment de la Tg (de -51 °C a -39.4 °C) a mesura que augmenta el temps de curat. Tal i com es pot observar a la Taula 4.9, en la mostra corresponent als 6 mesos de curat natural ha estat impossible determinar el valor de la Tg. Ashby *et al.* (2000) en un estudi realitzat d'un PHA obtingut també a partir d'oli de llinosa i passats 75 i 100 dies de curat natural determinaren que la Tg del polímer era de 31 °C i 44 °C, respectivament (Ashby *et al.*, 2000). El fet que en el nostre polímer passats 90 dies de curat natural, el valor de la Tg malgrat haver augmentat continua essent negatiu, podria ser degut a la composició monomèrica inicial del polímer. El polímer inicial d'Ashby *et al.* contenia més d'un 50% de cadenes insaturades, de les quals un 34% eren monòmers poliinsaturats (13% de C_{14:2} i 21% de C_{14:3}), conferint així una major reactivitat al polímer, de manera que la reacció d'entrecreuament de les cadenes es pugui donar en una major extensió.

Taula 4. 9 La Taula mostra els valors de temperatura de transició vítria (Tg(°C)), temperatura de fusió (Tm(°C)), T^a pic exotèrmic (Tpeak) i el valor de l'entalpia associada al pic exotèrmic (ΔH(J/g)) tant per al polímer natiu com per als polímers curats. On nd: no detectat

PHA	temps	Tg(°C)	Tm (°C)	T peak (°C)	ΔH (J/g)
PHA natiu	0	-51	nd	nd	nd
PHA curat natural	3 mesos	-39.4	nd	179.2	514.0
	6 mesos	nd	nd	174.5	137.2

En els termogrames (DSC) dels PHA-crossl., de 3 i 6 mesos, s'observa un pic exotèrmic entre 100-250 °C que d'acord amb la bibliografia pot estar associat als processos d'oxidació el polímer i així com també al procés de reticulació (Lazzari, 1999). Tal i com s'indica en la Taula 4.9, l'energia associada a aquest pic és molt alta (veure annex).

4.1.3.2. Tractament fotoquímic: Irradiació amb llum ultravioleta

Per tal d'accelerar el procés d'autooxidació, les mostres han estat exposades a radiació ultravioleta intensa en presència d'aire. Paral·lelament als mecanismes d'entrecreuament, l'exposició prolongada a la irradiació pot provocar la degradació parcial o total del polímer (Ashby *et al.*, 1998). Per tant, com a conseqüència d'aquest tractament és d'esperar que es donin de forma simultània reaccions d'entrecreuament i

reaccions de trencament oxidatiu de part de les cadenes polimèriques (Schmid *et al.*, 2006). En termes generals, l'efecte de la radiació sobre un material polimèric depèn de diferents variables com són el tipus de radiació, el tipus d'estructura del polímer a irradiar, el mecanisme de reacció i les propietats físico-químiques i mecàniques de la xarxa que es forma. Un altre paràmetre a tenir en compte és el gruix del film (Mallécol *et al.*, 2001). Mitjançant la irradiació del polímer es pot induir l'entrecruament de les cadenes laterals que contenen dobles enllaços i d'aquesta manera canviar les propietats mecàniques del polímer.

Així doncs, s'han exposat els films de PHA a radiació ultravioleta i s'han fet controls de la mostra a diferents temps de reacció. Els canvis en la composició monomèrica així com en les propietats tèrmiques dels films s'han estudiat mitjançant FTIR, RMN, CG-EM i DSC/TGA.

i. Espectroscòpia d'Infraroig (FTIR)

Els films de PHA ha estat irradiats amb llum ultravioleta durant 24 h, al llarg del procés s'ha anat prenent mostres a diferents temps de irradiació per tal de fer un seguiment dels canvis estructurals del polímer. Així doncs, s'han agafat mostres a les 0, 3, 6, 15 i 24 hores. En la Figura 4.29, es mostren els espectres d'infraroig obtinguts per a cada mostra.

A l'espectre de 0 hores que correspon al polímer natiu sense cap tractament ha estat descrit anteriorment a l'apartat 4.1.2.2. Com a trets generals destacar la banda de tensió a 3018 cm^{-1} que confirma l'existència dels dobles enllaços i serà orientativa de l'evolució de la reacció d'entrecruament. A la zona de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, es troben les bandes de vibració de tensió (C-H) dels grups CH_2 i CH_3 i finalment la banda corresponent a la vibració de tensió (C-O) del grup carbonil a 1742 cm^{-1} . Tal i com es pot observar a la Figura 4.29, els canvis estructurals al llarg del tractament amb radiació UV són molt semblants als obtinguts en el procés de curat natural. Així doncs, la radiació UV ha accelerat el procés de curat del polímer.

A mesura que augmenta el temps de irradiació del polímer s'observa com la banda corresponent a la vibració de tensió H-C (C=C) va desapareixent i a partir de les 15 h de tractament ja no s'observa. En canvi, la banda associada a la vibració de tensió del C-O del carbonil mostra un eixamplament com a conseqüència de la formació de productes oxigenats derivats de la descomposició dels grups hidroperòxid formats en el transcurs de la reacció d'entrecruament (Figura 4.29).

La formació de grups hidroxilats així com la formació de grups hidroperòxid també es confirma amb la presència de la banda ampla que apareix al voltant de 3400 cm^{-1} . A la regió de 1633 cm^{-1} també apareix la banda corresponent a la formació de dobles enllaços conjugats tot i que no s'observa clarament degut a l'eixamplament de la banda del carbonil.

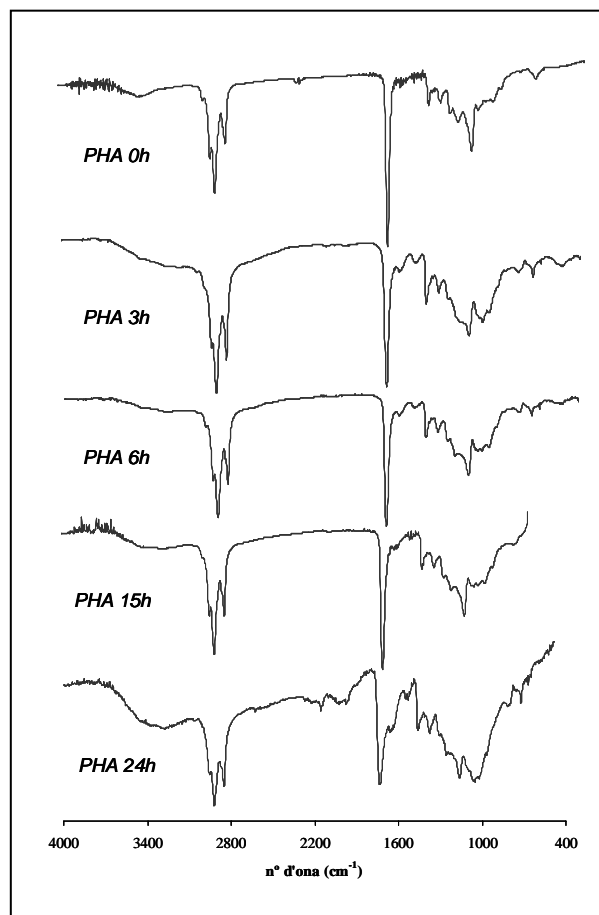


Figura 4.29. Espectres de FTIR a diferents temps (0,3,6,15 i 24 h) d'exposició a la radiació UV.

Comparant els resultats obtinguts en el procés d'autooxidació natural, sembla ser que quan el procés és induït amb radiació, els processos oxidatius són més importants suggerint el trencament parcial de la xarxa 3D formada (procés de reticulació) donant lloc a fragment de radicals alquil que poden continuar reaccionant.

D'acord amb Lazzari *et al.* (1999) la degradació per fotooxidació de l'oli de llinosa es pot considerar com la continuació del procés d'enduriment de l'oli, és a dir, de la formació de la xarxa 3D (Lazzari, 1999). La primera fase de l'oxidació té lloc amb la formació d'espècies hidroperoxi (Figura 4.30) en determinades posicions de la cadena alquímica seguida de la seva descomposició, originant-se radicals alcoxi precursors de la reacció d'entrecruament. Després del procés de curat, la xarxa presenta una certa

estabilitat i necessita de temps d'envelliment relativament llargs per a degradar-se mitjançant la progressiva oxidació de les cadenes alquíliques.

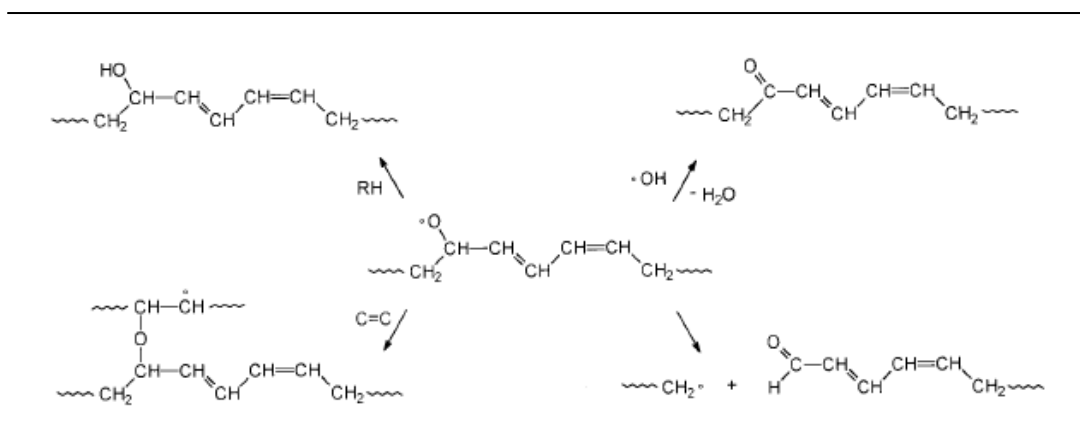


Figura 4.30 Esquema de la descomposició dels grups hidroperòxid formats durant la reacció d'entrecruament. Tal i com s'observa en la Figura, la descomposició d'aquests grups dona lloc a d'altres espècies oxigenades (nous grups carbonil i hidroxil) que contribueixen a l'eixamplament de la banda corresponent a la vibració de tensió del grup carbonil C-O (1742 cm^{-1}).

Així doncs, sembla ser que el temps d'exposició a la radiació ultravioleta o bé la intensitat de la mateixa, no només han accelerat el procés d'entrecruament sinó que també han accelerat el procés de degradació parcial del polímer entrecruat (trencaments oxidatius), com així ho confirma la formació d'altres espècies oxigenades (amb grups carbonil, -aldehids i cetones-, o grups hidroxil).

ii. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN).

Paral·lelament a l'estudi realitzat per FTIR, també s'ha seguit l'evolució de la reacció per RMN. A mesura que el polímer s'anava entrecruant ha estat necessari treballar amb la sonda HRMAS, de manera que els espectres per a les mostres de 15 i 24 hores, degut a la seva poca solubilitat, s'han analitzat emprant la sonda d'HRMAS.

A continuació, la Figura 4.31 mostra els espectres de protó del PHA natiu i de les diferents mostres irradiades.

L'estructura del polímer natiu (PHA 0h-UV) ha estat descrita anteriorment a l'apartat 4.1.2.2. Tal i com es pot comprovar a la Figura 4.31, a partir de les 3 hores de irradiació s'observa l'aparició de diferents pics entre 3-4.5 ppm, que possiblement (tot i que no s'ha pogut verificar) corresponen a la formació de grups hidroperòxid i hidroxil com a conseqüència de l'oxidació del polímer. El fet que la intensitat d'aquestes senyals

vagi disminuint a mesura que augmenta el temps d'irradiació confirmaria la nostra hipòtesi. Tal i com s'ha discutit anteriorment, l'oxidació del polímer passa per la generació d'espècies radicals (tipus hidroperoxi o alcoxi) que són molt inestables i que amb el temps acaben reaccionant amb d'altres espècies generant noves estructures.

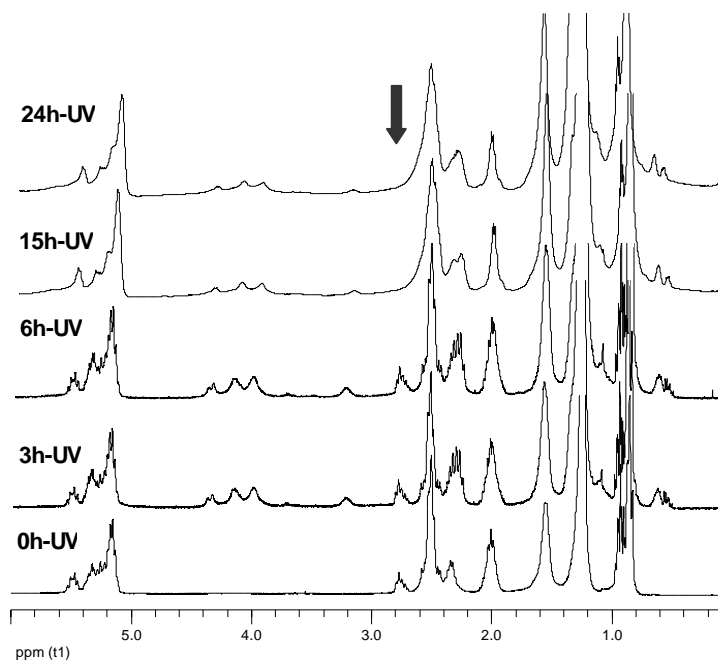


Figura 4.31 Espectes de ^1H -RMN per a les diferents mostres de PHA irradiades (UV). Les mostres de 0, 3 i 6 hores han estat enregistrades amb el Varian Gemini-300 (300 MHz). Les mostres de 15 i 24 hores han estat enregistrades amb la sonda HRMAS en el Bruker Innova-500 (500MHz).

No és fins a les 15 hores d'irradiació que es poden apreciar els canvis més significatius, com és la desaparició del pic a 2,8 ppm corresponent als metilens en posició dialfílica, que tal i com ja s'ha comentat anteriorment és la posició més reactiva de les cadenes i per on comencen tots els processos d'oxidació i d'entrecreuament. Malgrat que a la zona de protons olefínics (5,2-5,7 ppm) s'observen canvis, no desapareixen del tot, tal i com ho confirma la senyal de 2,0 ppm corresponent als protons veïns a dobles enllaços. Així doncs, també en aquest cas es confirma que no totes les cadenes insaturades participen directament en la reacció d'entrecreuament. En la Figura 4.32, es mostra una ampliació de la regió 0,80-0,95 ppm corresponent als protons metílics.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, es pot distingir entre dos tipus de protons metílics: (1) la senyal a 0,90-0,95 ppm correspon als protons metílics que estan en posició β respecte un doble enllaç, i per tant surten a camps més baixos.

La formació d'aquests monòmers es deguda a l'alt contingut d'àcid linolènic del substrat i (2) els protons metílics corresponen a les cadenes totalment saturades o aquelles cadenes insaturades on el doble enllaç està suficientment lluny del grup metil terminal com per no afectar al desplaçament químic dels seus protons, que corresponen a la senyal que apareix a 0,80-0,85 ppm.

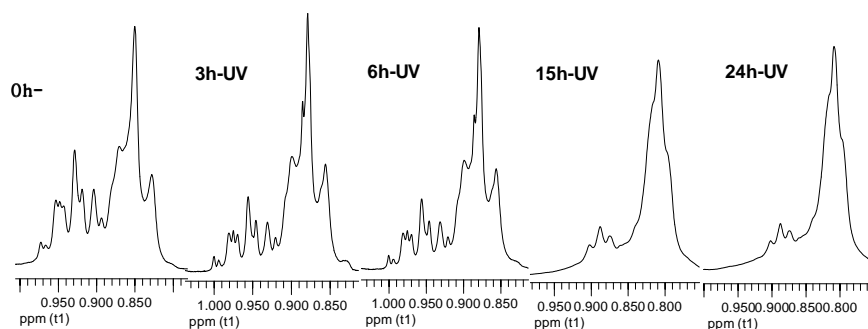


Figura 4.32. Ampliació de la regió de l'espectre compresa entre 0.80-0.95 ppm que coorespon a la regió dels protons metílics (-CH₃).

Tal i com es pot veure la intensitat relativa entre les dues senyals va canviant a mesura que augmenta el temps d'irradiació, és a dir, a mesura que té lloc la reacció d'oxidació i la de reticulació del polímer. Fent una relació de les integracions de les dues senyals dels grups metils, es troba que en el polímer natiu, la senyal dels protons metílics en posició homoal·lílica representa un 37 % dels metils totals mentre que després de ser irradiat durant 24 h amb llum ultravioleta, aquesta senyal disminueix fins a representar tan sols un 17 %.

L'espectre de ¹³C-NMR del polímer natiu confirma la presència de diferents monòmers insaturats (mono- i poliinsaturats) tal i com ho indiquen les múltiples senyals a la zona olefínica (120-140 ppm). De forma anàloga, a l' observat en els espectres de ¹H, a mesura que la reacció de crosslinking té lloc, part de les senyals corresponents als C olefínics desapareixen o bé disminueixen. Finalment, a les 24h de irradiació UV només s'observen quatre senyals de carbonis olefínics: 135,43, 122,35, 132,31 i 128,2 ppm. Aquestes senyals corresponen als monòmers monoinsaturats C_{8:1} i C_{10:1}.

Tal i com es pot observar a la Figura 4.33, en l'espectre de ¹³C, les senyals que apareixen 22,96, 25,57 i 25,73 ppm també estan relacionades amb la reacció de crosslinking.

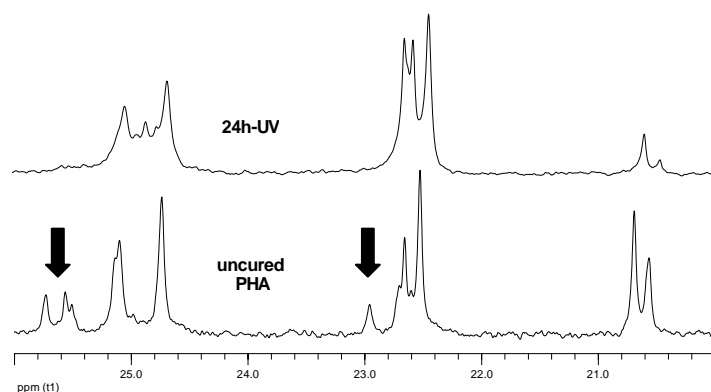


Figura 4.33 Regió alifàtica dels espectres de ^{13}C del polímer natiu i del polímer irradiat (UV) durant 24 hores. Indicat amb fletxes, es mostren les senyals de C que desapareixen durant el transcurs de la reacció d'entrecruament.

D'acord amb les correlacions H-C obtingudes de l'espectre d'heterocorrelació, HsQC, els pics de 25,57 i 25,73 ppm corresponents a l'espectre de ^{13}C mostren correlació a un enllaç amb la senyal dels protons dial·lílics de 2,8 ppm. De la mateixa manera, la senyal de ^{13}C a 22,96 ppm correlaciona amb la senyal de protons de 2,0 ppm.

Aquest fet sembla indicar, un cop més, que en la reacció d'entrecruament només hi participen part dels monòmers insaturats del polímer, concretament els poliinsaturats.

iii. *CG-EM: Composició monomèrica*

Tal i com es pot observar a la Taula 4.10, després d'irradiar durant 24 h amb llum UV el films de PHA, el polímer només conté un 8.5 % de monòmers insaturats. D'acord amb el mecanisme d'oxidació d'àcids grassos descrit anteriorment, sembla ser que els monòmers responsables del procés d'autooxidació (reticulació i trencament oxidatiu) del polímer són els monòmer $\text{C}_{14:3}$, $\text{C}_{14:2}$ i $\text{C}_{12:2}$. Tal i com es mostra en la Taula 4.10 després de 24 h de irradiació, el percentatge d'aquests monòmers és molt baix (0.1 % $\text{C}_{14:3}$; 0.2 % $\text{C}_{12:2}$) o inexistent com en el cas del $\text{C}_{14:2}$. En general, el percentatge dels monòmers insaturats presents en la composició del polímer irradiat ha disminuït, en canvi, el percentatge dels monòmers saturats, especialment els de cadena curta ($\text{C}_{8:0}$ i $\text{C}_{10:0}$) ha augmentat considerablement, suggerint que a temps de irradiació UV llargs es comença a degradar el polímer com a conseqüència de trencaments oxidatius de les cadenes, com així ho sembla indicar la presència dels monòmers $\text{C}_{6:0}$ i $\text{C}_{9:0}$ (4.1 % i 0.6 %, respectivament) en la composició del PHA-uv.

Taula 4.10 Composició monomèrica (%) obtinguda de les anàlisis de CG-EM del polímer natiu (PHA-L) i dels polímers irradiats (PHA-uv) on nd: monòmer no detectat.

Monomer (%)	PHA natiu (PHA-L)	PHA irradiat UV (PHA-uv)			
		3 h	6 h	15 h	24h
C6:0	0.4	3.1	1.7	3.3	4.1
C8:0	33.7	36.3	41.7	49.6	51.0
C8:1	5.6	4.3	4.6	3.8	3.2
C9:0	nd	nd	nd	nd	0.6
C10:0	24.3	27.1	29.1	29.2	28.4
C10:1	7.0	3.8	3.5	1.7	1.5
C12:0	4.9	6.1	5.7	5.7	6.4
C12:1	1.4	3.1	3.1	1.4	1.4
C12:2	4.8	3.4	1.2	0.7	0.2
C14:0	0.4	1.0	2.7	0.6	0.9
C14:1	6.4	4.8	4.0	3.0	2.2
C14:2	2.8	2.1	1.0	0.5	nd
C14:3	8.3	5.0	1.8	0.4	0.1
monomers saturats (%)	63.8	73.4	80.9	88.5	91.5
monomers insaturats (%)	36.2	26.6	19.1	11.5	8.5

Els canvis observats en la composició del polímer irradiat amb llum UV, han donat lloc a un polímer de composició més regular i amb menys diversitat monomèrica. Aquest fet influirà notablement en les característiques físico-químiques del polímer, així com també en les seves propietats tèrmiques.

iv. Propietats tèrmiques: DSC i TGA

La Taula 4.11 mostra els resultats obtinguts en els estudis calorimètrics del polímer natiu així com també del polímer irradiat. No és fins a les 6 hores de irradiació UV que es detecta la temperatura de fusió (T_m) del polímer. El fet que la T_m no s'hagi pogut determinar ni en el polímer natiu ni al cap de 3 hores de irradiació, podria ésser degut a que el polímer PHA-L és un polímer amorf, amb cadenes laterals llargues i amb una gran diversitat monomèrica. Aquests factors fan que ni les cadenes laterals ni la cadena central del polímer no puguin cristal·litzar i per tant no es pugui determinar-se la seva T_m . Tal i com s'ha vist en les anàlisis de CG-EM, a mesura que augmenta el temps d'exposició a la radiació UV, la part del polímer que no reticula és més regular en quan a les longituds de les cadenes laterals. Aquest fet podria facilitar la cristal·lització parcial d'algunes unitats

monomèriques, tal i com suggereix el pic endotèrmic associat a un procés de fusió que es detecta entre els 45-50 °C (Taula 4.11).

Taula 4.11 DSC. La Taula mostra els valors de temperatura de transició vítria (T_g (°C)), temperatura de fusió (T_m (°C)), T^a pic exotèrmic (T_{peak}) i el valor de l'entalpia associada al pic exotèrmic (ΔH (J/g)) tant per al polímer natiu com per als polímers irradiats (UV). nd; no detectat

PHA	temps	T_g (°C)	T_m (°C)	T_{peak} (°C)	ΔH (J/g)
PHA natiu	0	-51	nd	nd	nd
PHA irradiat UV	3 h	-49,8	nd	164,3	38,6
	6 h	-47,8	50	171,3	167,4
	15 h	-32,0	50	168,0	231,2
	24 h	-31,9	49,1	168,0	248,4

La temperatura de transició vítria (T_g) experimenta un increment de -51 °C a -31.9 °C. De totes maneres, no és fins a les 15 h de irradiació que no s'observa un canvi bruscat en el valor de la T_g , indicant el començament del procés d'entrecreuament. Tal i com es pot veure en la Figura 4.34 entre 100-250 °C, en els termogrames del polímer irradiat es detecta un pic exotèrmic. Aquest pic està associat als processos d'oxidació del polímer i així com també al procés d'entrecreuament (Lazzari, 1999).

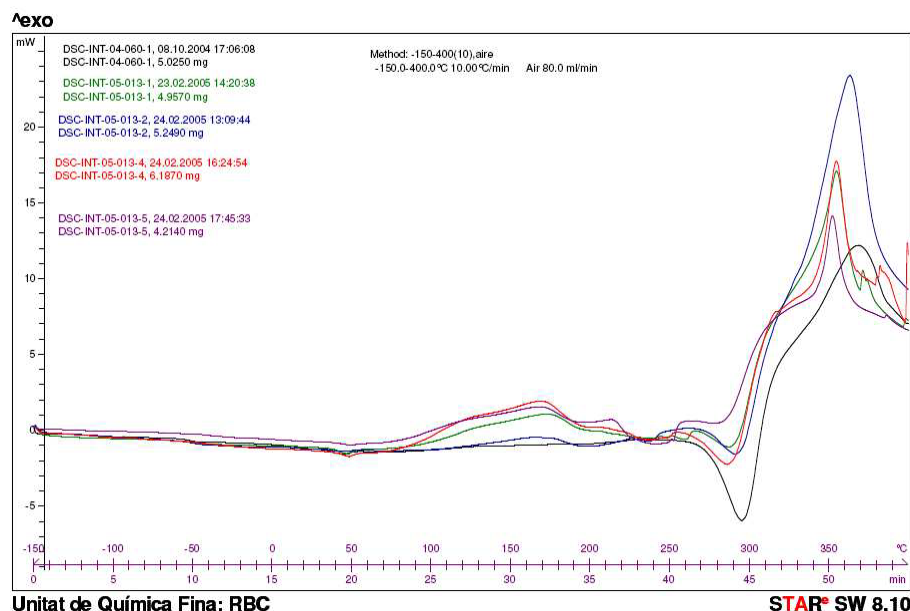


Figura 4.34. Termogrames obtinguts per al polímer exposat a diferents temps d'irradiació UV. Els diferents temps d'irradiació estan indicats en diferents colors. Així doncs: 0h-UV, color negre; 3h-UV, color blau; 6h-UV, color verd; 15h-UV, color vermell i 24h-UV, color lila.

Estudis preliminars de difracció de raigs X han confirmat que tant el polímer natiu com el polímer entrecreuat són amorfs (veure annex). Malgrat aquests resultats, les anàlisis calorimètriques mostren un pic de fusió entre 45-50 °C. D'acord amb Schmid *et al.*, el procés d'autooxidació d'aquests tipus de polímers mostra una dependència clara amb el nombre de cadenes insaturades ja que ha d'existir un nombre mínim d'unitats monomèriques insaturades per a que la reacció d'entrecreuament tingui lloc (Schmid *et al.*, 2006). Una de les hipòtesis en les que s'està treballant és en el fet que com a conseqüència de la radiació, la reticulació del polímer sigui parcial, de tal manera que malgrat el temps de radiació, hi hagi una part del polímer entrecreuada i insoluble en dissolvents orgànics i una altra part del polímer que no hagi reaccionat i que continua essent soluble en solvents orgànics.

En una primera aproximació, es van rentar els films del polímer irradiat durant 24h amb cloroform. Es va filtrar la suspensió del polímer per tal de separar la part soluble en cloroform i la part insoluble (film rentat). Ambdues fraccions es van analitzar per DSC i es va observar que tenien comportament tèrmics diferents (veure Figura 4.35).

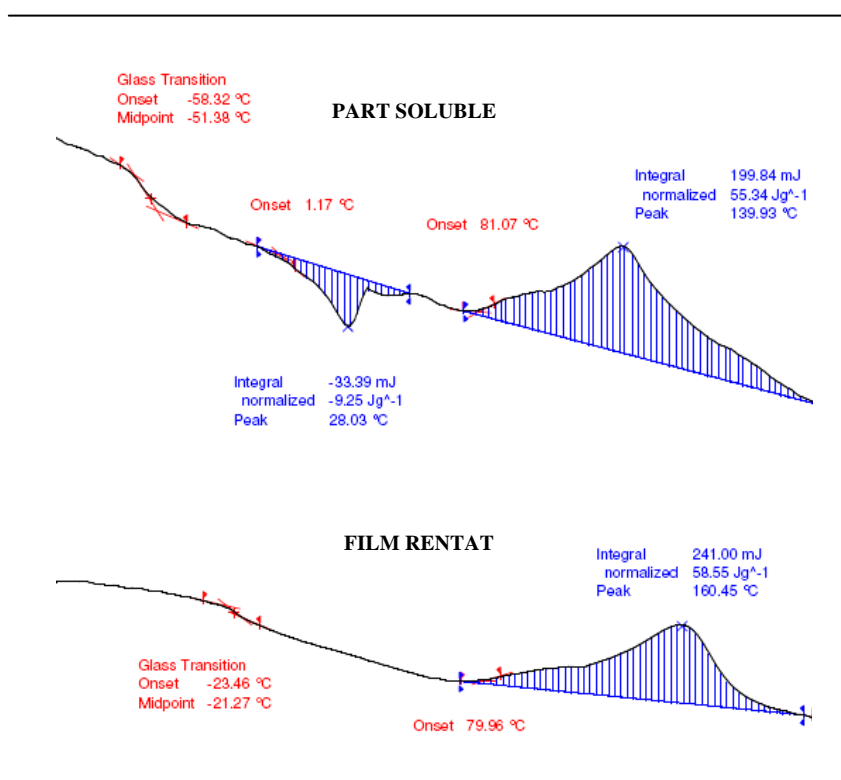


Figura 4.35 DSC. Termogrames de la fracció soluble en cloroform i de la fracció insoluble (film rentat) dels films de PHA-L irradiats durant 24 h. Ambdós termogrames han estat enregistrats en atmosfera de nitrogen (50 mL/min)

El film rentat (part insoluble), que correspon al material entrecreuat té una temperatura de transició vítria de $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. En canvi la part soluble té una transició vítria semblant a la del polímer natiu (polímer sense tractament), T_g de $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el termograma de la part soluble també s'observa un pic de fusió, T_m $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Per tal de verificar, que efectivament aquest pic endotèrmic correspon a un procés de fusió, s'ha repetit l'anàlisi de la mostra soluble escalfant a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguit d'un refredament a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ i finalment s'ha tornat a escalfar la mostra a $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'anàlisi ha verificat el procés de fusió-cristal·lització-fusió (veure annex). En ambdós termogrames apareix el pic exotèrmic entre $80\text{-}200\text{ }^{\circ}\text{C}$, que en principi està associat al procés d'entrecreuament i d'oxidació del polímer. De totes maneres, l'energia associada a aquests processos és prou alta per a suggerir que l'existència simultània de diferents processos.

Actualment es continua treballant en aquesta línia de recerca, ja que les anàlisis de RMN suggereixen que el polímer de la part soluble està compost per unitat monomèriques més curtes a la del polímer natiu i estudis preliminars de microscòpia de força atòmica (AFM) d'aquest material suggereixen la formació d'una estructura esferulítica quan aquest material és sotmès a tractament tèrmic. Aquest comportament ha estat descrit anteriorment per a polihidroxicanoats de cadena curta (scl-PHA) com el polihidroxibutirat (PHB) o alguns dels seus copolímers (PHB-co-PHV i PHB-co-PHHex), tot ells polímers cristal·lins o bé amb un cert grau de cristal·linitat (Tanaka *et al.*, 2005) (Xu *et al.*, 2003). De confirmar-se aquesta hipòtesis, implicaria que quan el PHA-L (polímer amorf) és tractat amb radiació UV genera dos nous materials: un nou polímer entrecreuat amb textura de goma, en principi amb millors propietats mecàniques i un segon nou polímer amb textura viscosa i amb un cert grau de cristal·linitat.

4.1.4. Estudi microscòpic del bacteri i del PHA

Les tècniques microscòpiques, tals com la microscòpia electrònica de rastreig (SEM) i la microscòpia electrònica de transmissió (TEM), han estat emprades tradicionalment com a eines per a l'estudi i la comprensió de les cèl·lules i la seva organització cel·lular. El desenvolupament de la microscòpia de força atòmica (AFM) a la dècada dels anys 80s ha revolucionat el camp de la microscòpia ja que permet l'obtenció d'imatges de la superfície cel·lular, de macromolècules i d'altres materials a escala subnanomètrica (Binning *et al.*, 1986).

Una de les grans avantatges de l'AFM és que contràriament al que passa en d'altres tècniques microscòpiques, com per exemple SEM i TEM, no és necessari ni la fixació química de la mostra ni la seva tinció, és a dir l'AFM permet l'observació de la mostra sense haver d'ésser manipulada i per tant en condicions molt semblants al seu estat natural, ja sigui a l'aire com en medi aquós. L'AFM és una eina molt important en l'estudi de la superfície cel·lular dels bacteris (Ahimou *et al.*, 2002), ja que proporciona imatges d'alta resolució no només dels bacteris hidratats sinó que també permet l'estudi dels subproductes polimèrics que sovint els envolten (p.e: EPS). A més a més, aquest tipus de microscòpia permet obtenir informació de les estructures externes i de les textures de l'embolcall del bacteri, així com també de l'elasticitat dels biomaterials de superfície, de la càrrega superficial i de la hidrofobicitat amb una resolució sub-nanomètrica (El Kirat *et al.*, 2005).

Des de que les inclusions lipídiques de PHA foren descrites com a reservoris de materials lipídics amorfs i hidrofòbics acumulats en el citoplasma dels bacteris, la presència d'una membrana externa o monocapa lipídica com a punt d'unió de proteïnes ha estat estudiada extensament. La microscòpia de força atòmica ha permès analitzar en detall l'embolcall de les inclusions de PHA demostrant la presència d'estructures globulars relacionades amb els processos de síntesi i de despolimerització d'aquestes reservoris lipídics (Dennis, 2003), (Sudesh, 2002). Aquestes observacions estan en concordança amb Steinbüchel *et al.*, que demostraran l'existència d'enzims que participen directament en el metabolisme dels PHA (Steinbüchel *et al.*, 1995).

Malgrat que l'AFM ha estat emprada en l'estudi dels polihidroxialcanoats, la recerca ha estat centrada en l'estudi de les inclusions de PHAs de cadena curta (PHB i PHB-co-PHV) (Dennis, 2003), (Sudesh, 2002) o bé en els processos de biodegradació d'aquests polièsters (Numata *et al.*, 2005), (Rossini *et al.*, 2001). Així doncs en aquest apartat es pretén mostrar en imatges com són els PHAs, des de la formació de les inclusions lipídiques dins del bacteri fins al PHA com a biomaterial. Per aquest estudi s'ha utilitzat el PHA-L, obtingut a partir de l'oli de llinosa. A més a més, també es mostren imatges del polímer entrecreuat que prèviament ha estat analitzat químicament a l'apartat 4.1.3.

Quan *P. aeruginosa* 42A2 es fa créixer en medi mineral mínim i emprant oli de llinosa com a substrat, en les condicions òptimes de cultiu acumula fins al 50 % (p/p) de PHA en el seu citoplasma. L'acumulació de PHA en forma d'inclusions discretes ha estat demostrada extensament, tal i com s'ha mostrat en nombroses micrografies de TEM

(Steinbüchel et al., 1995), (Curley et al., 1996), (Alvarez et al., 1996; Alvarez et al., 1997; Song et al., 1998; Matsumoto, 2002; Sudesh, 2002; Dennis, 2003).

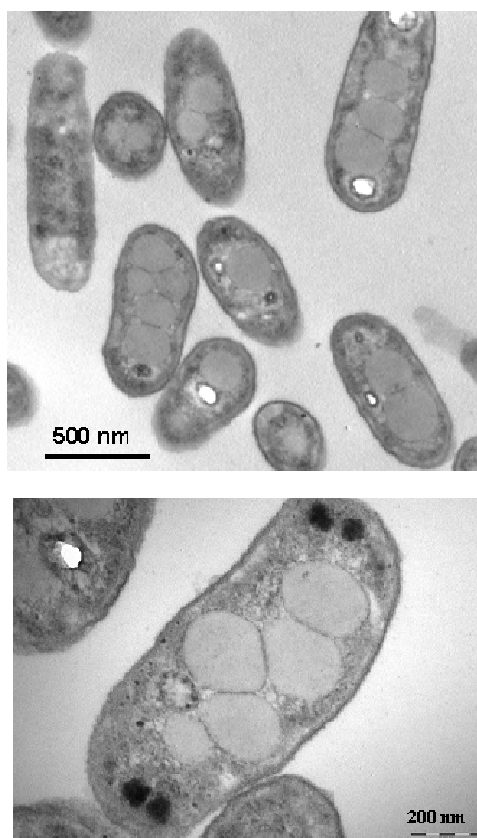


Figura 4.36. Micrografies de TEM de *P. aeruginosa* 42A2 quan es fa créixer en medi MM1 i emprant oli de llinosa com a substrat.

En la Figura 4.36 es mostra les micrografies obtingudes per microscòpia electrònica de transmissió (TEM) de *P. aeruginosa* 42A2 quan es fa créixer en presència d'oli de llinosa.

Les inclusions de PHA apareixen en forma de grànuls discrets de color grisós. En les micrografies també s'observa la presència d'un grànul més fosc (més densos al pas dels electrons) i de mida més petita que d'acord amb els resultats de microanàlisi de raigs x són grànuls de polifosfat (Rodríguez, 2006).

Aquest tipus de microscòpia ha estat tradicionalment emprada per a l'estudi de la ultraestructura tant de les cèl·lules com del seu embolcall, i actualment continua essent la única tècnica microscòpica que permet la visualització de l'organització citoplasmàtica (Ubbink and Schär-Zammaretti, 2005). No obstant, les cèl·lules necessiten ésser fixades i

tenyides amb reactius químics per posteriorment ser deshidratades, incloses en una resina i finalment ultramicrotomades. Tot aquest procés comporta una manipulació de la mostra.

Per tal d'observar el bacteri en unes condicions més properes al seu estat natural es va utilitzar la microscòpia de força atòmica (AFM). La Figura 4.37 mostra les micrografies d'AFM de *P. aeruginosa* 42A2 amb i sense inclusions de PHA.

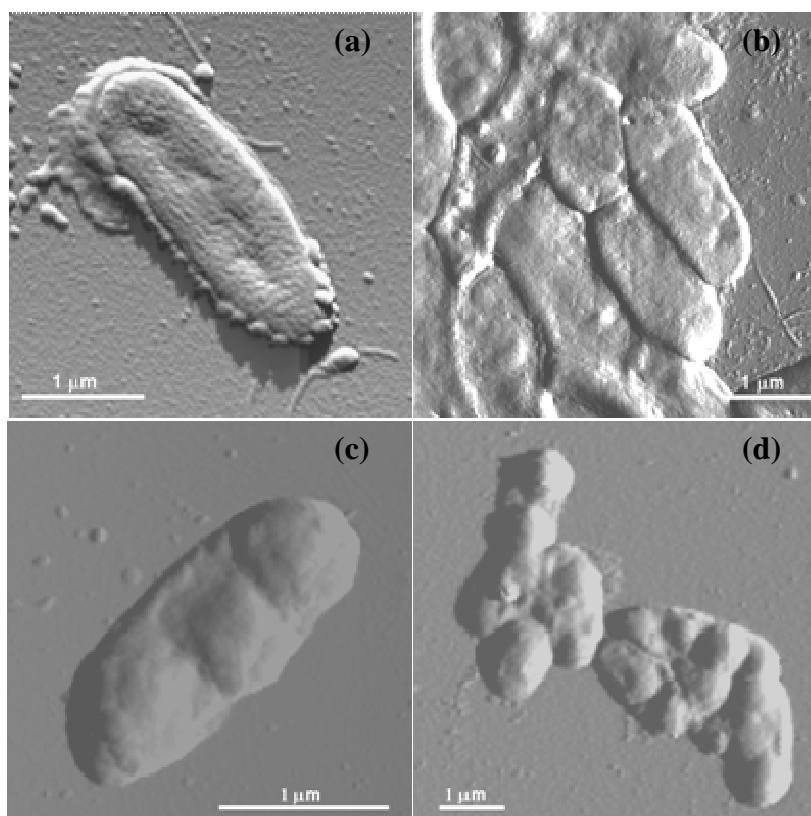


Figura 4.37. Imatges d'AFM de *P. aeruginosa* 42A2 enregistrades a l'aire en mode de tapping. En les imatges es mostra el bacteri aïllat i formant un clúster: (a) i (b) bacteris sense PHA; (c) i (d) bacteris amb PHA.

En general, els bacteris tendeixen a formar capes o clústers (Bolshakova *et al.*, 2004) tal i com es pot observar en les micrografies (Figura 4.37(b) i Figura 4.37(d)). En la Figura 4.37 (a i c) també es mostra un bacteri aïllat amb i sense inclusions de PHA. D'acord amb Bolshakova *et al.*, (2004), la mida dels bacteris gram negatiu depèn de les condicions d'anàlisi, si es treballa en medi líquid o bé a l'aire, essent més petits quan es treballa a l'aire (Bolshakova *et al.*, 2004). Malgrat tot, al treballar a l'aire, permet obtenir més detalls de la superfície cel·lular, ja que tal i com s'ha demostrat l'AFM és especialment sensible a la diferència de textures en les superfícies (Nuñez *et al.*, 2005). En el nostre

cas, aquestes diferències es van observar només en les cèl·lules cultivades en TSB i sense inclusions de PHA. En la Figura 4.38(a), es poden observar aquestes diferències en la superfície del bacteri, així com també la formació de vesícules al voltant de la membrana externa.

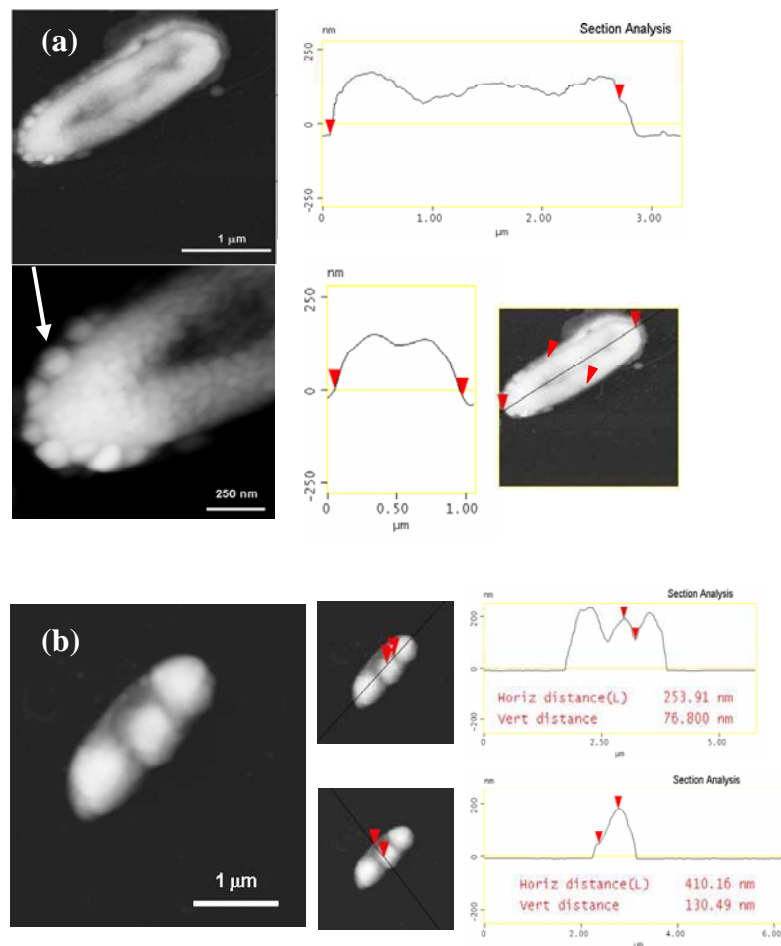


Figura 4.38 Imatges d'AFM en mode tapping i els corresponents perfils topogràfics de *P. aeruginosa* 42A2. (a) en medi TSB, cèl·lules sense inclusions de PHA. Al voltant del bacteri s'observa formació de vesícules (fletxa blanca) i material viscos (exopolisacàrid). (b) cèl·lules amb inclusions de PHA en medi mínim mineral (MM1) i oli de llinosa com a substrat.

En la Figura 4.38(b) es mostren una imatge d'AFM (fase) on es poden apreciar clarament les inclusions de PHA dins del bacteri. El color blanc de les inclusions indica un canvi en la textura de la superfície del bacteri, essent la superfície més dura en les zones on hi ha localitzades les inclusions de PHA. Tal i com mostra el perfil topogràfic,

les inclusions de PHA són prou grans com per a modificar considerablement la morfologia i topografia de la superfície cel·lular.

Un cop el PHA ha estat extret de la cèl·lula i purificat, s'ha preparat un dissolució del polímer (0.01 g/L) i s'han dipositat 20 μL sobre un suport de vidre. S'ha deixat assecar durant 24h a 30°C per a la formació del film i s'ha observat en el microscopi d'AFM.

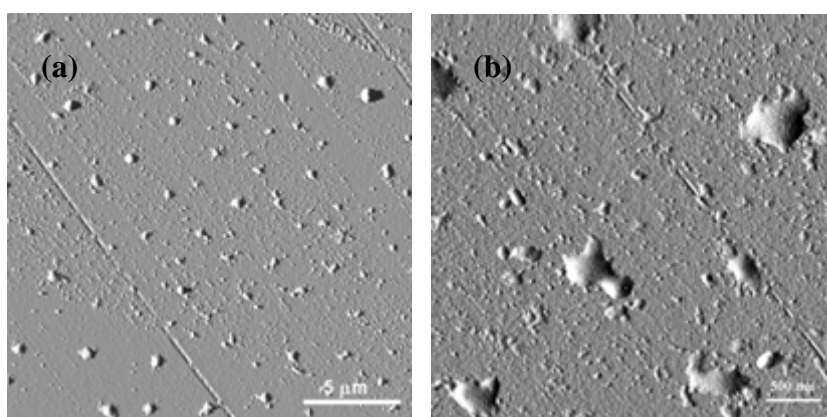


Figura 4.39 Imatge d'AFM d'amplitud (mode tapping) del PHA purificat sintetitzat per *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrat oli de llinosa: (a) imatge de 20 μm x 20 μm , on s'observa que la mostra no es disposa de forma homogènia, a més de la formació del film es formen grumolls de material; (b) imatge ampliada (4 μm x 4 μm).

La majoria d'estudis d'AFM relacionats amb els polihidroxicanoats estan enfocats principalment en la descripció de la morfologia dels grànuls de PHA i de la distribució dels enzims que els envolten (Dennis, 2003), (Stuart *et al.*, 1995), (Sudesh, 2002), la formació *in vitro* dels grànuls (Hiraishi *et al.*, 2005) o en la degradació enzimàtica del PHA (Numata *et al.*, 2005), (Rossini *et al.*, 2001). En canvi, existeixen pocs estudis del PHA com a biomaterial.

Tal i com es mostra a la Figura 4.39, sembla ser que els films del PHA-L no són homogenis i que el polímer tendeix a acumular-se al llarg del film en forma de petits dipòsits de material. Renard *et al.*, (2004) descriuen la formació d'un film homogeni d'àcid polihidroxiocetanoic (PHO) (Renard, 2004). Possiblement aquesta diferència en l'homogeneïtat dels films és conseqüència de la composició monomèrica dels polímers emprats, ja que el PHO és un polímer semicristal·lí amb un temperatura de fusió de 57 °C. En canvi el PHA-L, PHA obtingut de l'oli de llinosa, és un polímer amorf i no s'ha

detectat cap Tm. Es va intentar obtenir imatges per microscòpia electrònica de transmissió (TEM), però degut a la naturalesa viscoelàstica del PHA-L, tot i que es va poder incloure el material dins la resina, no va ser possible fer el talls ultrafins amb el ultramicrotòtom, ja que la resina es trencava.

En l'apartat 4.1.3.2 s'ha estudiat la reacció d'entrecreuament d'aquest material, quan és irradiat amb llum ultravioleta, des d'un punt de vista químic (estructura, composició, propietats tèrmiques...). En aquest apartat es mostra en imatges els efectes d'aquesta reacció sobre el material. S'han preparat els films i s'han observat els canvis emprant diferents tècniques microscòpiques. Tot i que el gruix del film sembla ser un paràmetre crític per a valorar l'extensió de la reacció de crosslinking, si que s'han obtingut resultats comparables entre les diferents tècniques emprades.

En la Figura 4.40 es mostren les imatges de TEM del polímer irradiat. S'observa una estructura reticular on semblen existir dues fases: les zones clares, que corresponen a l'estructura entrecreuada i que podria correspondre a un nou estat d'ordenació del material degut a la reacció d'entrecreuament i les zones fosques que podrien correspondre a un estat més amorf del material.

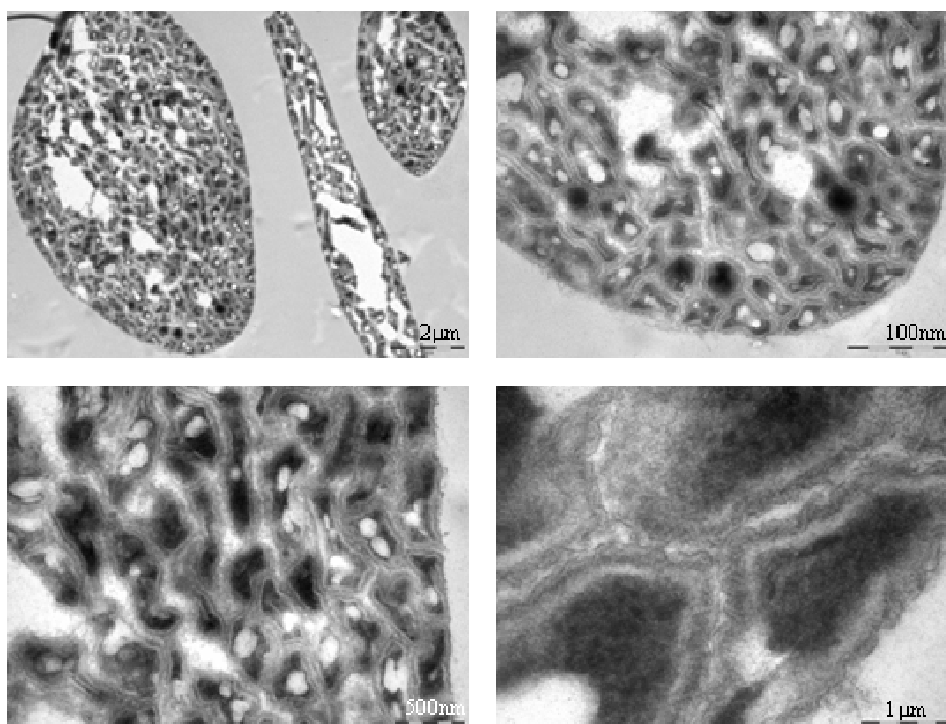


Figura 4.40 TEM. Imatge del PHA-L purificat i irradiat durant 24 h amb llum ultravioleta. En la Figura es mostren micrografies del polímer a diferents augments. Tal i com es pot comprovar, després de ser irradiat, el polímer mostra una organització reticular.

Les imatges d'AFM dels films irradiats també mostren una estructura de xarxa. En la Figura 4.41 es mostren imatges d'alta resolució del polímer que suggereixen una ordenació de les fibres del polímer irradiat.

La imatge de fase és un bon complement del “mode tapping” en AFM ja que proporciona informació, a escala nanomètrica, relacionada amb l'estructura superficial del material. Mitjançant l'anàlisi de l'angle de fase de l'oscil·lació del cantilever respecte la senyal sinusoidal d'excitació, durant el rastreig en “mode tapping”, s'obté informació de la viscoelasticitat i l'adhesió del material. Un retard en la fase es tradueix en la detecció de variacions en les propietats viscoelàstiques del material.

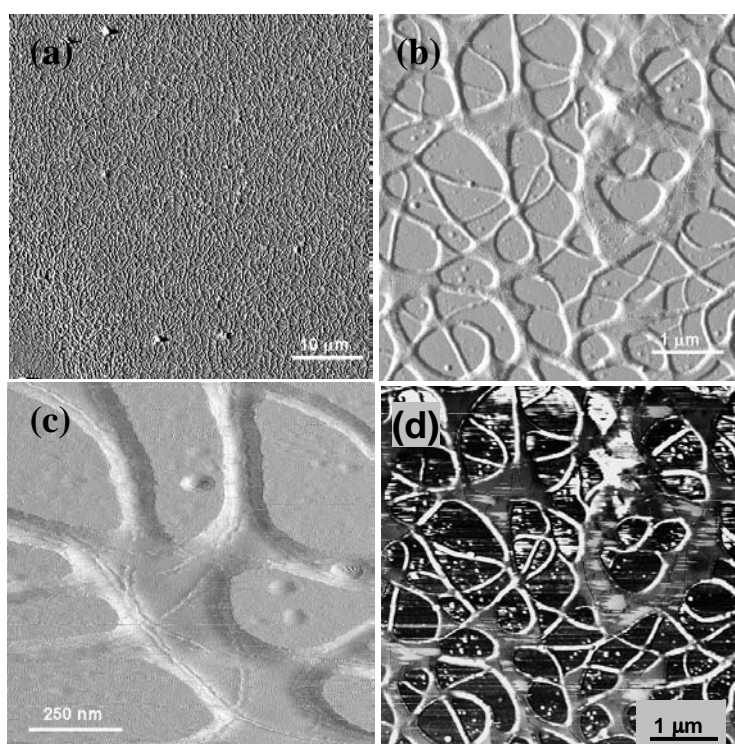


Figura 4.41 Tapping mode. Imatges d'AFM del polímer irradiat durant 24 h-UV. En la Figura (a, b i c) es mostren diferents augments de la imatge d'alçada (height image) del polímer irradiat; la imatge (d) correspon a la imatge de fase (phase image), on es pot observar que el material que conforma la xarxa és més dur (zona clara) que la resta del polímer (zona fosca).

La imatge de fase (Figura 4.41(d)) del polímer irradiat suggereix l'existència de dos tipus de fases dins el mateix polímer: una de més dura (zona clara), que coincideix amb la part reticulada i una de més tova (zona fosca), que podria correspondre a la part del polímer que no ha reaccionat amb la radiació. D'acord amb la imatge de fase es confirma que la reacció d'entrecreuament que té lloc com a conseqüència de la radiació UV induïx a l'enduriment del polímer.

4.2. Fonts de carboni definides

Els polihidroxicanoats de cadena mitja (mcl-PHA) presenten una gran varietat monomèrica, actualment ja han estat identificats més de 100 tipus diferents de monòmers. Tot i que s'han obtingut un gran nombre de PHAs amb cadenes lineals (De Smet *et al.*, 1983), (Brandl *et al.*, 1988) i cadenes ramificades (Fritzsche *et al.*, 1990), (Lenz *et al.*, 1992), han estat els mcl-PHA amb cadenes laterals amb grups funcionals tals com dobles enllaços (Lageveen *et al.*, 1988), triples enllaços (Kim *et al.*, 1998) o grups aromàtics (Curley *et al.*, 1996), els que han despertat més interès. Els PHAs olefínics, és a dir els mcl-PHAs amb cadenes laterals insaturades, representen un grup molt interessant ja que poden ésser modificats químicament i per tant modular les propietats del polímer biosintètic (Bear, 1997), (Dufresne *et al.*, 2001), (Kurth, 2002).

Ballistreri *et al.* van fer créixer *P. putida* GPO1 amb una mescla de dos substrats (àcid 10-undecenoic i àcid nonanoic) amb l'objectiu de sintetitzar un polímer de bloc (Ballistreri *et al.*, 1992). Els polímers de bloc són considerats bons biomaterials ja que permeten regular les propietats amfifíliques, mecàniques i físiques del polímer amb l'ajust de les *ratios* dels blocs que el constitueixen. (Kumar and Ravikumar, 2001).

Actualment, a la bibliografia existeixen pocs treballs que parlin de la producció de polímers de bloc amb mcl-PHA. Kim *et al.* van estudiar diferents estratègies de cultiu, cultiu discontinu i cultiu seqüencial, i van concloure que *P. putida* GPO1 bàsicament produeix mescla de copolímers (PHA-C11:1Δ10 i PHA-C9:0) quan es fa créixer en àcid undecenoic (C11:1) i àcid nonanoic (C9:0), tot i que també es va detectar un percentatge molt petit de polímer de bloc, és a dir, un polímer que contenia unitats repetitives procedents d'ambdós substrats (Kim *et al.*, 1997).

En aquesta part de la tesi s'intentarà obtenir un polímer que contingui unitats monomèriques insaturades i unitats monomèriques saturades. D'aquesta manera, el polímer tindria una part que es podria modificar químicament i per tant es podria modificar i/o regular les propietats del polímer

Per a formar la part insaturada del polímer es va decidir emprar l'àcid 10-undecenoic (C11:1) i per a la part saturada es van estudiar els següents substrats: àcid octanoic (C8:0), àcid nonanoic (C9:0) i àcid undecanoic (C11:0), per tal de veure quin tenia una cinètica de creixement i de producció de PHA més adient. Un altre paràmetre que es va tenir en compte a l'hora d'escollir el substrat alifàtic fou la regularitat monomèrica del polímer que s'obté.

Quan es fa créixer *P. aeruginosa* 42A2, en medi MM1 i 15 g/L d'àcid octanoic com a substrat, tot i que el percentatge d'acumulació de PHA és del 46 % (p/p), el pes sec és només de 1,1 g/L a les 96 h de cultiu. En les següents 24 h s'observa un augment considerable de la biomassa, 2,50 g/L, a la vegada que una pèrdua del 50% aproximadament del PHA ja acumulat (Hernández, 2003). A més a més s'observa una fase de latència de 72-96 h. Les dades obtingudes en aquests cultius no es mostren en aquest treball, ja que després de diferents experiments es va descartar, ja que el temp de cultiu és molt llarg. Aquest fenomen contrasta amb el descrit a la bibliografia on diferents estudis indiquen que l'àcid octanoic és un bon substrat per a la producció de PHA en diferents microorganismes (Gross *et al.*, 1989), (Witholt and Kessler, 1999).

Tot i que el temp òptim de cultiu és llarg, els resultats obtinguts en cultius emprant l'àcid octanoic com a substrat són equiparables als descrits a la bibliografia per a d'altres espècies de *Pseudomonas*, com per exemple *P. oleovorans* i *P. stutzeri* (Xi *et al.*, 2000), (Kim, 2002).

A continuació es mostren les cinètiques de creixement i producció de PHA per el C9:0, C11:0 i C11:1Δ10.

4.2.1. Cultius i producció de PHA emprant substrats definits

4.2.1.1 Àcid nonanoic (C9:0)

Per a l'àcid nonanoic (C9:0) s'han assajat tres concentracions diferents: 10, 15 i 20 g/L per tal de determinar quina era la concentració òptima tant per a la producció de biomassa com de polihidroxialcanoat (Hernández, 2003).

Tal i com es pot comprovar a la Figura 4.42, la concentració de 10 g/L de C9:0 és massa baixa, ja que malgrat tenir una producció de biomassa del 2,56 g/L, l'acumulació de polímer és inferior al 5 % (p/p) i en 48h s'ha assolit la fase estacionària. D'acord amb els resultats obtinguts no només hi ha limitació de font de nitrogen sinó que tot sembla indicar que també hi ha limitació de font de carboni. D'altra banda, la cinètica per al cultiu amb 20 g/L de C9:0, mostra valors de biomassa i d'acumulació de PHA relativament alts, per a aquest tipus de substrat, 4,14 g/L i 1,12 g/L de biomassa i PHA, respectivament. L'alta concentració de font de carboni en el medi de cultiu dificulta la manipulació de les cèl·lules i la seva quantificació.

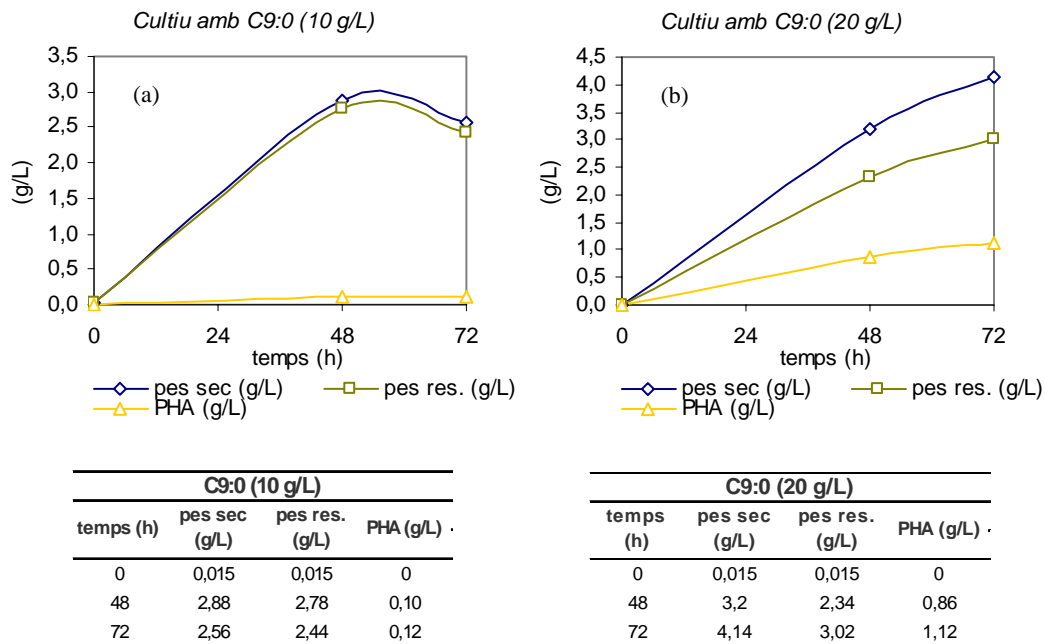


Figura 4.42. Cinètiques de creixement i producció de PHA per a *P. aeruginosa* 42A2 en medi MM1, 30°C, 120 rpm i inòcul 2% (v/v). Les concentracions inicials de substrat assajades han estat les següents: (a) 10 g/L de C9:0 i (b) 20 g/L de C9:0.

Així doncs, finalment es va decidir treballar a una concentració intermitja, 15 g/L.

En la Figura 4.43 es mostra la cinètica de creixement i de producció de PHA per al cultiu amb 15 g/L de substrat. Tal i com es pot comprovar, els resultats que s'obtenen són semblants als obtinguts en el cultiu amb 20 g/L de C9:0 i d'altra banda la manipulació de les mostres és més fàcil. Tot i que el creixement cel·lular és lleugerament inferior en el cas del cultiu amb 15 g/L de substrat, l'acumulació de PHA és més elevada, obtenint-se un percentatge d'acumulació de PHA del 33 % (p/p). Tal i com es pot observar en la Figura 4.43, l'acumulació té lloc tant a la fase exponencial com a la fase estacionària.

En la Figura 4.44 es poden observar les diferents cinètiques d'acumulació de PHA (% (p/p)) per a les concentracions de substrats assajades. Tal i com s'observa en la Figura 4.44, el percentatge d'acumulació en els cultius de 15 g/L i 20 g/L és molt semblant, 33% i 27% (p/p) respectivament.

D'altres espècies de *Pseudomonas* com *P. oleovorans* i *P. stutzeri*, quan es fan créixer emprant l'àcid nonanoic com a substrat són capaces d'acumular fins a un 45 %

(p/p) de PHA respecte el seu pes sec. No obstant val a dir que el creixement de biomassa per aquestes espècies és molt inferior, 1,50 g/L, a l'obtingut en els cultius amb *P. aeruginosa* 42A2 (Xi *et al.*, 2000), (Kim *et al.*, 2002).

C9:0 (15 g/L)				
temps (h)	pes sec (g/L)	pes res. (g/L)	PHA (g/L)	pH
0	0,015	0,00	0,00	6,80
24	1,79	1,39	0,4	7,24
48	2,83	2,01	0,82	8,09
60	4,03	3,03	1,00	8,90
72	3,95	2,63	1,32	8,89

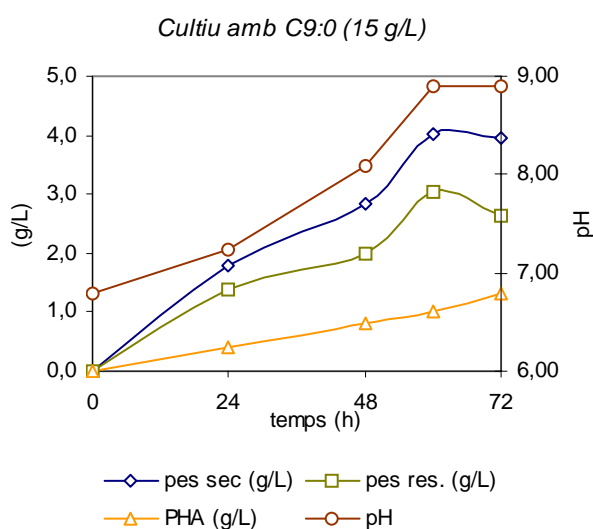


Figura 4.43 Cinètica de producció de biomassa i PHA en un cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 amb 15 g/L de font de carboni, en medi MM1, 30°C i 120 rpm.

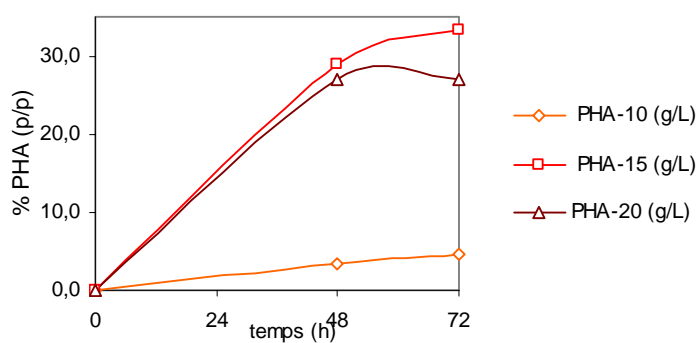


Figura 4.44 Cinètica d'acumulació de PHA (% p/p) per a les concentracions assajades d'àcid nonanoic (10, 15 i 20 g/L).

4.2.1.2 Àcid undecanoic (C11:0)

L'altra font de carboni assajada ha estat l'àcid undecanoic (C11:0), un àcid gras saturat amb una longitud de cadena d'onze àtoms de carboni. Per aquesta segona font de carboni s'han assajat les següents concentracions de substrat: 0,5, 10 i 15 g/L (Cabellos, 2003).

Quan s'utilitza l'àcid undecanoic com a substrat s'observa la formació de dos pigments en el medi de cultiu que dificulten la manipulació de la mostra i la quantificació de la biomassa.

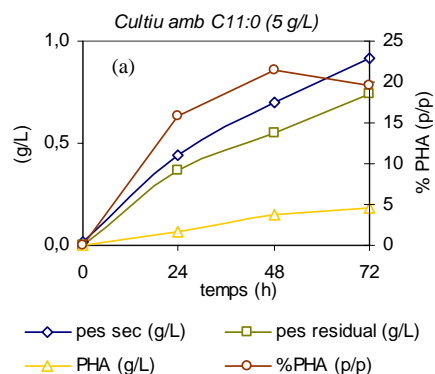
P. aeruginosa pertany al grup de les *Pseudomonas fluorescens*. Aquests microorganismes produeixen pigments solubles en aigua (pioverdines) que presenten fluorescència quan són exposats a la llum de Word (254 nm). Els pigments fluorescents poden ser de color groc verdós o groc marronós. Aquests pigments es troben dissolts en el medi de cultiu i no són solubles en cloroform. D'altres pigments descrits per aquest tipus de microorganismes són la pioverdina, la piocianina i la piorrubina. Aquest darrer pigment és de color vermell i soluble en aigua. Els pigments són considerats com a metabòlits secundaris produïts pels bacteris en condicions d'estrès. La producció de pioverdines està relacionada amb la concentració de ferro en el medi de cultiu (Marqués, 1982).

En les condicions de cultiu amb les quals s'ha treballat s'ha detectat la formació de dos tipus diferents de pigments: un de color groc fluorescent i totalment soluble en aigua que segurament pertany a la família de les pioverdines i un segon pigment de color granatós que és insoluble en el medi de cultiu i que no s'ha pogut identificar. La formació d'aquest segon pigment, entre les 48 h i 72 h de cultiu, dificulta la quantificació de la biomassa i el procés de mostratge. Sembla ser que existeix una relació directa entre la formació d'aquest segon pigment, la concentració substrat i el temps de cultiu, ja que a mesura que augmenta la concentració de substrat també augmenta la formació de pigment.

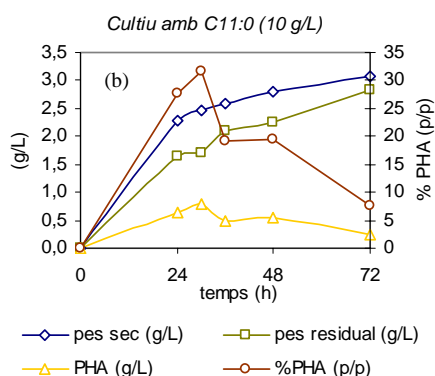
La formació d'aquest pigment granatós obliga a fer successius rentats de la biomassa amb dissolvents orgànics. Per aquesta raó la biomassa es renta amb hexà:aigua en una relació 1:10 per tal d'eliminar el màxim de pigment possible, abans de fer qualsevol mesura. Finalment es torna a rentar cèl·lules amb aigua per eliminar les restes d'hexà per a poder ser liofilitzades.

En la Figura 4.45 es mostren les cinètiques obtingudes per a les diferents concentracions de substrat. Tal i com es pot observar, en les gràfiques *P. aeruginosa* 42A2 creix molt bé quan s'utilitza l'àcid undecanoic com a substrat.

C11:0 (5 g/L)				
temps (h)	pes sec (g/L)	pes residual (g/L)	PHA (g/L)	%PHA (p/p)
0	0,015	0	0	0
24	0,44	0,37	0,07	15,9
48	0,7	0,55	0,15	21,4
72	0,92	0,74	0,18	19,6



C11:0 (10 g/L)				
temps (h)	pes sec (g/L)	pes residual (g/L)	PHA (g/L)	%PHA (p/p)
0	0,015	0	0	0
24	2,28	1,65	0,63	27,6
30	2,47	1,69	0,78	31,6
36	2,6	2,10	0,50	19,2
48	2,81	2,26	0,55	19,6
72	3,07	2,84	0,23	7,5



C11:0 (15 g/L)				
temps (h)	pes sec (g/L)	pes residual (g/L)	PHA (g/L)	%PHA (p/p)
0	0,015	0,581	0	0
24	2,72	1,52	1,2	44,1
48	1,95	0,66	1,29	66,2
72	2,86	1,65	1,21	42,3

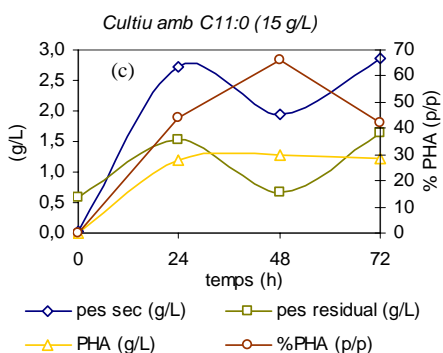


Figura 4.45. Cinètiques de creixement cel·lular i de producció de PHA emprant diferents concentracions d'àcid undecanoic: (a) 5 g/L, (b) 10 g/L i (c) 15 g/L.

En els cultius amb 5 g/L de C11:0, a les 24 h de cultiu l'acumulació de PHA és del 16 % (p/p) mentre que el creixement cel·lular és tan sols de 0,37 g/L. De totes

maneres el cultiu continua creixent fins arribar a les 72 h de cultiu on s'obté un pes sec de 0,92 g/L i una acumulació del 20 % (p/p). A les 48 h de cultiu la font de nitrogen estava exhaurida i per tant no s'espera que el microorganisme pugui créixer més. Així doncs sembla que en aquestes condicions existeix limitació per font de nitrogen i limitació per font de carboni. Tal i com ja s'ha descrit, s'observa la formació de dos pigments, un de soluble i color groc fluorescent (pioverdina) i un pigment insoluble i granatós que costa molt de separar-los de la biomassa. Considerant que el creixement cel·lular en aquestes condicions de cultiu no és massa alt i les dificultats per separar aquest pigment insoluble, podria existir cert error experimental en les mesures de pes sec.

En els cultius amb 10 g/L de C11:0 tant el creixement (pes residual) com la producció de PHA és molt millor. En tan sols 24 h, el pes sec i el PHA són de 2,28 i 0,63 g/L, respectivament. El màxim d'acumulació es troba a les 30 h de cultiu on s'arriba una acumulació del 31 % (p/p). En canvi, el màxim de creixement cel·lular (2,84 g/L) el trobem a les 72 h de cultiu. Aquest punt coincideix amb el mínim de producció de PHA. Aquests resultats suggereixen que el cultiu està limitat de font de carboni i per tant hi pot haver despolimerització del PHA acumulat per tal de que el bacteri obtingui l'energia suficient per a créixer i per al manteniment del sistema basal. A les 72 h de cultiu la concentració de substrat és baixa i per tant la ratio (C/N) no afavoreix el procés de acumulació de PHA, però si és suficient per a que el microorganisme continu creixent.

En el cultiu amb 15 g/L de C11:0, tot i que s'aconsegueix el millor resultat de d'acumulació de PHA (44 % (p/p)) en tan sols 24 h, l'aspecte de la biomassa i la formació d'exopolisacàrid en el medi, indiquen una possible toxicitat de la font de carboni. Estudis previs realitzats per Huijberts *et al.* (1996) amb *P. putida* KT4224 i *P. resinovorans* demostraren que un excés de font de carboni pot produir efectes tòxics i la inhibició tant del creixement cel·lular com de la producció de PHA (Huijberts and Eggink, 1996).

En la Figura 4.46 es mostren les cinètiques d'acumulació per a les tres concentracions de substrats assajades. Tot i que els resultats obtinguts indiquen que el percentatge d'acumulació de PHA més alt s'obté en els cultius de 15 g/L, la toxicitat del mateix substrat fa que aquestes condicions de cultiu no siguin viables. D'altra banda, els cultius amb 5 g/L de C11:0 tot i obtenir un bon percentatge d'acumulació (20% (p/p)), el creixement cel·lular és molt baix, 0,92 g/L. Així doncs, les millors

condicions de cultiu tant per a la producció de biomassa com de PHA es donen en els cultius amb 10 g/L de C11:0 on a les 30 h de cultius s'obté un percentatge d'acumulació de PHA del 31 % (p/p).

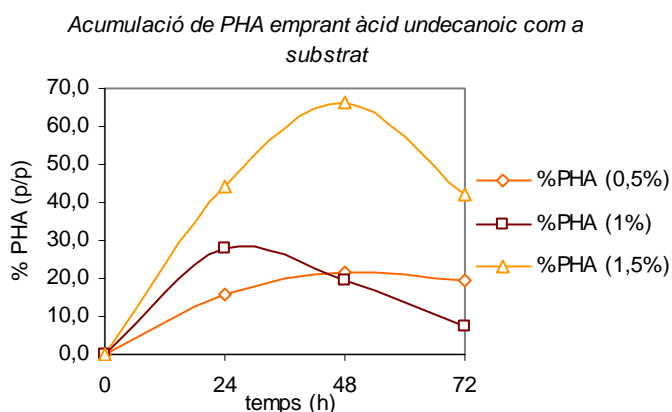


Figura 4.46. Gràfica dels processos d'acumulació (%(p/p)) de PHA per a les diferents concentracions de substrat assajades: 5 (0,5%), 10 (1%) i 15 (1,5%) g/L d'àcid undecanoic.

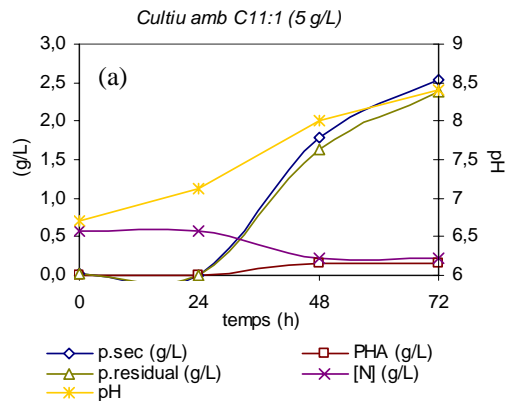
En un estudi realitzat per BarbuZZi *et al.* (2004), treballant amb *P. aeruginosa* ATTC 27853 i emprant àcid undecanoic com a substrat, la producció de biomassa total i el percentatge d'acumulació de PHA, és de 0,72 g/L i 4,4 % (p/p) respectivament (BarbuZZi *et al.*, 2004). D'altra banda aquestes dades contrasten amb els valors obtinguts per Xi *et al.* (2000) que treballant amb *P. stutzeri* 1317, obtenen una producció de biomassa de 2,20 g/L i una acumulació del 66,3 % (p/p) (Xi *et al.*, 2000).

4.2.1.3. Àcid 10-undecenoic (C11:1)

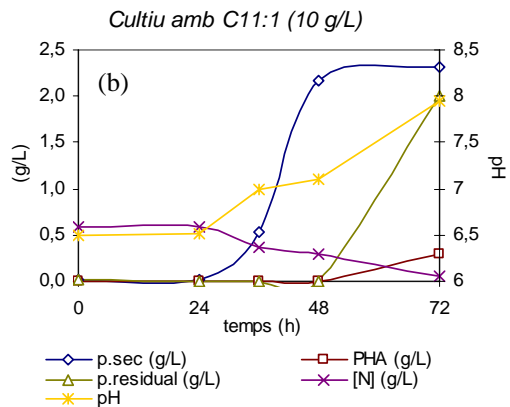
Com s'ha comentat anteriorment, per tal de poder funcionalitzar el polímer es va creure interessant assajar una font de carboni que contingues un grup funcional diferent. S'ha descrit que d'altres espècies de *Pseudomonas* com *P. putida* KCTC 2407 o *P. oleovorans* poden créixer en presència d'àcid 10-undecenoic (C11:1) (Kim *et al.*, 1997), (Park *et al.*, 1998) (Dufresne *et al.*, 2001). Aquesta font de carboni conté un grup vinil que li confereix molta reactivitat ja que pot ser modificat químicament per tal d'obtenir un grup més polar (com per exemple un grup diol o un grup àcid), canviant així les característiques inicials del polímer.

Tal i com es pot comprovar en les corbes de creixement (Figura 4.47), aquesta font de carboni sembla que és bastant més difícil d'assimilar per al bacteri que els altres substrats assajats fins ara. En les gràfiques de les cinètiques de creixement i producció de PHA es pot observar com a mesura que s'augmenta la concentració de font de carboni, el creixement bacterià és més lent i necessita d'una fase de latència o adaptació més llarga.

C11:1 (5 g/L)					
temps (h)	p.sec (g/L)	PHA (g/L)	p.residual (g/L)	[N] (g/L)	pH
0	0,02	0	0,02	0,581	6,70
24	-	-	-	0,581	7,13
48	1,78	0,15	1,63	0,216	8,01
72	2,54	0,16	2,38	0,216	8,40



C11:1 (10 g/L)					
temps (h)	p.sec (g/L)	PHA (g/L)	p.residual (g/L)	[N] (g/L)	pH
0	0,02	0	0,02	0,581	6,50
24	0,02	-	-	0,581	6,52
36	0,54	-	-	0,359	7
48	2,18	-	-	0,288	7,11
72	2,31	0,25	2,06	0,058	7,95



C11:1 (20 g/L)					
temps (h)	p.sec (g/L)	PHA (g/L)	p.residual (g/L)	[N] (g/L)	pH
0	0,015	0	0,015	0,581	6,50
72	2,38	0,2	2,18	0,012	7,00
96	1,69	0,27	1,42	0,012	8,18
120	2,14	0,11	2,03	0	8,68
144	2,01	0,08	1,93	0	8,95

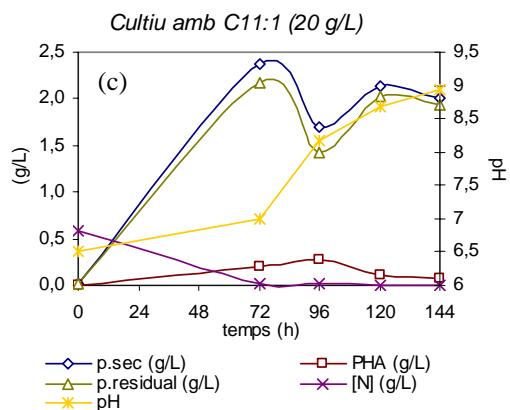


Figura 4.47. Cinètiques de creixement i producció de PHA emprant diferents concentracions d'àcid 10-undecenoic com a font de carboni: (a) 5 g/L, (b) 10 g/L i (c) 20 g/L

No es pot considerar que aquesta font de carboni sigui tòxica per al microorganisme, però sí que s'observa un cert efecte d'inhibició del creixement i un augment de la fase de latència.

En la Figura 4.48 hi ha representades les corbes de creixement per a les diferents concentracions de substrat assajades i s'observa clarament com a mesura que s'augmenta la concentració de font de carboni, la fase de latència es va allargant. Així doncs, per a la concentració de 5 g/L i 10 g/L s'arriba a la meitat de la fase d'exponencial entre les 30-36 h de cultiu, no així per al cultiu de 20 g/L on pràcticament la fase de latència es duplica i s'arriba a la meitat de la fase exponencial a les 60 h de cultiu. D'acord amb Bear *et al.*, (1997), quan de *P. oleovorans* ATCC 29347 es fa créixer en un medi mineral mínim i emprant àcid 10-undecenoic (20 mM o 3,7 g/L) com a substrat té una fase de latència de 37 h (Bear, 1997).

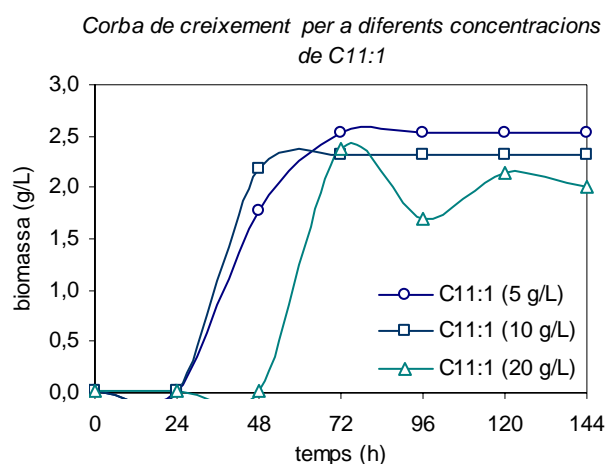


Figura 4.48. Efecte de la concentració d'àcid 10-undecenoic (C11:1Δ10) sobre la fase de latència.

En els cultius amb 5 g/L i 10 g/L, s'obté la producció màxima de biomassa a les 72 h de cultiu, 2,54 g/L i 2,31 g/L, respectivament. En ambdós cultius s'aconsegueix un percentatge d'acumulació de PHA del 10 % (p/p). En el cultiu amb 20 g/L de substrat a les 96 h de cultiu s'obté 1,62 g/L de biomassa i 0,27 g/L de PHA. Aquests valors estan en concordança amb els descrits per Bear *et al.*, (1997), on en cultius amb *P. oleovorans* ATCC 29347 i àcid 10-undecenoic (20 mM) han obtingut un 13 % (p/p) d'acumulació de PHA (Bear, 1997). Tot i que en els cultius de *P. aeruginosa* 42A2

amb 20 g/L de substrat s'obté un percentatge d'acumulació de PHA del 19% (p/p), degut a la presència de substrat residual i a la formació d'exopolisacàrid, la manipulació de la mostra es fa més difícil. Els resultats obtinguts per *P. aeruginosa* 42A2, tant de biomassa com de PHA, són millors als descrits per Kim *et al.* (2000) en cultius amb *P. putida* KCTC 2407 on obtenen una producció de biomassa de 0,40 g/L i 1,8 % (p/p) d'acumulació de PHA, a les 48 h de cultiu. Val a dir però que treballen amb concentracions de substrat molt baixes (10 mM), possiblement degut a les característiques del microorganisme i del mateix substrat.

En els cultius amb 20 g/L el creixement és molt lent i sembla que existeix algun tipus d'inhibició o efecte retardador del creixement per part de la font de carboni. Malgrat que a les 72h de cultiu s'arriben a valors semblants als altres cultius, l'aspecte del cultiu no és bo i s'observa la formació de exopolisacàrid que dificulta la quantificació tant de biomassa com de PHA. Tot i que es deixa el cultiu més hores d'incubació, el microorganisme després de 144 h de cultiu no ha pogut consumir la font de carboni. Es realitzen anàlisis qualitatives per cromatografia de gasos de l'extracció orgànica del sobrenedant i es confirma que la major part de la font de carboni continua en el medi de cultiu.

D'acord amb els resultats obtinguts en els apartats anteriors es va decidir fer créixer *P. aeruginosa* 42A2 emprant l'àcid 10-undecenoic (C11:1) i l'àcid undecanoic (C11:0). S'han estudiat diferents condicions de cultiu per tal de veure quina era millor per a obtenir una bona producció de biomassa i PHA., per tal d'aconseguir un polímer, la composició del qual, reflecteixi la composició dels substrats inicials.

4.2.1.4 (C11:1+C11:0)

i. Cultius en condicions proliferants.

D'acord amb els resultats obtinguts en els estudis previs amb les diferents fonts de carboni, es decideix combinar l'àcid 10-undecenoic i l'àcid undecanoic, per tal de comprovar si es pot produir un polímer que continguin monòmers saturats i monòmers insaturats. D'aquesta manera s'obtidria un polímer que es podria modificar químicament, per al final obtenir un nou polímer amb una regió hidrofòbica i una regió hidrofílica.

S'han realitzat assajos previs per tal de veure si l'ordre d'addició de les fonts de carboni era important o no, i s'ha comprovat que quan s'addiciona primer el C11:0, es necessiten temps de cultius més llargs degut a la fase de latència del C11:1. A l'allargar el temps de cultiu, la formació de pigment també augmenta i fa que al final el cultiu no sigui viable. Per tant, es va decidir utilitzar el C11:1 com a primer substrat i el C11:0 com a segon substrat.

En la Figura 4.49 es mostren les cinètiques de cultiu emprant les dues fonts de carboni (C11:1 i C11:0). En ambdós casos s'utilitza el C11:1 com a primer substrat i al cap de 60 h de cultiu s'addiciona el C11:0. Es va provar d'addicionar un suplement de nitrats conjuntament amb el segon substrat per tal de millorar el creixement (veure Figura 4.49(a)). En l'experiment on es subministra també el suplement de nitrats, el creixement és més alt, arribant a 5,36 g/L de pes sec a les 24 h de l'addició de la segona font de carboni. No obstant, tot i que la producció de PHA ha augmentat de 0,2 g/L a 1,3 g/L, s'han obtingut millors resultats en els cultius on no s'ha addicionat el suplement de nitrats. En aquest segon cas, el creixement cel·lular és molt baix (de 3,40 g/L) però en canvi el percentatge d'acumulació és del 45% (p/p). Abans de l'addició del C11:0, l'acumulació era només del 10 % (p/p).

temps (h)	p. sec (g/L)	p. residual (g/L)	PHA (g/L)	% PHA (p/p)
0	2,43	2,25	0,18	7,4
24	5,36	4,09	1,27	23,7
48	4,80	3,92	0,88	18,3

temps (h)	p. sec (g/L)	p. residual (g/L)	PHA (g/L)	% PHA (p/p)
0	1,83	1,65	0,18	9,8
24	3,40	1,87	1,53	45,0
48	3,50	2,24	1,26	36,0

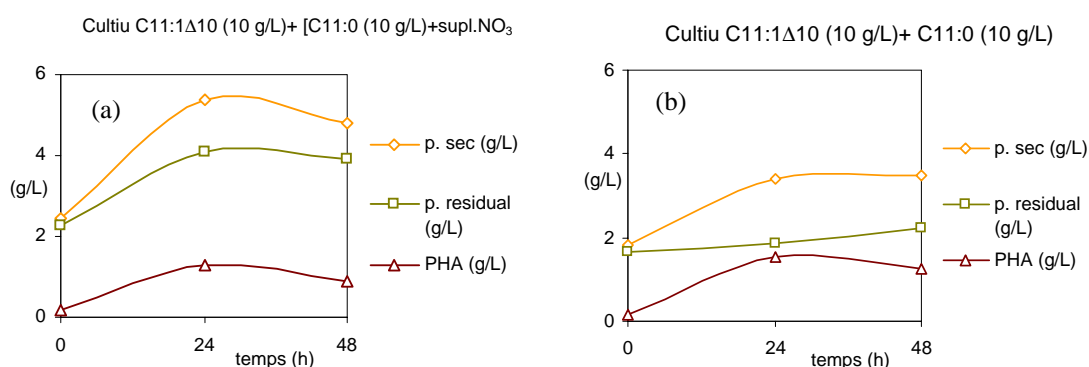


Figura 4.49. Cinètiques de producció de biomassa i PHA emprant C11:1Δ10 i C11:0 com a substrats. En ambdues gràfiques el temps 0 h correspon a un precultiu de 60-72 h amb C11:1Δ10 (10 g/L) com a substrat. En la Figura 4.49-a, s'ha addicionat un suplement de NO₃⁻ conjuntament amb la segona font de carboni.

En ambdós casos, el temps òptim tant per obtenir el màxim de biomassa com el màxim d'acumulació de PHA és a les 24 h després de l'addició del segon substrat, ja que a les 48 hores ja s'observa un descens del percentatge d'acumulació. Amb aquest experiment s'ha comprovat que *P. aeruginosa* 42A2 pot créixer i acumular PHA emprant dos substrats, C11:1 i C11:0, de forma seqüencial. Ara bé, el que realment ens interessa es veure com realment ha acumulat aquest PHA, és a dir, si ha addicionat les unitats de la segona font de carboni sobre el polímer ja existent PHA(C11:1-co-C11:0), o si per al contrari el que produeix és una barreja física dels copolímers de cada font de carboni, PHA-C11:1 i PHA-C11:0. També cal considerar la possibilitat de que per tal de poder acumular el segon polímer PHA-C11:0, es degradi el polímer ja acumulat de la primera font de carboni, PHA-C11:1. Per això en l'apartat 4.2.3 s'analitzarà les estructures dels PHAs obtinguts amb les tècniques de CG, RMN i CG-EM.

En un estudi realitzat per Kim *et al.* (1997), on es va alimentar de forma seqüencial amb àcid 10-undecenoic (C11:1, 10 mM) i àcid nonanoic (C9:0, 10 mM), un cultiu de *P. oleovorans*, es va obtenir una acumulació de PHA del 35% (p/p) i un creixement cel·lular de 1,4 g/L (Kim *et al.*, 1997). De forma anàloga, Bear *et al.*, (1997), treballant també amb cultius de *P. oleovorans* però emprant àcid octanoic i àcid undecenoic com a substrats aconseguix produir PHAs amb diferents percentatges relatius de monòmers insaturats, amb una acumulació de PHA entre el 17 % i el 32 % (p/p).

ii. Condicions no proliferants

Tot i que treballant en cultius proliferants s'ha obtingut bons rendiments d'acumulació totals, entre el 24 % i el 45 % (p/p), només un 7-10 % (p/p) prové de la font de carboni insaturada (C11:1). De manera que, tal i com es comprovarà més endavant amb les anàlisis de CG-EM i RMN, el polímer que s'obté a partir de cultius proliferants està compost principalment per unitats saturades procedents de l'àcid undecanoic (C11:0). Per tal d'intentar regular la composició monomèrica es va treballar en condicions no proliferants. D'aquesta manera el microorganisme al no tenir font de nitrogen per a créixer pot emprar directament la font de carboni subministrada per a produir PHA.

Per als experiments en condicions no proliferants es va agafar la biomassa obtinguda dels precultius de *P. aeruginosa* 42A2 amb 10 g/L de C11:1, i es va rentar amb una solució de NaCl (0,9 %) per tal d'eliminar les restes de nitrogen residual. A continuació es va reconcentrar les cèl·lules en solució amortidora de Sørensen

(pH=7,21) i es va addicionar C11:1 per una concentració final de 5 g/L. Passades 24 h o 48 h de cultiu en condicions no proliferants, en alguns dels matrassos es va addicionar la segona font de carboni (C11:0) també per a una concentració final en el cultiu de 5 g/L.

En la Figura 4.50 es mostren els resultats obtinguts en dos experiments en condicions no proliferants, NP-4 i NP-6. En ambdós experiments, (1) fa referència als matrassos on només s'ha addicionat C11:1 a l'inici dels cultius en condicions no proliferants. De manera que, NP-4(1) i NP-6(1) són experiments equivalents i (2) fa referència als matrassos en els quals s'ha subministrat també el segon substrat (C11:0) a les 24 h de cultiu, en el cas de NP-4(2) i a les 48 h de cultiu, en el cas de NP-6(2).

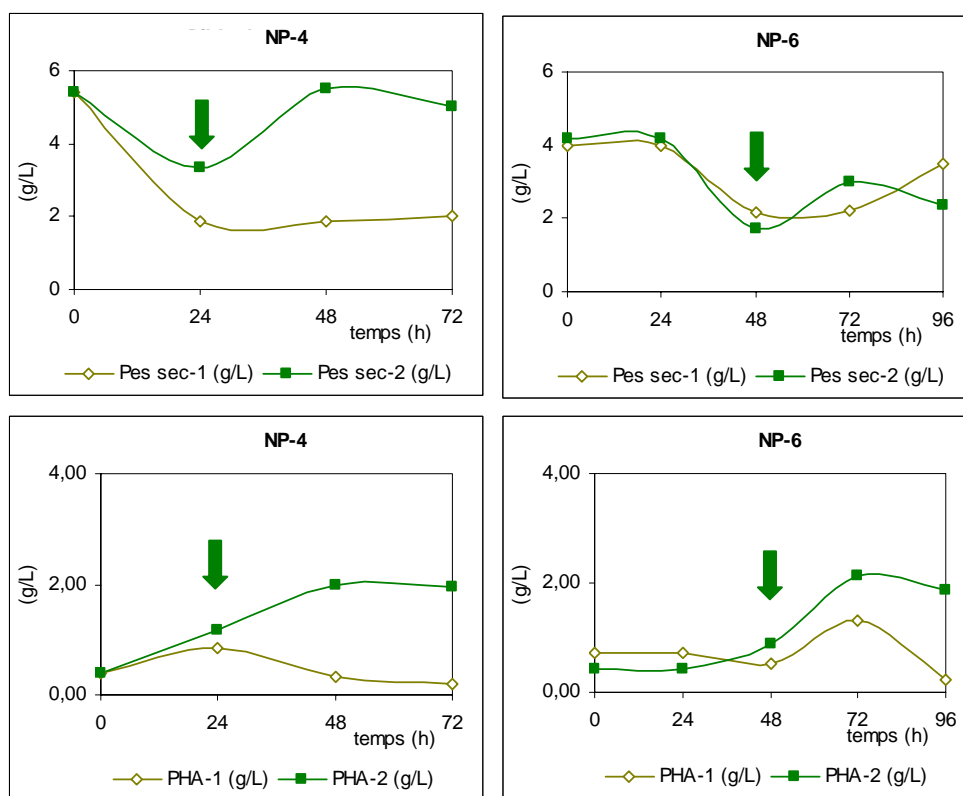


Figura 4.50 Cultius en condicions no proliferants. Les gràfiques mostren els resultats de dos experiments diferents. En tots els matrassos se'ls ha addicionat 5 g/L de C11:1 a l'inici dels cultius en condicions no proliferants. (a) experiment NP-4, on a les 24h de cultiu no proliferant, en el matràs 2 s'ha addicionat 5 g/L de C11:0. (b) experiment NP-6, on a les 48 h de cultiu no proliferant s'ha addicionat 0,5 g/L de C11:0. S'ha indicat amb una fletxa verda el punt d'addició del segon substrat (C11:0).

En tots els experiments, durant les primeres hores de cultiu no proliferant s'observa una forta davallada del pes sec que es fa difícil d'explicar. S'ha descrit que

les cèl·lules al passar d'un medi proliferant a un no proliferant poden experimentar una reducció de mida i de pes. Es podria considerar la possibilitat de lisis cel·lular, però el recompte de viables realitzat, indica que el nombre de cèl·lules viables es manté pràcticament constant. No obstant, en alguns dels casos la pèrdua de pes observada és considerable, per això un altre factor a tenir en compte és l'error experimental. Per a fer les mesures de biomassa s'han fet rentats amb hexà:aigua (1:10) (v/v) per tal d'eliminar la font de carboni residual. La formació d'exopolisacàrid, en el medi de cultiu també ha dificultat molt tant el mostratge com els seus rentats, per tant podria ser que part de la biomassa s'hagués perdut durant aquests processos.

En el cas de NP-4(1) i NP-6(1), on només s'ha addicionat C11:1, s'observa un lleuger augment de producció de PHA. No obstant, a temps llargs de cultius, es torna a observar un descens en l'acumulació de PHA possiblement degut a la biodegradació intracel·lular del PHA (Ren *et al.*, 2005).

En canvi en els experiments, NP-4(2) i NP-6(2) es detecta un fort increment en la producció de PHA després de l'addició dels dos substrats. Segurament després de l'addició del C11:1, el procés de despolimerització i el de biosíntesis es donen simultàniament. El fet que el resultat final sigui un increment net en la producció de polímer pot ser degut a que el procés d'acumulació de la segona font de carboni (C11:0) és més ràpid que el procés de despolimerització. Tal i com s'ha pogut veure en les cinètiques de producció del PHA-C11:0 (apartat 4.2.1.2), *P.aeruginosa* 42A2 pot acumular fins a un 31 % (p/p) de PHA-C11:0 en tan sols 30 h de cultiu. O bé, d'altra banda, l'excés de font de carboni en el medi, fa que el microorganisme no necessiti despolimeritzar el PHA ja acumulat i per tant l'augment en la producció de PHA sigui la suma del PHA-C11:1 i del PHA-C11:0.

En ambdós casos s'ha arribat a valors d'acumulació del 60-80 % (p/p) de PHA i posteriors anàlisis (RMN i CG-EM) han demostrat la presència de monòmers saturats i insaturats en el polímer final. Malgrat els bons resultats obtinguts, aquesta estratègia de cultiu no és adequada per la seva complexitat per l'escalat a bioreactor. Aquests percentatges d'acumulació ja s'havien detectat anteriorment quan *P. aeruginosa* 42A2 es feia créixer en àcid oleic i en condicions no proliferants (Culleré, 2002).

4.2.2. Escalat a bioreactor

Per a dur a terme l'escalat a bioreactor es va treballar en condicions proliferants. L'únic inconvenient era que d'acord amb els resultats obtinguts en els experiments en

matrassos, el polímer que s'obtenia o bé no contenia monòmers insaturats o en alguns casos s'havia detectat un percentatge molt baix. Per això, es va intentar augmentar el percentatge de monòmers insaturats mitjançant la regulació del règim d'alimentació en els cultius amb bioreactor. Per això va ser necessari realitzar alguns ajustos en les condicions de cultiu.

Un dels principals problemes són les fonts de carboni. Ambdós substrats tenen punts de fusió al voltant de 20-25 °C i per tant solidifiquen a la temperatura de treball, de manera que dificulta l'ús de bombes peristàltiques en el subministrament dels substrats en el bioreactor, ja que s'obturen tots els tubs. Per això i per qüestions de solubilitat en el mateix bioreactor, es va decidir treballar amb les sals sòdica i potàssica del C11:1 i C11:0, respectivament. Prèviament es realitzaren alguns experiments en matrassos per tal d'estudiar el comportament dels substrats en forma de sals i ajustar la seva concentració. Possiblement, la concentració dels substrats emprada fins ara en els experiments en matrassos és massa alta per a treballar en bioreactor.

Producció de biomassa			
temps (h)	C11:1 (10 g/L)	NaC11:1 (10 g/L)	NaC11:1 (5+5 g/L)
0	0,015	0,015	0,015
24	0,02	1,10	0,76
36	0,54	2,23	1,95
48	2,18	2,38	1,95
72	2,31	2,89	4,41

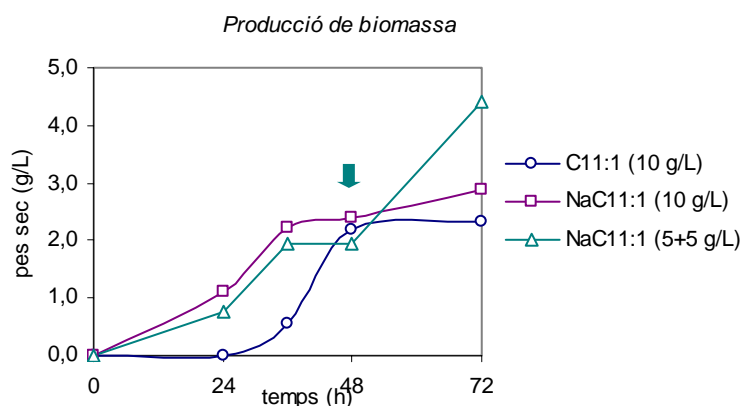


Figura 4.51. Cultius de *P. aeruginosa* 42A2, en medi MM1, 30 °C i 120 rpm. Cinètica de creixement emprant com a font de carboni àcid undecenoic (C11:1) i undecenoat sòdic (NaC11:1).

A la Figura 4.51 es comparen els resultats de producció de biomassa obtinguts en els diferents experiments realitzats emprant l'undecenoat sòdic (NaC11:1) com a substrat i prenent com a referència la producció de biomassa en els cultius amb 10 g/L d'àcid 10-undecenoic (C11:1).

Tal i com es pot veure s'ha preparat un cultiu discontinu amb 10 g/L de NaC11:1 i un cultiu discontinu de (5 g/L + 5 g/L) de NaC11:1. En la Figura 4.51 es mostren les corbes de creixement tant per l'àcid 10-undecenoic com per a l'undecenoat sòdic i es pot observar que quan es treballa amb aquest segon substrat, no tan sols es millora la producció de biomassa sinó que també es redueix la fase de latència.

Quan es subministra els 10 g/L de substrat en dos polsos de 5 g/L cadascun s'aprecia un augment considerable de la biomassa després de la segona addició de NaC11:1 a les 48h, assolint una producció de biomassa de 4,41 g/L a les 72 h de cultiu. Aquest valor està molt per damunt dels que s'han assolit en els altres dos experiments, 2,31 g/L i 2,89 g/L, per al cultiu discontinu amb C11:1 i el cultiu discontinu amb NaC11:1, respectivament. En el cas del cultiu discontinu amb els dos polsos de NaC11:1 s'ha quantificat el percentatge d'acumulació per cromatografia de gasos, obtenint a les 72 hores de cultiu, una acumulació de PHA del 22 % (p/p).

Quan es treballa amb NaC11:1, el substrat és completament soluble en el medi de cultiu i això fa que estigui més biodisponible pel microorganisme i ajuda a la reducció de la fase de latència.

En tots els processos en el bioreactor es treballa a 30 °C, pH =7,0 i es fixa la pO₂ (concentració d'oxigen dissolt) al 50 % . El pH es regula amb una solució d'àcid fosfòric (10 %) i la pO₂ es regula amb el cabal d'aire (0,5-5 L/min) i amb l'agitació (400-1400rpm).

4.2.2.1 Bioreactor HPR-F5

L'objectiu d'aquest bioreactor és l'obtenció de PHA a partir de dos substrats (NaC11:1 i KC11:0) mitjançant un cultiu alimentat. Així com també l'estudi de l'evolució i el comportament del cultiu amb aquestes noves condicions de cultiu.

Primerament, mitjançant una alimentació discontinua per polsos s'addicionarà el NaC11:1 fins a una concentració final en el cultiu de 5 g/L (27 mM). La segona font de carboni s'addicionarà mitjançant una alimentació continua fins a una concentració final en el bioreactor de 5 g/L (27 mM). Tant els polsos com el cabal continu de substrat dependrà de l'evolució del cultiu.

S'inocula el bioreactor amb un precultiu de 24 h emprant citrat sòdic (20mM) com a font de carboni. La concentració inicial de nitrogen és de $[N]=0,58$ g/L i la pO_2 inicial és del 100%. La pO_2 és un indicador del creixement del cultiu, així doncs a mesura que el cultiu creixi la pO_2 anirà disminuint fins al 50 %.

Un cop el bioreactor està inoculat s'addiciona un pols de 30 g de la primera font de carboni que equival a una concentració a dins del reactor de 3,6 mM. Es controla el consum de la font de carboni mitjançant mesures de TOC (Total Organic Carbon). S'observa que ràpidament les cèl·lules comencen a consumir la font de carboni, tal i com ho indica la pO_2 que va disminuint (línia blava del gràfic) i passades 6h de cultiu s'addicionen 70 g més de la sal sòdica del C11:1.

En la Figura 4.52, s'observa com al llarg de les següents 12 h hi ha creixement cel·lular, ja que no només ha disminuït el valor de la pO_2 sinó que per a mantenir el valor fixat de pO_2 al 50% hi ha hagut un augment de l'agitació (línia marró). El valor de l'agitació inicial s'havia fixat a 400 rpm i passades les 12 h de cultiu ha incrementat a 800 rpm (amb un pic de 900 rpm), indicant així un consum d'oxigen considerable. Malgrat que la font de carboni no s'ha consumit completament, s'addiciona un pols de 70 g de NaC11:1

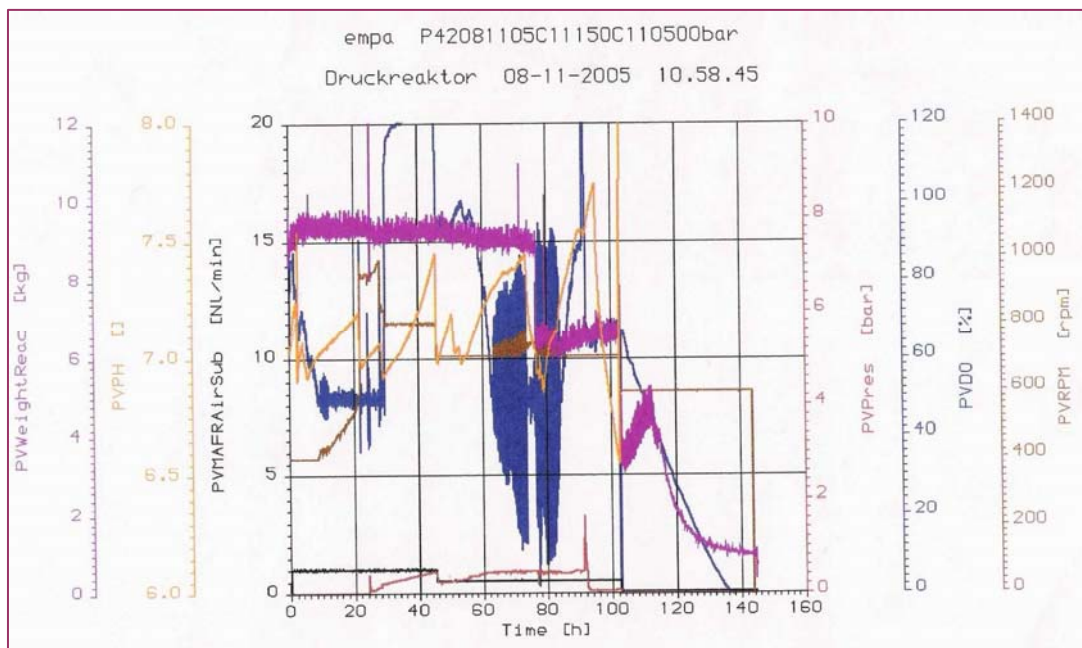


Figura 4.52. Cultiu alimentat de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. En el gràfic es mostra en diferents colors l'evolució dels paràmetres de cultiu: PO_2 (blau), el cabal d'aire (negre), el pH (taronja), l'agitació (rpm) (marró), pressió dins del bioreactor (vermell) i pes del cultiu (rosa).

Amb aquesta darrera addició la pO_2 es dispara com a conseqüència de la formació d'escuma en el medi de cultiu. Aquest augment d'escuma va acompanyat d'un augment de la pressió (color vermell) a dins del reactor tal i com es pot observar en el gràfic. El pH també augmenta fins a pH 7,5 i es necessari l'addició d'àcid. No és fins a les 60 h de cultiu que el sistema s'estabilitza i la PO_2 torna a decreïxer fins al 50 %. Es comprova que el nitrogen està pràcticament exhaurit a l'igual que la font de carboni, per això es torna a addicionar un pols de 35 g de NaC11:1. En les següents 3-4 h el consum de nitrogen i de font de carboni és molt ràpid i això es tradueix en un augment de la biomassa.

De totes maneres, al llarg de tot el procés s'ha observat la formació de biofilms de manera que el cultiu no és prou homogeni i fa pensar que els valors que s'obtenen de biomassa poden no ser prou representatius. A les 80 hores de cultiu els valors de TOC indiquen que el primer substrat ha estat pràcticament consumit i que també s'ha consumit tota la font de nitrogen. Es va addicionar un primer pols de 50 g del segon substrat, KC11:0, seguit d'un cabal d'alimentació constant de 0,4 mL/min. Com que la font de nitrogen està exhaurida és d'esperar que el creixement sigui baix i que el segon substrat es consumeixi per a la producció de PHA (veure Figura 4.53). Així doncs, al final del procés s'ha addicionat 25 mM de NaC11:1 i 27 mM de KC11:0. Al llarg del cultiu s'han realitzat dues anàlisis del contingut i composició del PHA acumulat: (1) a les 74 h de cultiu abans d'addicionar el segon substrat i (2) al final del procés quan s'havien addicionat els dos substrats.

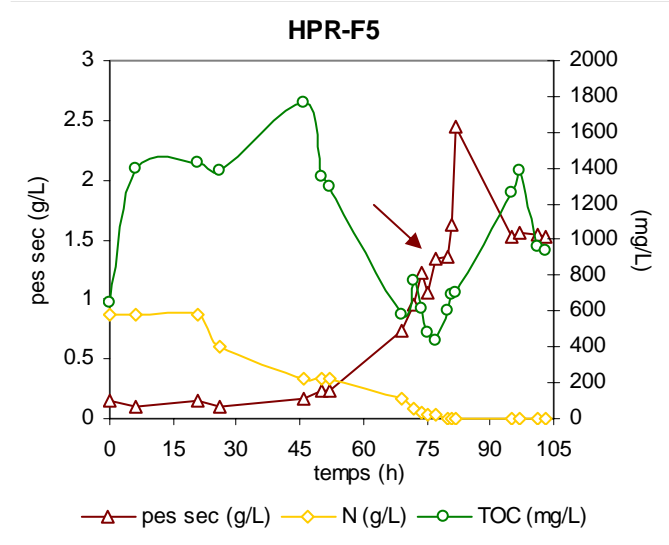


Figura 4.53. Bioreactor HPR-F5. La gràfica mostra el consum de font de nitrogen i font de carboni, conjuntament amb la producció de biomassa. La fletxa indica l'addició del segon substrat (KC11:0) a les 80 h de cultiu.

A les 74 h de cultiu, l'acumulació de PHA a partir de NaC11:1 és tan sols del 6 % (p/p) mentre que l'acumulació a les 103 h de cultiu ha augmentat fins al 39 % (p/p), indicant que majoritàriament el procés d'acumulació ha tingut lloc en la fase estacionària del cultiu i bàsicament a partir del la segona font de carboni (KC11:0), tal i com es reflecteix en la composició monomèrica del polímer (veure apartat 4.2.3).

De totes maneres, el fet que pràcticament no hagi produït PHA a partir del primer substrat es degut al fet que la relació (C/N) no era la òptima ja que la concentració de substrat era baixa. En els experiments en matrassos i treballant amb 10 g/L de substrat s'obtenia una acumulació de PHA del 8-10 % (p/p). En la primera etapa del procés, l'alimentació per polsos, a l'inici del cultiu, fa que la concentració de substrat sigui baixa i la presència de font de nitrogen alta, de tal manera que el microorganisme utilitza el primer substrat per a créixer i no és fins que la font de nitrogen s'ha exhaurit que comença a acumular. Aquest punt coincideix amb l'addició de la segona font de carboni, la qual cosa explicaria que el procés d'acumulació hagi tingut lloc en la fase estacionària del cultiu.

En la Taula 4.13 es resumeixen els resultats obtinguts en el bioreactor HPR-F5, així com també els rendiments del procés: rendiment cel·lular ($Y_{x/s}$) (g/L de biomassa/ g/L de substrat) i rendiment de producte ($Y_{p/s}$) (g/L PHA/ g/L de substrat).

Taula 4.1. Càlcul dels rendiments totals i parcials per a cadascuna dels substrats. En el procés HPR-F5 s'ha subministrat al cultiu 4,6 g/L de NaC11:1Δ10 i 5 g/L de KC11:0.

HPR F5	NaC11:1	KC11:0	total procés
Biomassa (g/L)	1,22	0,3	1,52
PHA (g/L)	0,09	0,50	0,59
PHA (%p/p)	7,10	31,90	39
temps (h)	74	29	103
$Y_{x/s}$	0,27	0,06	0,16
$Y_{p/s}$	0,02	0,10	0,06

El càlcul de rendiments del procés confirma que *P.aeruginosa* 42A2 ha emprat el primer substrat (NaC11:1) per a créixer, tal i com mostra el seu rendiment cel·lular, $Y_{x/s}=0,27$, molt superior al de la segona font de carboni (KC11:0), $Y_{x/s}=0,06$. En canvi, el rendiment de producte, $Y_{p/s}$, és més alt en el cas del segon substrat. Per tant, es confirma que en aquestes condicions de cultiu, *P. aeruginosa* 42A2 ha emprat el

NaC11:1 principalment per a la producció de biomassa i el KC11:0 per a la producció de polímer.

4.2.2.2 *Bioreactor HPR-F7*

L'objectiu d'aquest experiment és augmentar el percentatge de monòmers insaturats en la composició final del polímer. Bàsicament, es canviarà l'estratègia d'alimentació per tal de millorar el procés d'acumulació de PHA a partir del primer substrat (NaC11:1). L'objectiu és addicionar 54 mM de NaC11:1 (10 g/L) ja que en els experiments en matrassos s'aconseguia una acumulació del 21 % (p/p). Pel que fa a la concentració del segon substrat (KC11:0) es mantindrà igual, a 27 mM (5 g/L).

El reactor s'inocula amb un precultiu de 24 h de *P.aeruginosa* 42A2 en citrat sòdic (20mM) i una densitat òptica de 1.25. La PO₂ es fixa al 50 % i es regularà amb el cabal d'aire i amb l'agitació. El pH es fixa a pH 7 i es regularà amb l'addició d'àcid fosfòric.

S'inicia el cultiu amb un primer pols de 57.2 g de la solució de NaC11:1. D'acord amb el gràfic del procés (veure Figura 4.54), la fase de latència és tan sols de 4-5 h. A partir de les 5 h de cultiu s'observa una forta davallada de la pO₂ (línia blava) que a les 10 h de cultiu arriba al 50 % que és el valor que hem fixat. A partir d'aquí sembla que hi ha un fort creixement cel·lular ja que per tal de mantenir la pressió d'oxigen al 50% es necessari augmentar l'agitació fins a 500 rpm (línia marró) així com també el cabal d'aire de 0,5 a 1 L/min (línia negra). A les 19 h de cultiu, d'acord amb els valors obtinguts de TOC, s'ha consumit pràcticament tot el substrat (NaC11:1). Es torna a addicionar un pols de 42,8 g de NaC11:1. Aquesta segona addició es consumeix més ràpid i s'observa un augment de la biomassa. S'addicionen dos polsos de 50 g de NaC11:1Δ10 al llarg de les següents 24 h. Per tant, a les 44 h de cultiu, ja s'ha addicionat 5 g/L de NaC11:1, la mateixa quantitat que en el bioreactor HPR-F5 s'havia addicionat en 74 h. Entre les 36 h i 42 h torna a haver-hi una etapa de creixement i es necessari regular la pO₂ (línia blava) amb l'agitació (línia marró) així com també amb el cabal d'aire (línia negra). A les 52 h de cultiu es detecten problemes en la sonda de pH i es decideix fixar el pH a 7,5.

Com el consum de font de carboni és bo i el cultiu està en fase exponencial és dóna un pols de 150 g de font de carboni. Malgrat que el substrat s'ha anat consumit també s'ha format molta escuma que ha fet que hi hagi sobrepressió dins del reactor

(línia vermella). En les successives mesures de biomassa i de densitat òptica s'observa un decreixement com a conseqüència del "rentat parcial" del cultiu.

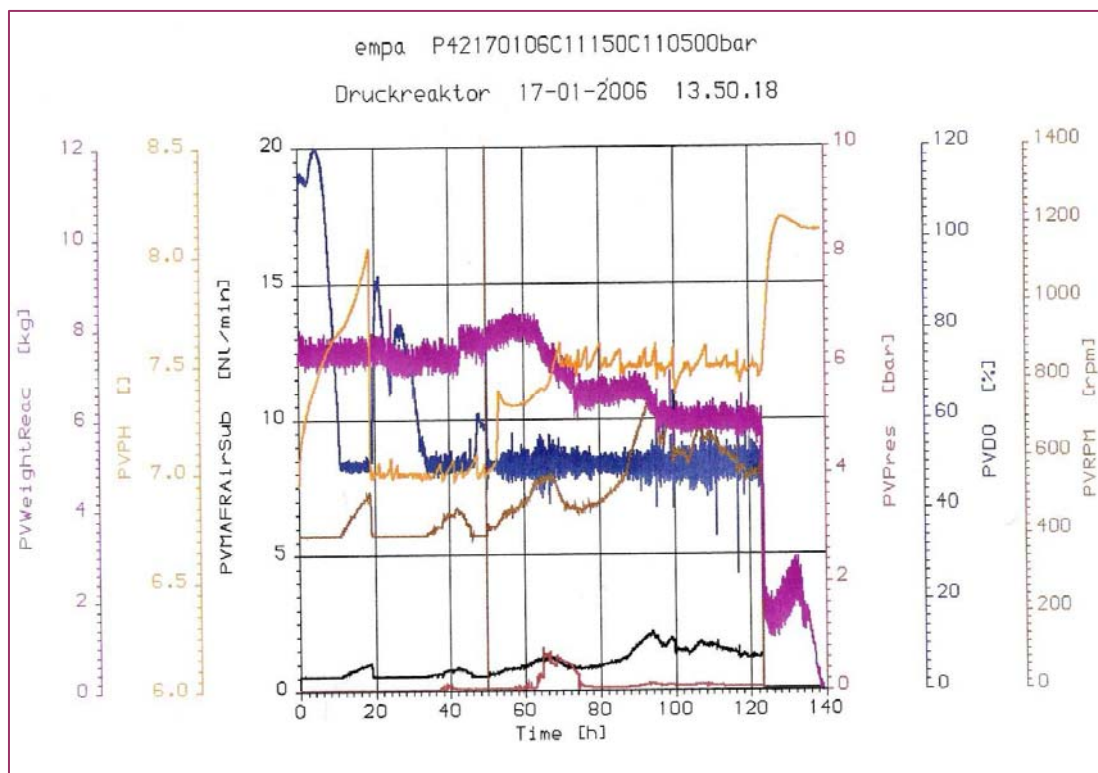


Figura 4.54 Cultiu discontinu alimentat de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 en el procés HPR-F7. En el gràfic es pot observar les successives addicions de substrat. També es mostra en diferents colors l'evolució dels paràmetres de cultiu: PO₂ (blau), el cabal d'aire (negre), el pH (taronja), l'agitació (rpm) (marró), pressió dins del bioreactor (vermell) i pes del cultiu (rosa). També es mostra la regulació de la PO₂ amb la velocitat d'agitació i el cabal d'aire.

Malgrat que s'utilitza un trencador d'espuma mecànic no és suficient i s'addicionen 10 mL d'antiespumant (PPG). Malgrat tot, tal i com es pot veure en el gràfic s'han perdut 2-3 litres de cultiu amb el procés de foaming out. Tot i que a les 75h de cultiu la formació d'espuma no s'ha aconseguit controlar es decideix continuar amb el procés. A les 90 h de cultiu, la formació d'espuma ha disminuït i el cultiu continua creixent tal i com es pot observar en el gràfic de la Figura 4.54. També s'observa un augment del cabal d'aire fins a 2,0 L/ min i sobretot destacar l'augment de l'agitació fins a 720 rpm.

A les 95 h de cultiu s'ha subministrat NaC11:1 per a una concentració final en el bioreactor de 42 mM (7,8 g/L) i s'ha consumit tota la font de nitrogen. Tot i que no s'ha addicionat la concentració prevista del primer substrat es decideix començar a addicionar el segon substrat (KC11:0). Un cop el sistema està estabilitzat i malgrat

haver perdut part del volum del cultiu, es subministra la segona font de carboni seguint una estratègia d'alimentació discontinua, és a dir, es subministra el KC11:0 amb polsos.

Taula 4.13. HPR-F7. Cultiu discontinu alimentat de *P. aeruginosa* 42A2 amb 42mM NaC11:1 i 20 mM KC11:0. En la taula es mostra la concentració de biomassa, pes residual i PHA en funció del temps, així com també la concentració de N i TOC al llarg del procés HPR-F7. En aquest bioreactor s'ha seguit una estratègia d'alimentació discontinua per polsos per ambdues fonts de carboni.

temps (h)	p. sec (g/L)	PHA (g/L)	p.residual (g/L)	% PHA (p/p)	N (g/L)	TOC (mg/L)
0	0,04	-	-	-	0,581	550
19	0,36	-	-	-	0,407	462
22	0,02	-	-	-	0,233	723
24	-	-	-	-	0,233	400
25	-	-	-	-	0,233	869
44	0,20	-	-	-	0,233	791
45	0,21	-	-	-	0,233	1128
48	0,28	-	-	-	0,233	1297
52	0,30	-	-	-	0,233	1075
54	-	-	-	-	0,233	3280
67	0,64	-	-	-	0,116	2735
68	0,70	-	-	-	0,116	2077
69	0,58	0,14	0,44	23,72	0,116	2395
72	0,34	-	-	-	0,116	1818
75	0,3	0,07	0,23	22,14	0,116	1836,5
93	2,1	0,22	1,88	10,67	0,058	1496
94	1,8	-	-	-	0,023	1031
95	1,9	0,20	1,70	10,64	0,023	1041
99	1,8	0,36	1,44	19,99	0,0	1079
100	2,56	0,47	2,09	18,45	0,0	1429
116	2,78	0,85	1,93	30,63	0,0	918
118	2,68	-	-	-	0,0	817
121	2,46	0,88	1,58	35,93	0,0	915
123	2,36	0,86	1,50	36,27	0,0	1047,5

Al llarg de les següents 24 h, s'addicionaran 4 polsos del segon substrat (KC11:0) fins a arribar a una concentració final en el bioreactor de 20 mM (3,7 g/L). Tal i com es reflecteix en les dades (Taula 4.13), durant l'addició del segon substrat s'observa un augment considerable de la biomassa. Així doncs, al final del procés s'ha addicionat NaC11:1 (42 mM) i KC11:0 (20 mM).

En la Taula 4.13 hi ha tabulats els valors de biomassa (g/L), PHA (g/L), N i TOC (mg/L) recollits al llarg del procés HPR-F7. La barra grisa indica l'inici de la segona fase del cultiu, és a dir, l'addició del segon substrat. Com a conseqüència del poc creixement cel·lular no es va poder recollir mostres de biomassa fins a les 69 h de cultiu. Tot i obtenir valors de biomassa baixos, les anàlisis de CG mostren una millora en el rendiment de producció de PHA a partir del primer substrat respecte al

percentatge d'acumulació de PHA obtingut en el bioreactor HPR-F5. El contingut de PHA a les 69 h de cultiu és del 23% (p/p) respecte el 6% (p/p) obtingut en el procés del bioreactor HPR-F5.

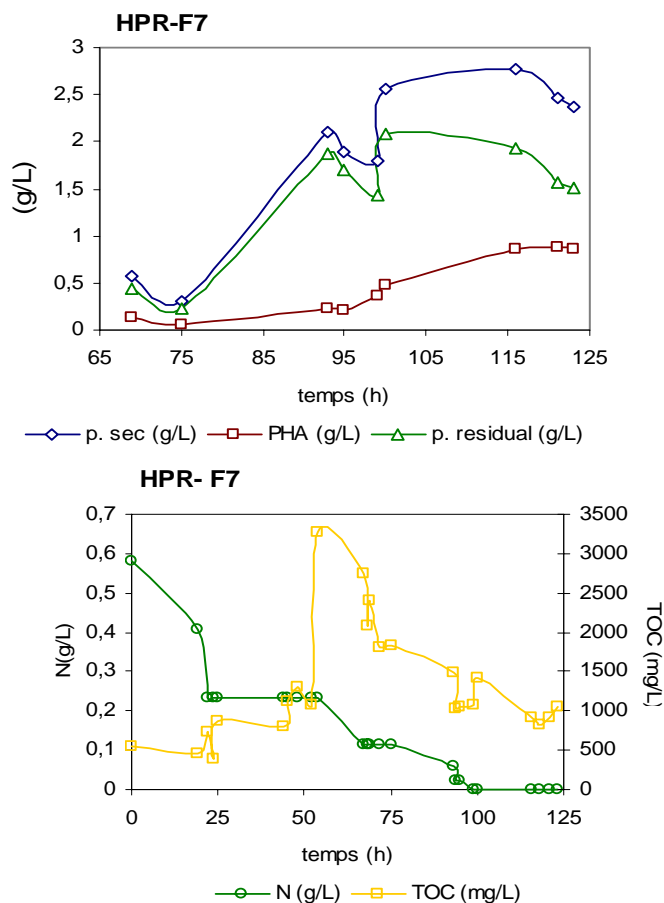


Figura 4.55. En la primera gràfica es mostra l'evolució (biomassa i PHA) del cultiu després del procés de formació d'espuma. En la segona gràfica ens mostra l'evolució dels NO_3^- i el consum de la font de carboni (TOC) al llarg de tot el procés.

D'acord amb els resultats obtinguts, sembla ser que l'acumulació de PHA comença en l'etapa de creixement, quan encara no s'ha consumit tota la font de nitrogen, a diferència del que s'observava en el procés del bioreactor anterior. Aquest fet és conseqüència de la millor relació (C/N), ja que per a la primera font de carboni, en el procés del bioreactor HPR-F5, la relació (C/N) era de 7,2 mentre que en el procés HPR-F7 és de 12,4.

En la Figura 4.55 es veu clarament que l'acumulació de la segona font de carboni té lloc en la fase estacionària, en canvi sembla que l'acumulació del primer substrat ha tingut lloc en la fase de creixement.

Durant el període, on no s'ha pogut controlar l'escuma, entre (67-75 h de cultiu), hi ha hagut un "rentat" del cultiu, tal i com es pot observar amb la davallada dels valors de biomassa i de producció de PHA (Figura 4.55). Un cop estabilitzat el cultiu, s'observa com els valors de biomassa són els esperats, 2 g/L aproximadament, però en canvi el percentatge d'acumulació ha disminuït fins al 10% (p/p). Possiblement el fet que el cultiu no sigui homogeni i la pèrdua de l'espuma formada en el bioreactor amb els tres litres de cultiu de la part superior del tanc, ha influït en la disminució del percentatge d'acumulació de PHA, ja que la distribució i densitat de les cèl·lules a l'espuma respecte el cultiu és asimètrica. De totes maneres, a les 95 h de cultiu es subministra el segon substrat i en tan sols 4 h, el percentatge d'acumulació puja fins a un 20% (p/p) (Figura 4.56). A mesura que es va addicionant la segona font de carboni, el percentatge d'acumulació augmenta tal i com es pot veure en la gràfica, fins arribar al 36 % (p/p).

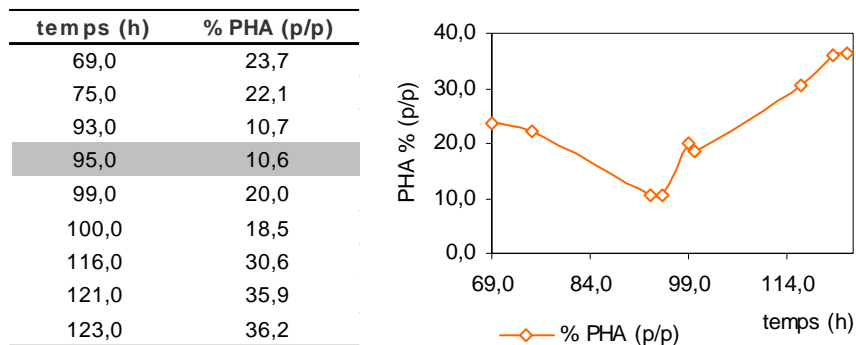


Figura 4.56. Bioreactor HPR-7. Percentatges d'acumulació de PHA obtinguts en el cultiu alimentat de *P. aeruginosa* 42A4. La segona font de carboni s'ha addicionat a les 95 h de cultiu.

Al llarg del procés s'han agafat mostres a diferents temps de cultiu per tal determinar el contingut com la composició del PHA acumulat. A continuació, en la Figura 4.57, es mostra el resultat de les anàlisis de cromatografia de gasos, en el quals s'ha determinat el contingut total de PHA de la mostra així com també la seva composició monomèrica.

Tot i el descens en el contingut de PHA total, degut al procés de formació d'espuma entre les 75-95 h de cultiu, sembla que la composició monomèrica relativa del polímer s'ha mantingut. El PHA format a partir del primer substrat conté tres unitats monomèriques diferents: C_{7:1}, C_{9:1} i C_{11:1}. Després de l'addició de l'undecanoat potàssic, el percentatge de PHA total ha augmentat considerablement i la composició relativa dels monòmers varia degut a la inserció d'unitats monomèriques procedents del segon substrat. Tant en el cas del PHA format a partir del primer substrat com en el PHA format a partir del segon substrats, el monòmers majoritaris són el C_{9:1} i el C_{9:0}. Al final del procés s'ha aconseguit una acumulació de PHA del 36 % amb un percentatge del 35 % de monòmers insaturats. Aquest resultat confirma que en aquestes condicions de cultiu i amb aquest règim d'alimentació, *P. aeruginosa* 42A2 ha emprat majoritàriament el primer substrat per a créixer i el segon substrat per a produir PHA.

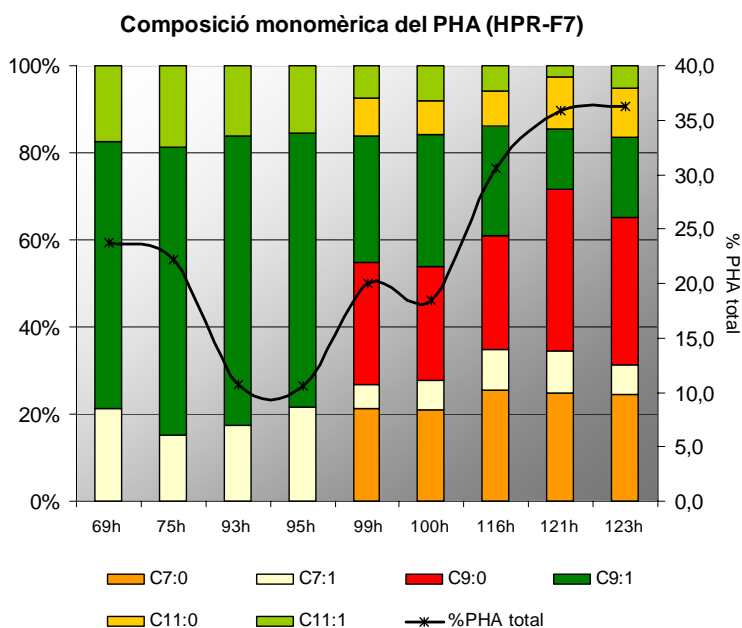


Figura 4.57. Composició monomèrica del PHA obtingut del cultiu en bireactor (HPR-F7) de *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrats l'undecanoat sòdic (NaC11:1) i l'undecanoat potàssic (KC11:0).

Una de les qüestions que es plantejava era estudiar que passava amb el PHA acumulat quan s'addicionava una segona font de carboni. Per tal de saber si el contingut de monòmers insaturats varia al llarg de la segona etapa del cultiu, per això s'ha calculat el percentatge relatiu de monòmers saturats i insaturats. Per això s'ha

multiplicat el percentatge de monòmers insaturats a diferents temps de cultiu en polímer pel percentatge d'acumulació total de PHA. També s'ha realitzat aquest càlcul per els monòmers saturats. El resultat s'ha representat en la Figura 4.58, on es pot observar que el percentatge relatiu de monòmers insaturats es manté constant després de l'addició del segon substrat. En canvi, el percentatge relatiu de monòmers saturats, augmenta amb el temps just després de l'addició del KC11:0 a les 95 h de cultiu.

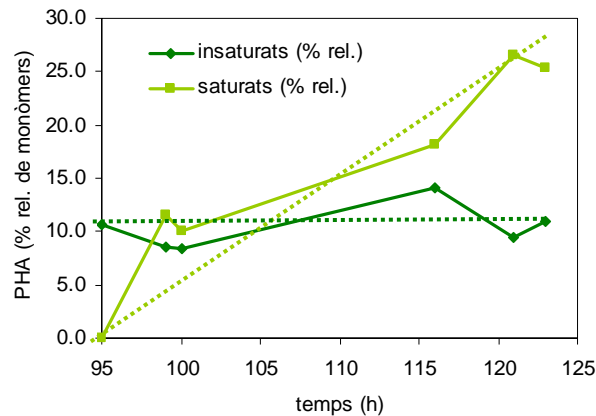


Figura 4.58. Percentatges relatius dels monòmers insaturats i dels monòmers saturats a diferents temps de cultius en el PHA obtingut en el procés HPR-F7.

Així doncs sembla que per a sintetitzar el PHA a partir del segon substrat, el bacteri no necessita biodegradar el PHA ja acumulat. Així doncs, tot sembla indicar que *P. aeruginosa* 42A2 que, quan s'utilitza undecenoat sòdic i undecanoat potàssic com a substrats, el polímer reflecteix la composició dels substrats inicials.

En la Taula 4.14, s'han resumit els valors obtinguts de biomassa (g/L), PHA (g/L), així com també els rendiments per a cadascuna de les fonts de carboni per separat i els rendiments globals.

Taula 4.14. Resum dels resultats obtinguts en el bioreactor HPR-F7. En la taula es mostren els rendiments del procés, $Y_{x/s}$ i $Y_{p/s}$. Al llarg del cultiu s'han subministrat 7,8 g/L de NaC11:1 i 3,7 g/L de KC11:0.

HPR F7	NaC11:1	KC11:0	total procés
Biomassa (g/L)	1,9	0,56	2,46
PHA (g/L)	0,2	0,68	0,88
PHA (%p/p)	10,6	25,4	36
temps (h)	95	26	121
$Y_{x/s}$	0,24	0,15	0,21
$Y_{p/s}$	0,03	0,18	0,08
$Y_{x/N}$			4,24

D'acord amb aquests valors, sembla que el microorganisme ha emprat el primer substrat per créixer i el segon substrat per a la producció de PHA. No obstant, cal recordar que la primera part del procés s'ha vist afectada per la formació d'espuma i la pèrdua de biomassa. D'acord amb les dades obtingudes abans de la formació d'escuma el percentatge d'acumulació era del 23 %. Per tant, això fa pensar que amb l'alimentació en polsos, s'aconsegueix que el microorganisme comenci a acumular ja des de la fase de creixement.

4.2.2.3 Bioreactor HPR-F9

La pO_2 per aquest procés l'hem fixat al 50 % i estarà regulada pel cabal d'aire (0,5-5 L/min) i l'agitació (400-1400 rpm). Es treballarà a pH 7 i es regularà amb àcid fosfòric. L'agitació i el cabal d'aire inicials són de 400 rpm i 0,5 L/min, respectivament.

L'objectiu d'aquest experiment és tornar a repetir les mateixes condicions assajades al bioreactor anterior (HPR-F7). Degut als problemes amb la formació d'escuma no és va arribar a addicionar tota la font de carboni. Per tant, en aquest procés es tornarà a intentar addicionar NaC11:1 (54 mM) i KC11:0 (27 mM).

Aquesta vegada però es combinaran dos règims d'alimentació: alimentació discontinua per polsos i alimentació continua, variant el cabal d'alimentació en funció de les necessitats del cultiu.

S'inocula el reactor HPR-F9 amb el pre-cultiu de 24 h de *P.aeruginosa* 42A2 en citrat sòdic (20mM), amb una densitat òptica de 1.29.

Inicialment es subministra un primer pols de 30,1 g de NaC11:1 i passades 2 h de cultiu es torna a subministrar un segon pols de 20 g de substrat. Tal i com s'observa en la Figura 4.59, la fase de latència és tan sols de 4 h, ja que a partir de les 4 h de cultiu s'observa un descens brusc de la pO_2 (línia blava) que ens indica que el cultiu ha començat a créixer. A partir de les 14 h de cultiu, es necessari regular la pO_2 amb l'agitació (línia marró) i el cabal d'aire (línia negra). En aquest moment es tornar a subministrar un pols de 50 g de NaC11:1 que es consumeix molt ràpidament ja que comença la fase exponencial. Per això a les 24 h de cultiu es torna a addicionar un quart pols de 40 g de substrat i es fixa una alimentació continua a un flux de 0,15 mL/min.

Els valors de TOC indiquen que la font de carboni s'està acumulant en el medi de cultiu, el cabal d'alimentació escollit és massa alt respecte la velocitat de consum de

substrat. Degut a l'acumulació de substrat en el medi de cultiu es forma escuma que es controla amb l'addició de 2 mL d'antiespumant (PPG). A les 40h de cultiu ja s'ha addicionat 5,7 g/L de NaC11:1.

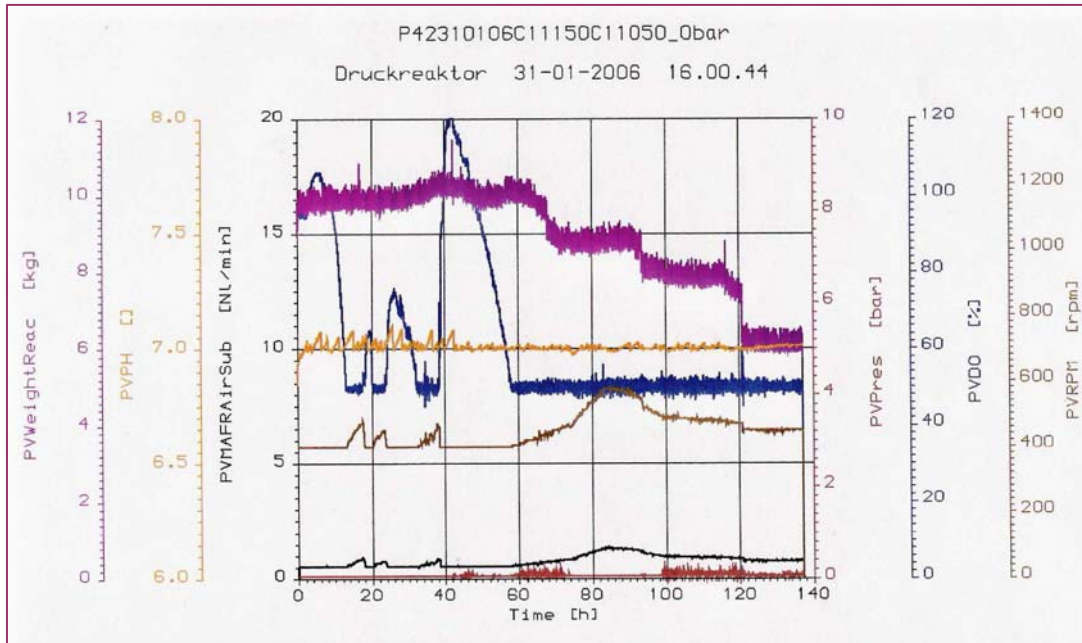


Fig.4.59. Gràfic del procés fermentatiu per al bioreactor HPR-9. Al llarg del procés s'ha mantingut la pO_2 al 50%. En el gràfic hi ha representats els següents paràmetres: la pO_2 (blau), la velocitat d'agitació (rpm) (marró), el pH (taronja), el cabal d'aire (negre) i finalment la pèrdua de massa corresponent a les presa de mostra (rosa).

A les 50 h de cultiu, un cop tenim el cultiu estabilitzat, es torna a fixar una alimentació continua amb un flux de 0,08 mL/min. A partir de les 60 h sembla que el creixement cel·lular és més ràpid i la demanda de substrat és més alta, tal i com es pot veure en l'augment considerable de l'agitació i el cabal d'aire per a mantenir la PO_2 al 50 %. Per això a les 72 h s'augmenta el cabal d'alimentació continu a 0,20 mL/min. A les 75h de cultiu ja s'ha addicionat 8,9 g/L de la primera font de carboni.

No es fins a les 93 h de cultiu que es comença a subministrar el segon substrat KC11:0. Com que els valors de TOC són una mica alts s'addiciona un primer pols de 22 g de KC11:0 i es fixa un cabal d'alimentació continu de 0,15 mL/min. D'acord amb el gràfic de la Figura 4.59, a les 100 h de cultiu, s'observa com l'agitació i el cabal d'aire recuperen els valors normals, indicant que el cultiu ha disminuït la velocitat de creixement. Per tant, és d'esperar que a partir d'aquest moment, el percentatge d'acumulació de PHA sigui alt. Per tal d'evitar l'acumulació de substrat en el medi de cultiu i la formació d'espuma, es redueix el cabal d'alimentació continu a 0,10 mL/min.

S'atura l'addició de substrat quan s'ha addicionat 170 g de KC11:0 (4,6 g/L). Així doncs, al final del procés s'ha addicionat 8,9 g/L de NaC11:1Δ10 i 4,6 g/L de KC11:0, o el que és el mateix 48 mM de NaC11:1Δ10 i 25.5 mM de KC11:0.

En la Taula 4.15 es mostren totes les dades del procés i s'ha marcat en gris el començament de l'addició de la segona font de carboni (93 h de cultiu).

Taula 4.15. HPR-F9. En la següent taula es mostren la producció de biomassa (g/L), de PHA (g/L), el consum de la font de N (g/L) i els valors de TOC (mg/L) al llarg del procés. L'addició del segon substrat (K-C11:0) està indicada en color gris.

temps (h)	pes sec (g/L)	PHA (g/L)	p. residual (g/L)	%PHA (p/p)	N (g/L)	TOC (mg/L)
0	0,06	-	-	-	0,581	383,6
16,5	0,16	-	-	-	0,233	429,45
20	-	-	-	-	0,233	629
23	0,18	-	-	-	0,233	608
24	-	-	-	-	0,233	987
40	0,06	-	-	-	0,233	1789
45	0,12	-	-	-	0,233	1756,5
48,5	0,10	-	-	-	0,116	1507,5
49,5	0,18	-	-	-	0,087	1254
64	0,46	-	-	-	0,041	1753
65	0,50	0,11	0,39	21,96	0,041	1557
66	0,44	-	-	-	0,041	1585
67	0,50	0,11	0,39	21,39	0,032	1682
69	0,56	-	-	-	0,032	1604
70,5	0,56	0,14	0,42	24,34	0,032	1678
72,5	-	-	-	-	0,032	1832
73	0,50	-	-	-	0,032	1781
74	-	-	-	-	0,023	-
90	1,36	-	-	-	0,0	1893
91	1,32	0,35	0,97	26,48	0,0	1571,5
93	1,20	0,38	0,82	31,37	0,0	1539
94	-	-	-	-	0,0	1614,5
98	1,74	0,56	1,18	32,17	0,0	1747,5
116	3,42	1,65	1,77	48,1	0	2299
118	3,78	1,52	2,26	40,1	0,0	3316
120	3,60	1,82	1,78	50,5	0,0	3050

En els següents gràfics es pot observar com a les 48 h de cultiu, el N està pràcticament exhaurit. Els valors de biomassa que s'obtenen en els cultius en bioreactor són més baixos als obtinguts en els cultius en matrassos. Aquesta diferència en els valors de biomassa, possiblement, es pot explicar per la formació de biofilms que fan que el cultiu sigui poc homogeni. En canvi, el percentatge d'acumulació és del 30 % (p/p), per tant, sembla ser doncs que tot i que la producció de biomassa és molt baixa, el procés

d'acumulació és bo, obtenint-se una acumulació de PHA del 50 % (p/p) al final del procés (veure Figura 4.61).

Tal i com es veu en la Figura 4.60, en la gràfica inferior, a les 48 h de cultiu s'ha consumit pràcticament tot el nitrogen del medi.

Amb l'addició del segon substrat a les 93 h de cultiu, no només s'observa un augment de la biomassa, com a conseqüència de l'acumulació de PHA, sinó que també hi ha un augment considerable de la biomassa residual.

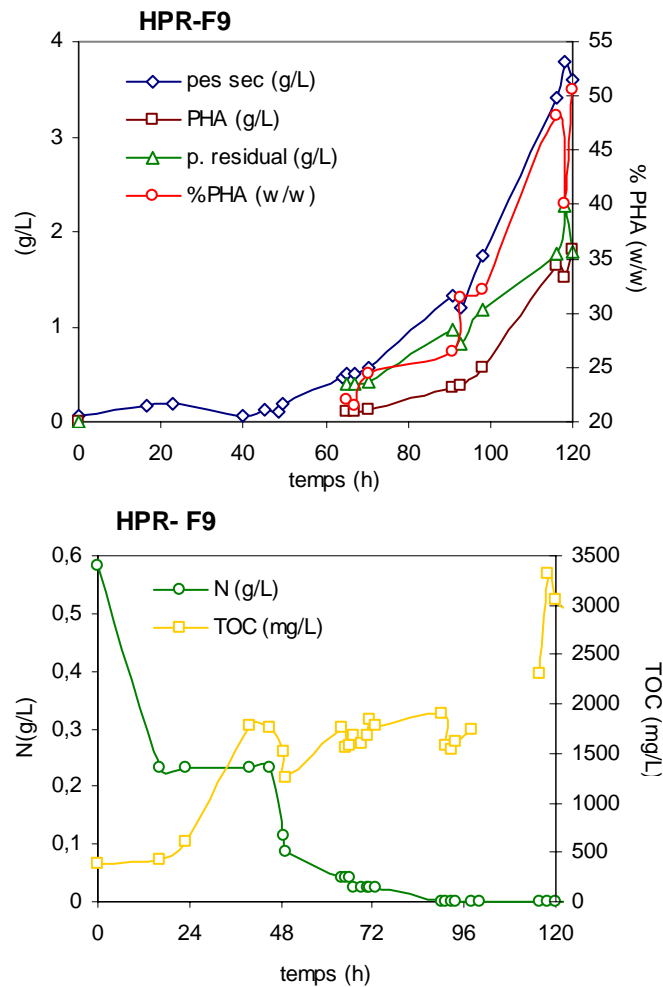


Figura 4.60. Evolució del cultiu en el bioreactor HPR-F9. En la primera gràfica es mostra la biomassa (g/L), el pes residual (g/L), el PHA (g/L) i el % acumulació de PHA. La segona gràfica ens mostra el consum de font de N (g/L) i de font de carboni, (TOC, mg/L).

En la Figura 4.61 es mostra la cinètica d'acumulació de PHA al llarg del procés. Anàlogament al que ha passat amb els altres processos, no s'ha pogut agafar mostra del

cultiu per a fer mesures de concentració de PHA fins a les 65 h de cultiu, on el percentatge d'acumulació és del 22 % (p/p). Aquest resultat és semblant al que s'ha obtingut en el procés HPR-F7, on a les 69 h de cultiu el percentatge d'acumulació és del 23 % (p/p). Aquest és el punt on en l'altre procés van haver-hi problemes amb la formació d'espuma.

En aquest bioreactor, la formació d'escuma ha estat més controlada, de manera que s'ha pogut continuar addicionant el NaC11:1 fins a aconseguir un percentatge d'acumulació del 31 % (p/p) a les 93 h de cultiu. Aquest és el millor resultat obtingut fins ara, tant en els experiments en matrassos com en bioreactor. A partir de les 93 h de cultiu s'addiciona el segon substrat, KC11:0, fins a obtenir un percentatge d'acumulació de PHA del 51 % (p/p) a les 120 h de cultiu.

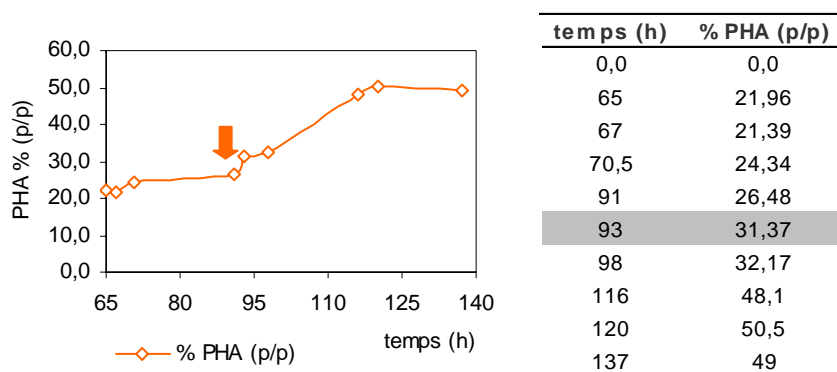


Figura 4.61. Bioreactor HPR-F9. Cinètica d'acumulació de PHA. S'indica amb una fletxa el punt on comença l'addició, a les 95 h de cultiu, de la segona font de carboni (KC11:0).

Les anàlisis de cromatografia de gasos ens indiquen que el PHA sintetitzat a partir del primer substrat està compost, com en el cas del PHA del bioreactor HPR-F5, per tres tipus diferents de monòmers: C7:1, C9:1 i C11:1. Anàlogament al PHA obtingut en l'anterior bioreactor (HPR-F5), la unitat monomèrica majoritària és la C9:1Δ8 (Figura 4.62).

Tal i com s'observa en la gràfica, a partir de l'addició del segon substrat hi ha hagut certes dificultats en les anàlisis. Ha estat molt difícil poder separar cromatogràficament les parelles monomèriques (C7:1+C7:0) i (C9:1+C9:0). Malgrat que els percentatges d'acumulació i la proporció entre monòmers insaturats/monòmers

saturats és diferent en els processos HPR-F5 i HPR-F7, els monòmers majoritaris són el C9:1 i C9:0. El PHA total acumulat és del 50 % (p/p) i conté un 59% de monòmers insaturats.

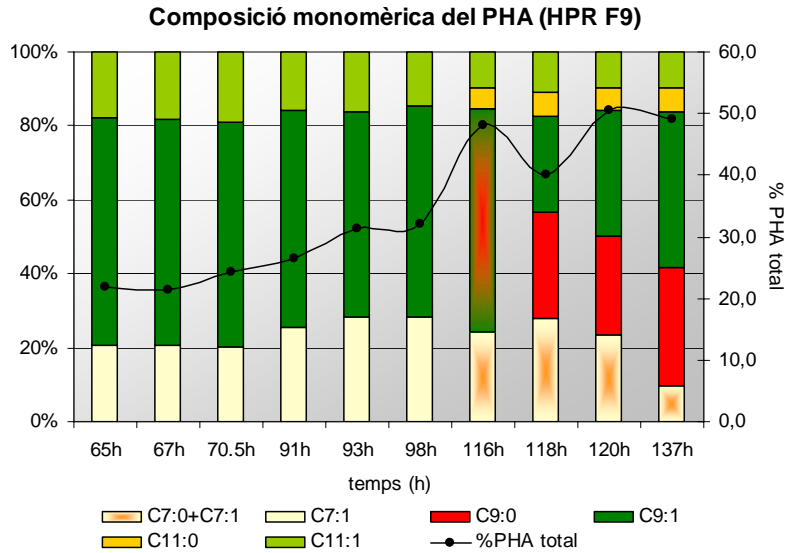


Figura 4.62. Composició monomèrica del PHA obtingut del cultiu en bioreactor (HPR-F9) de *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrats l'undecenoat sòdic (NaC11:1) i l'undecanoat potàssic (KC11:0).

Tal i com mostra la Figura 4.63, el percentatge relatiu de cadenes insaturades es manté constant durant el procés d'acumulació de PHA a partir del segon substrat. Una vegada més sembla que no hi despolimerització del PHA ja acumulat.

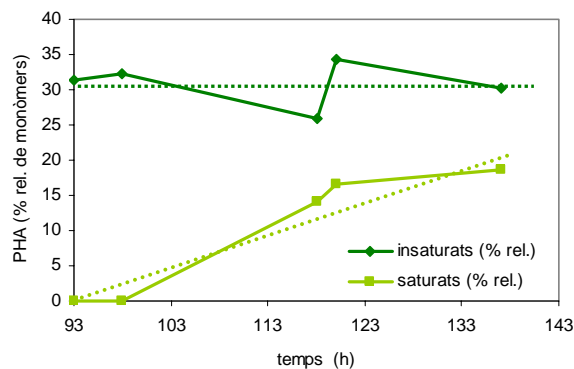


Figura 4.63. Percentatges relatius dels monòmers insaturats i dels monòmers saturats a diferents temps de cultius en el PHA obtingut en el procés HPR-F9.

El rendiments globals de producció de biomassa i de PHA, en aquest bioreactor són molt millors als obtinguts anteriorment en els bioreactors HPR-F5 i HPR-F7. Els valors

de TOC (veure Taula 4.16) indiquen que en el medi de cultiu encara hi ha NaC11:1 residual abans d'addicionar el segon substrat. Per tant, és d'esperar que els rendiments parcials calculats en la segona part del procés, no siguin estrictament relatius a la segona font de carboni. D'acord amb els valors de la Taula 4.16, la producció de PHA (g/L) a partir del KC11:0 és de 1,4 (g/L), però possiblement existeix un període de temps on les dues fonts estan presents en el medi de cultiu, i per tant l'acumulació podria ser deguda a ambdós substrats.

Taula 4.16. Resum dels resultats obtinguts en el bioreactor HPR-F9. En la Taula es mostren els rendiments del procés, $Y_{x/s}$ i $Y_{p/s}$. Al llarg del cultiu s'han subministrat 8,9 g/L de NaC11:1 i 4,6 g/L de KC11:0.

HPR F9	NaC11:1	KC11:0	total procés
Biomassa (g/L)	1,2	2,4	3,6
PHA (g/L)	0,4	1,4	1,8
PHA (%p/p)	31,4	18,6	50,0
temps (h)	93,0	27,0	120,0
$Y_{x/s}$	0,1	0,5	0,3
$Y_{p/s}$	0,04	0,3	0,1
$Y_{x/N}$			6,2

4.2.2.4. Bioreactor HPR-F10

La pO_2 o concentració d'oxigen dissolt en el medi, s'ha fixat al 50 % i estarà regulada pel cabal d'aire (0,5-5 L/min) i l'agitació (400-1400 rpm). Es treballarà a pH 7 i es regularà amb àcid fosfòric. L'agitació i el cabal d'aire inicials són de 400 rpm i 0,5 L/min, respectivament.

L'objectiu d'aquest experiment és tornar a repetir les mateixes condicions assajades al bioreactor anterior (HPR-F9) i aquesta vegada poder addicionar tota la font de carboni (54 mM NaC11:1 i 27 mM KC11:0) i intentar reduir el temps de cultiu. En aquest procés també s'empraran dos règims d'alimentació: alimentació discontinua per polsos i alimentació continua, variant el cabal d'alimentació en funció de les necessitats del cultiu.

S'inocula el reactor HPR-F10 amb el pre-cultiu de 24 h de *P.aeruginosa* 42A2 en citrat sòdic (20mM), amb una densitat òptica de 1.42.

Es comença el cultiu addicionant un pols de 50 g de NaC11:1 i tal i com es pot veure en la gràfica del procés no és fins al cap de 6-8 h que la pO_2 (línia blava) disminueix fins a

al 50 % i per tant el cultiu comença a créixer. A les 17 h de cultiu es torna a addicionar un pols de 50 g de NaC11:1. Les anàlisis de TOC indiquen que el consum de font de carboni és ràpid i per tant a les 28 h de cultiu es decideix programar, al llarg de les següents 10 hores, un cabal d'alimentació de 0,10 mL/min.

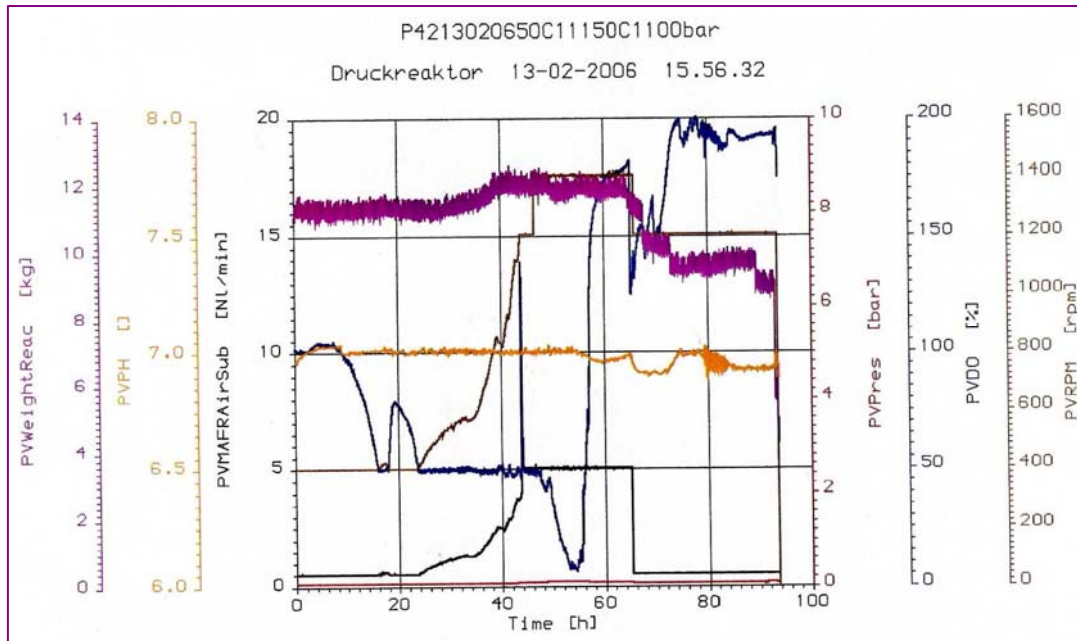


Figura 4.64. Gràfic del procés fermentatiu per al bioreactor HPR-10. Al llarg del procés s'ha mantingut la pO_2 al 50%. En el gràfic hi ha representats els següents paràmetres: la pO_2 (blau), la velocitat d'agitació (rpm) (marró), el pH (taronja), el cabal d'aire (negre) i finalment la pèrdua de massa corresponent a les presa de mostra (rosa).

A les 40 h de cultiu, l'agitació i el cabal d'aire es disparen arribant al nivell màxim, 1400 rpm i 5 L/min. Aquest fet ens està indicant que la demanda d'oxigen en el medi de cultiu és molt alta i per tant s'hauria de traduir en un creixement cel·lular considerable. Però el valors obtinguts de biomassa, densitat òptica i el mateix aspecte del cultiu no ho indiquen així. A les 40 h de cultiu ja s'han addicionat 150 g de NaC11:1 i com que els valors de TOC continuen essent baixos es decideix tornar a aplicar un cabal d'alimentació de 0,15 mL/min. durant 3 hores. Els valors de TOC continua essent baixos i la demanda d'oxigen alta, es decideix augmentar el cabal d'alimentació a 0,30 mL/min. i es manté durant 3 hores. A les 48 hores de cultiu s'han addicionat 245 g de NaC11:1. Degut a la formació d'espuma, s'addicionen 1,5 mL de PPG al medi de cultiu. De totes maneres continua constant molt mantenir la pO_2 al 50% i de fet a les 50 h de cultiu la pO_2 cau fins pràcticament a zero. Això fa que sigui

necessari subministrar O_2 (flux de 4,6 mL/min.) al medi de cultiu. Mentrestant, es continua subministrant el NaC11:1 amb un cabal d'alimentació continu de 0,12 mL/min. fins a les 65 h de cultiu quan a més a més es retira el flux d' O_2 ja que la PO_2 s'ha augmentat fins al 200 %. Totes aquestes oscil·lacions en la pO_2 fan pensar que hi ha algun problema amb la sonda d' O_2 . Possiblement degut a la formació dels biofilms no funciona correctament. El problema és que possiblement el cultiu s'ha hiperoxigenat i l' O_2 podria ser tòxic per als bacteris. De totes maneres, es va decidir continuar, perquè l'aspecte del cultiu era bó. A les 71 h de cultiu es subministra el KC11:0 amb un cabal d'alimentació de 0,12 mL/min. fins a l'addició de 115,4 g de substrat, és a dir, per una concentració final en el medi e cultiu de 17,31 mM de KC11:0. El procés es para a les 94 h de cultiu. Tot i els problemes amb la sonda d' O_2 , l'aspecte és bo. La única diferència és la formació d'un pigment lilòs insoluble i la formació d'espuma.

Taula 4.17. HPR-F10. En la següent Taula es mostren la producció de biomassa (g/L), de PHA (g/L), el consum de la font de N (g/L) i els valors de TOC (mg/L) al llarg del procés. Indicat en color gris es mostra el temps d'addició del segon substrat (K-C11:0). Cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 en règim combinat d'alimentació discontinu i continu emprant com a substrat NaC11:1 (42 mM) i KC11:0 (17 mM)

temps (h)	pes sec (g/L)	PHA (g/L)	pes residual (g/L)	% PHA (p/p)	[N] (g/L)	TOC (mg/L)
0	0,06	-	-	-	0,581	769
17	0,06	-	-	-	0,407	449
25,5	0,18	-	-	-	0,233	685
40	0,04	-	-	-	0,233	808
41,75	-	-	-	-	0,233	943
42,5	-	-	-	-	0,233	912,5
44	0,16	-	-	-	0,116	702,5
45	0,18	-	-	-	0,116	993
46	-	-	-	-	0,116	1142
47	0,3	-	-	-	0,116	1258
48	-	-	-	-	0,116	1220
49	-	-	-	-	0,087	1238
50	0,38	0,1	0,28	25,6	0,058	1157
51	0,44	-	-	-	0,058	1053
65	1,9	0,5	1,40	26,1	0	1078
66	1,70	-	-	-	0	1229,0
67	1,2	-	-	-	0	1283
68	1,28	0,35	0,93	27,64	0	1100
70	1,14	-	-	-	0	1209
73	0,68	0,21	0,47	35,38	0	1201
90	1,58	-	-	-	0	1954
91	1,59	0,79	0,80	49,82	0	1774,5
93	1,60	-	-	-	0	1956,5
94	1,60	0,73	0,87	45,34	0	-

Tot i que els resultats de producció de PHA són bons, les dificultats tècniques amb la sonda d'O₂ i la formació massiva de biofilms i de pigments en el medi de cultiu fa que sigui més complicat valorar les dades obtingudes de biomassa (g/L) i encara més poder comparar aquest cultiu amb els altres processos. A més a més, els valors de TOC indiquen que la font de carboni no s'està consumint i que s'està acumulant en el medi de cultiu. Podria ser que la formació del pigment hagués emmascarat els valors de TOC. Tot i així, s'ha decidit presentar aquests resultats perquè un cop més seguint una estratègia d'alimentació continua s'han pogut obtenir percentatges d'acumulació bons. Només amb la primera font de carboni s'ha aconseguit una acumulació de PHA del 27,6 % (p/p). Tot i haver addicionat només 3,2 g/L de KC11:0 en comptes dels 5 g/L previstos inicialment, s'ha aconseguit un percentatge d'acumulació de PHA del segon substrat del 18 % (p/p). Aquest valor és lleugerament inferior als obtinguts en els altres processos però el temps de cultiu també és més curt i possiblement quan s'ha parat el procés encara no s'havia consumit tot el KC11:0 (Figura 4.65).

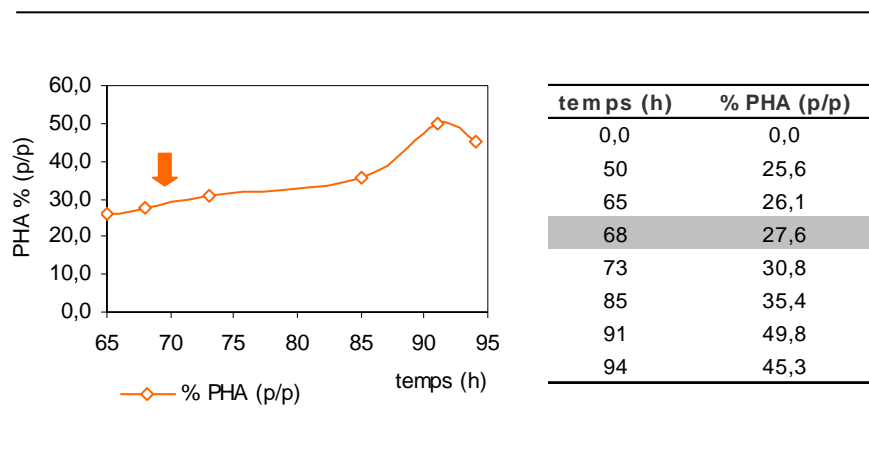


Figura 4.65 Bioreactor HPR-F10. Cinètica d'acumulació de PHA. S'indica amb una fletxa el punt on comença l'addició, a les 70 h de cultiu, de la segona font de carboni (KC11:0).

Les anàlisis de cromatografia indiquen que els problemes amb l'oxigen no han influït en la composició del polímer ni en les proporcions relatives entre les diferents unitats monomèriques. A l'igual que ha passat en les anàlisis del PHA obtingut en el procés HPR-F9, a certs temps de cultiu ha estat impossible separar els següents parells de monòmers: (C7:1+C7:0) i (C9:1+C9:0), tal i com està indicat en el diagrama de

barres de la Figura 4.66. El PHA total acumulat, a les 94 h de cultiu, és del 45 % (p/p) i conté un 60 % de cadenes monomèriques insaturades.

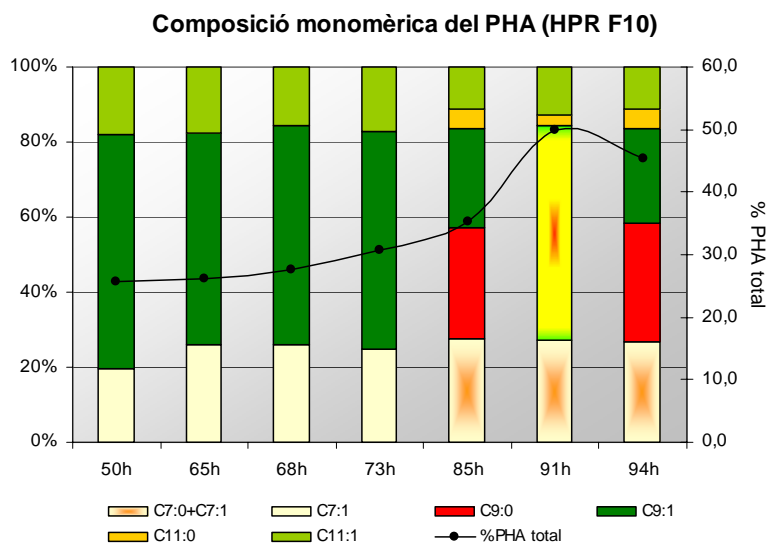


Figura 4.66. Composició monomèrica del PHA obtingut del cultiu en bioreactor (HPR-F10) de *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrats l'undecenoat sòdic (NaC11:1) i l'undecanoat potàssic (KC11:0).

Tal i com es pot observar en la Figura 4.66, la tendència de la *P. aeruginosa* 42A2 és sintetitzar PHA on la unitat monomèrica principal és la de nou àtoms de carboni, ja sigui C9:1 o C9:0. En d'altres estudis amb *P. aeruginosa* 42A2 i emprant d'altres substrats de cadena més llarga, com olis de fregits i àcid oleic tècnic, també s'ha descrit la formació de PHA on la longitud promig de la cadena és de nou àtoms de carboni. Així doncs, aquest fet sembla ser una característica intrínseca d'aquesta soca (Haba *et al.*, 2007), (Rodríguez, 2006), (Bassas *et al.*, 2006).

Les anàlisis de la composició dels PHAs obtinguts per cromatografia de gasos, en alguns casos no han pogut prou precisos ja que ha estat complicat poder resoldre els pics cromatogràfics de les parelles de monòmers de la mateixa longitud de cadena, (C7:1+C7:0), (C9:1+C9:0) i (C11:0+C11:1), tal i com es pot observar en la Figura 4.66. Especialment hi ha problemes amb els monòmers de cadena més curta (C7:1 i C7:0), ja que enlloc de dos pics cromatogràfics n'apareixen tres. Tot indica que durant el procés de metanòlisis o de propanòlisis del polímer, el monòmer C7:1 reaccionava diferent donant lloc a una reacció secundària. Una de les hipòtesis que es va proposar és un trencament acídic de la cadena seguit d'una ciclació intramolecular (Figura 4.67).

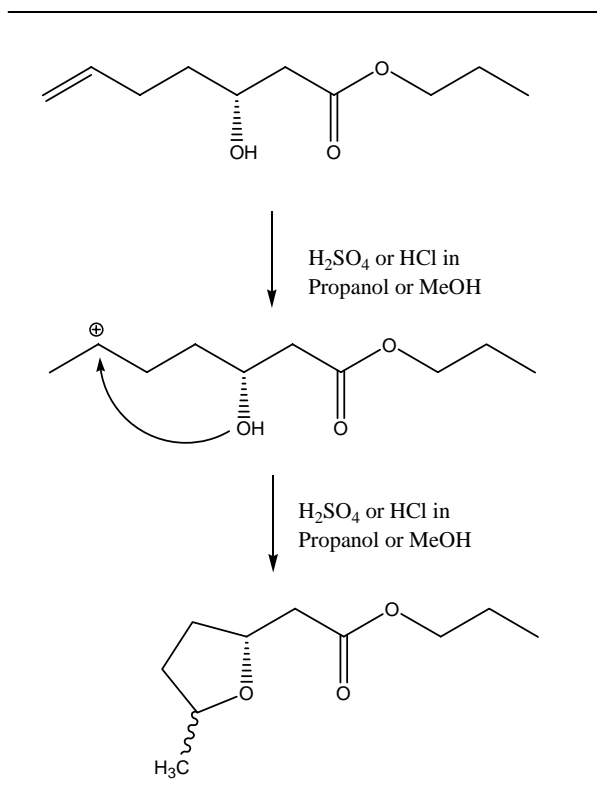


Figura 4.67 Reacció secundària que té lloc durant la propanòlisi o metanòlisi de les mostres de PHA (Furrer *et al.*, 2007).

El grup de Biopolímers de l'Institut de Recerca EMPA (Swiss Federal Institute for Material Testing and Research, Suïssa) han confirmat aquesta hipòtesis i han desenvolupat un nou mètode per a la identificació i quantificació d'aquests tipus de monòmers mitjançant cromatografia líquida (comunicació oral, Dr.Grubelnik, pendent de publicació).

En la Taula 4.18 es mostren els rendiments del cultiu. Es pot observar que tot i els problemes amb l'oxigen, la producció de PHA ha estat bona, 45% d'acumulació, tot i que el temps de cultiu ha estat més curt.

Taula 4.18. Resum dels resultats obtinguts en el bioreactor HPR-F10. En la taula es mostren els rendiments del procés, $Y_{x/s}$ i $Y_{p/s}$. Al llarg del cultiu s'han subministrat 7,9 g/L de NaC11:1 i 3,2 g/L de KC11:0.

HPR F10	NaC11:1	KC11:0	total procés
Biomassa (g/L)	1,28	2,02	3,3
PHA (g/L)	0,35	1,15	1,5
PHA (%w/w)	27,6	17,7	45,3
temps (h)	68	25	93
$Y_{x/s}$	0,16	0,63	0,30
$Y_{p/s}$	0,04	0,36	0,14
$Y_{x/N}$			5,69

Mitjançant un règim d'alimentació continu s'ha aconseguit no només millorar el percentatge d'acumulació sinó que també s'han obtingut copolímers amb diferent composició monomèrica a partir dels dos substrats: l'àcid undecenoic i l'àcid undecanoic. Els polímers que s'han obtingut reflecteixen la composició i la proporció dels substrats inicials.

En els cultius en matrassos de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecenoic com a substrat s'obtenia un percentatge d'acumulació del 10 % i quan s'alimentava el cultiu amb els dos substrats (C11:1 i C11:0) s'aconsegueix una acumulació del 40%. Aquest augment en l'acumulació de PHA es degut principalment a la producció de polímer a partir de la segon substrat, l'àcid undecanoic. El fet de treballar amb l'undecenoat sòdic ha millorat el rendiment de producció de PHA a partir del primer substrat, aconseguint un percentatge d'acumulació de fins el 30 % (p/p) en el cas del bioreactor HPR-F9. Aquesta millora en l'acumulació s'ha vist reflectida en la composició final del polímer.

4.2.3 Caracterització dels PHAs: estructura i propietats

4.2.3.1 Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

i. PHA-C9:0

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): 0,90 (m, CH₃); 1,26 (m, cadena alifàtica); 1,60 (m, H4); 2,50 (m, H2); 5,2 (m, H3).

En la Figura 4.68 es mostra l'espectre de protó del PHA-C9 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid nonanoic com a substrat. Tal i com es pot observar, el polímer conté totes les cadenes laterals saturades. Les senyals dels protons metílics ressonen a 0,9 ppm, mentre que la senyal de 1,26 ppm correspon a tots els protons metilènics de les cadenes alifàtiques. La senyal de 1,60 ppm correspon als protons metilènics en posició H4 (tal i com es pot observar en l'estructura de la Figura 4.68). Els protons (H2) en α al carbonil ressonen a 2,5 ppm donant lloc a un multiplet. Finalment la senyal a camps més baixos correspon als protons (H3) de l'enllaç èster.

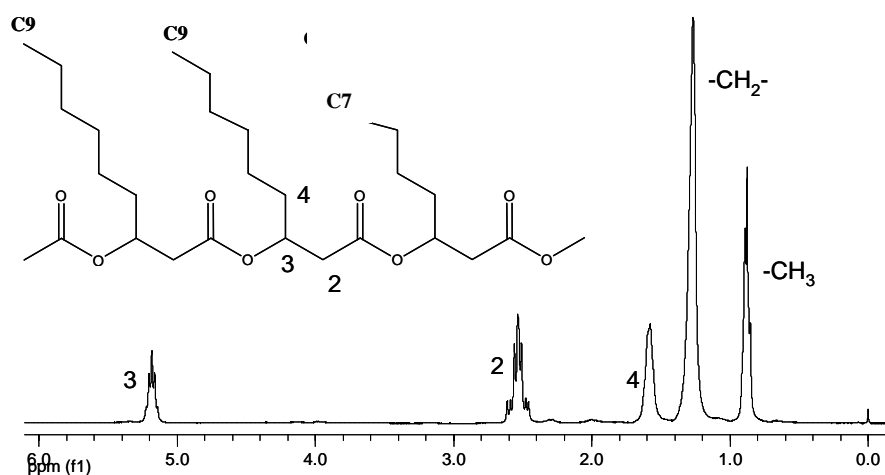


Figura 4.68. Espectre ^1H del PHA-C9 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid nonanoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz).

No s'han pogut integrar les senyals ja que són polímers de pes molecular molt alt (100-200 KDa). A continuació en la Figura 4.69 es mostra l'espectre COSY que ens ajudarà a confirmar l'estructura del polímer. Indicat amb línies discontinües s'han assignat els acoblaments H-H que confirmen l'enllaç èster en posició β al grup carbonil.

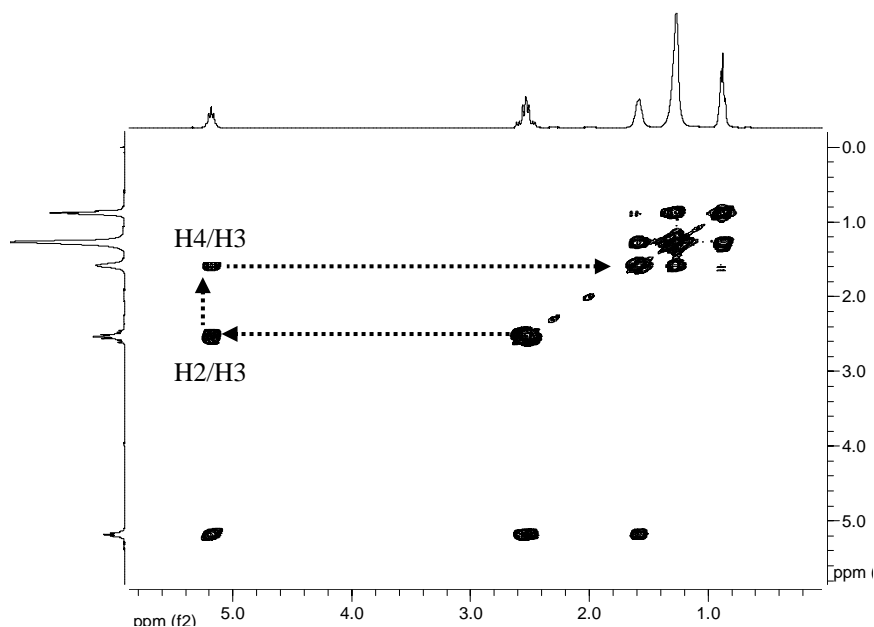


Figura 4.69. Espectre COSY ^1H - ^1H del PHA-C9 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid nonanoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz).

En la Figura 4.70 es mostra l'espectre de ^{13}C i de forma anàloga a l'espectre de protó s'han assignat les principals senyals. A la zona alifàtica apareixen múltiples senyals que corresponen als carbonis de les cadenes laterals saturades del polímer. La senyal de 169,28 ppm correspon al carbonil mentre que a 70,82 ppm i 39,12 ppm trobem les senyals del carbonis β i α , respectivament (veure annex).

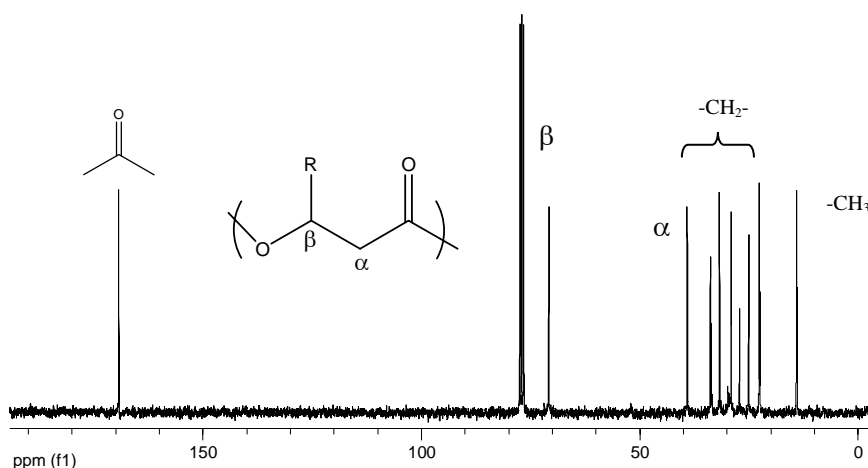


Figura 4.70. Espectre ^{13}C del PHA-C9 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid nonanoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (75 MHz).

A la zona dels C metílics apareixen dues senyals, que corresponen al grup metil de dues unitat monomèriques diferents (13,96 ppm i 14,10 ppm), és a dir, el polímer conté, com a mínim, dos monòmers de diferent longitud de cadena.

ii. PHAC11:0

^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 0,90 (m, CH_3); 1,26 (m, cadena alifàtica); 1,60 (m, H4); 2,50 (m, H2); 5,2 (m, H3).

A continuació, en la Figura 4.71 es mostra l'espectre de protó del polímer PHA-C11:0 obtingut dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrat l'àcid undecanoic (C11:0). Tal i com es pot comprovar, l'espectre és idèntic a l'obtingut pel PHA-C9:0. Ambdós polímers tenen les cadenes laterals saturades i per tant la zona alifàtica (1,2-1,6 ppm) és idèntica. On es veuran diferències a la zona alifàtica serà en l'espectre de ^{13}C (veure Figura 4.73).

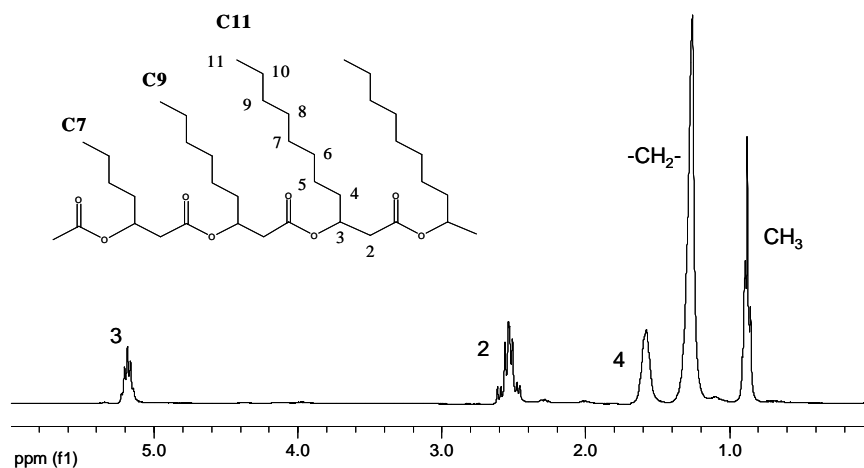


Figura 4.71. Espectre ^1H del PHA-C11:0 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecanoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz).

L'Espectre bidimensional COSY torna a confirmar l'acoblament entre el protó H3 i el protó H4 i l'acoblament entre el protó H2 i el protó H3 i per tant es confirma l'enllaç èster en posició β al carbonil (Figura 4.72).

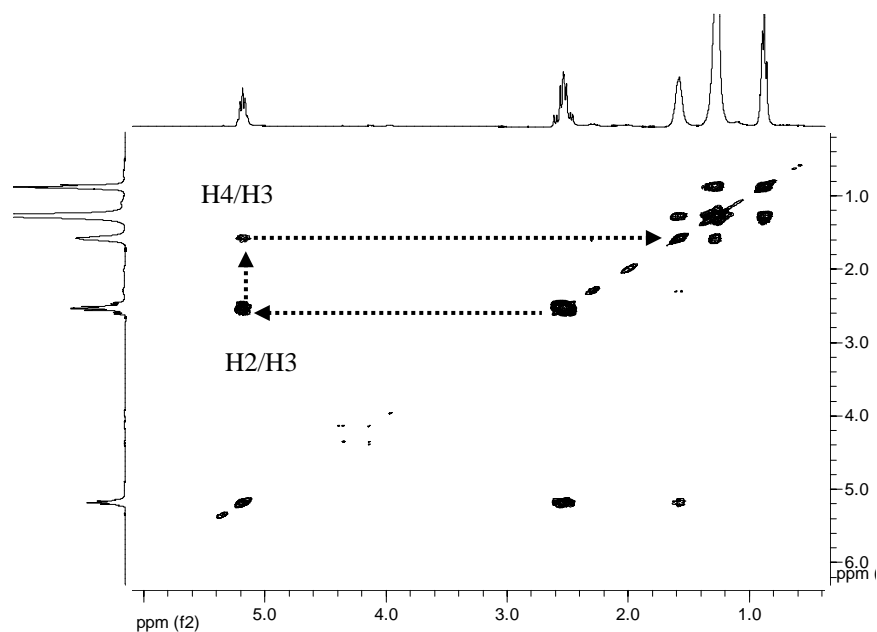


Figura 4.72. Espectre COSY ^1H - ^1H del PHA-C11:0 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecanoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz).

En l'espectre de ^{13}C (Figura 4.73) s'observen més senyals a la zona alifàtica (10-40 ppm), la qual cosa suggereixen que el PHA-C11:0 tindrà més diversitat monomèrica que el PHA-C9. A la zona dels metils es distingeixen tres senyals diferents (13,95, 14,07 i 14,12 ppm), que segurament corresponen amb els monòmers C7, C9 i C11. De totes maneres, es confirmarà amb les anàlisis de CG-EM.

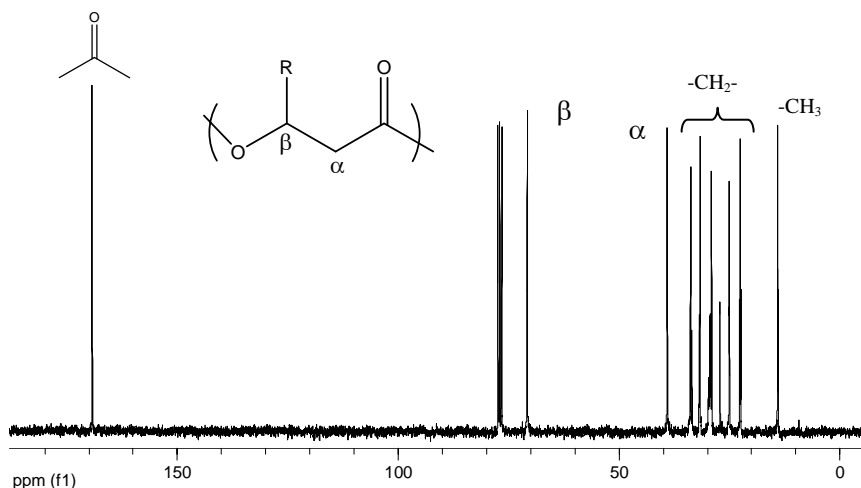


Figura 4.73. Espectre ^{13}C del PHA-C11:0 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecanoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (75 MHz).

iii. PHA-C11:1

^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz): 0,90 (m, CH_3); 1,26 (m, cadena alifàtica); 1,60-1,80 (m, H_4 , H_4'); 2,0 (m, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 2,50 (m, H_2); 4,9 (m, $-\underline{\text{CH}}_2=\text{CH}$); 5,2 (m, H_3); 5,7 (m, $-\text{CH}_2=\underline{\text{CH}}$).

A la Figura 4.74 es mostra l'espectre de protó per al PHA-C11:1. Com es pot observar pràcticament la totalitat dels monòmers tenen el grup vinil, com ho mostren les senyals de 4,9 ppm i 5,7 ppm. La senyal de 2,0 ppm correspon als protons metilènics en posició al·lílica i a 2,5 ppm ressona la senyal corresponen al protons en α al grup carbonil. La senyal que apareix a 0,9 ppm suggereix l'existència d'un grup metil i per tant el fet que el polímer contingui un percentatge petit, d'acord amb la relació d'intensitats, de cadenes saturades, és a dir, que no contenen el grup vinil. De totes maneres, amb les anàlisis de CG-EM corroborarem aquestes dades.

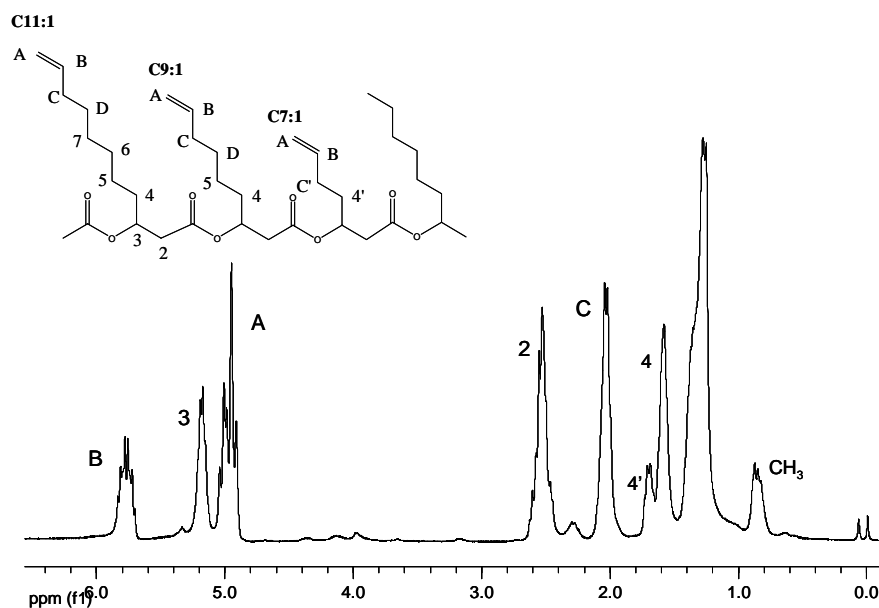


Figura 4.74. Espectre ^1H del PHA-C11:1 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecenoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz).

A la Figura 4.75, en l'espectre COSY es mostren les correlacions H-H i a l'igual que en els altres PHAs estudiats confirmen l'estructura monomèrica. Malgrat que per a confirmar la longitud de les cadenes laterals necessitem l'espectre de ^{13}C i les anàlisis de CG-EM.

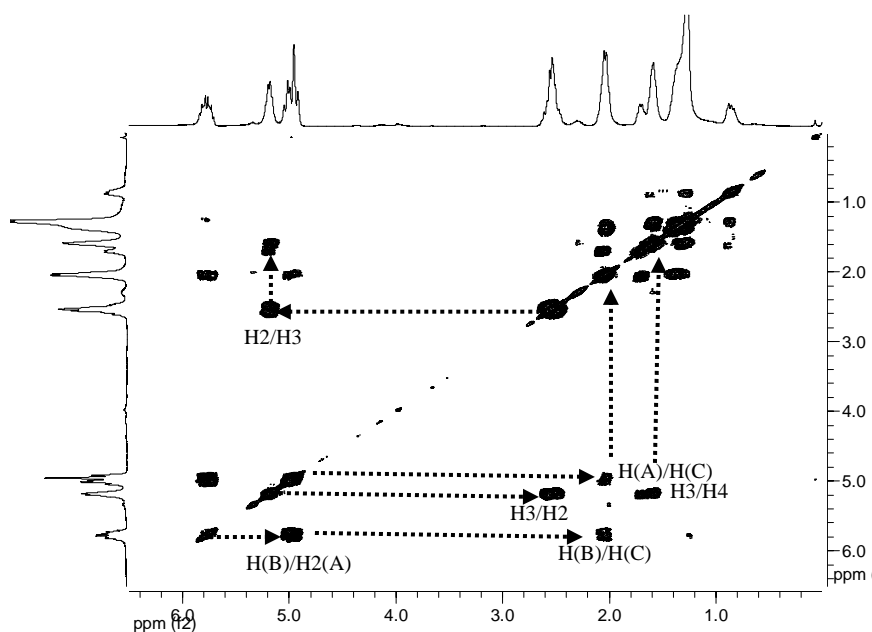


Figura 4.75. Espectre ^1H - ^1H del PHA-C11:1 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecenoic com a substrat. Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz).

En la Figura 4.76 es mostra l'espectre de ^{13}C del PHA-C11:1 i s'ha ampliat la zona dels carbonis olefínics. Tal com es pot comprovar, es poden determinar tres tipus diferents de monòmers: C7:1 Δ 6, C9:1 Δ 8 i C11:1 Δ 10. La senyal del carbonil, així com les senyals dels C α i C β també apareixen desdoblades, com a conseqüència de l'efecte de la longitud de la cadena monomèrica.

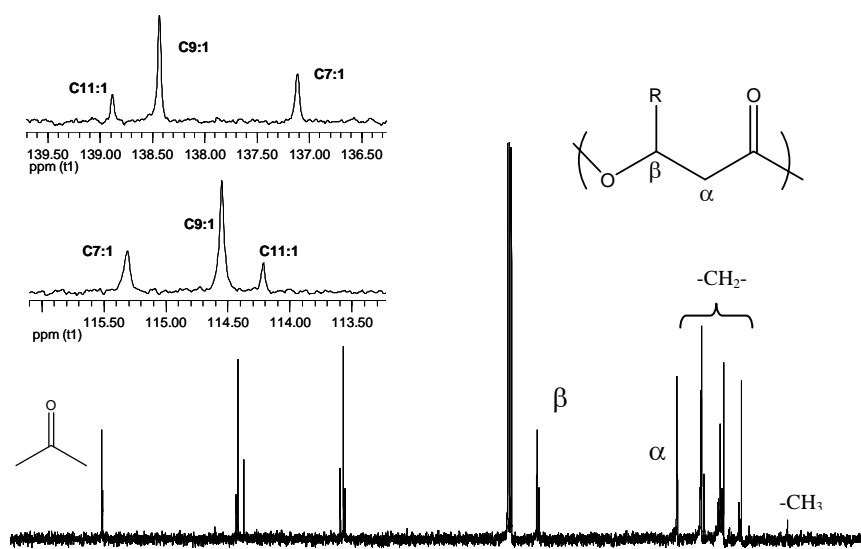


Figura 4.76. Espectre ^{13}C del PHA-C11:1 obtingut del cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 emprant àcid undecenoic com a substrat. Enregistat en l'equip Gemini-300 (75 MHz).

iv. PHA-(C11:1+C11:0)

En la Figura 4.77 es mostren els espectres de ^1H per als polímers obtinguts en els experiments en matrassos, emprant l'àcid undecenoic i l'àcid undecanoic com a substrats. El polímer obtingut en condicions proliferants i amb una alimentació seqüencial dels substrats no conté monòmers amb el grup vinil. Tal i com es pot veure en l'espectre, s'obté un polímer amb les cadenes laterals totalment saturades. Així doncs, el polímer està constituït per unitats monomèriques provinents de l'àcid undecanoic.

En canvi el polímer obtingut en condicions no proliferant conté un 18 % de les cadenes laterals insaturades, és a dir, que tenen el grup vinil. Prenent com a referència la senyal del protó terciari de l'enllaç èster, s'ha integrat la senyal dels protons vinílics (4,9 i 5,7 ppm) i la senyal dels protons metílics (0,90 ppm) i s'ha arribat a la conclusió que un 18 % de les unitats polimèriques contenen el grup vinil i el 82 % restant són

cadena saturada. L'anàlisi detallat de la composició monomèrica així com de la proporció relativa dels monòmers s'ha realitzat mitjançant anàlisi de cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (CG-EM) (veure apartat 4.2.3.2).

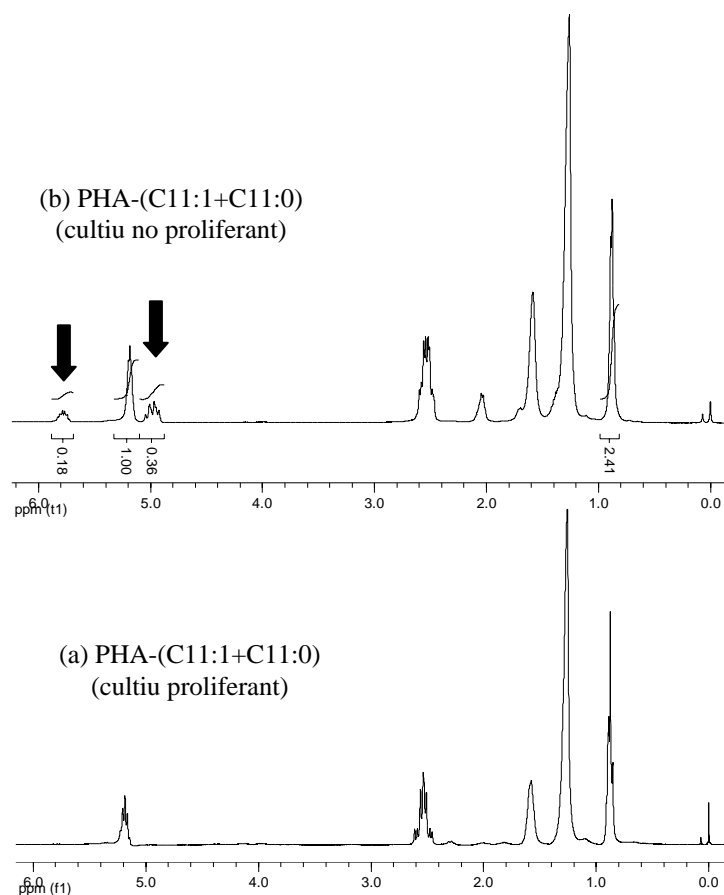


Figura 4.77. Espectre ^1H del PHA-(C11:1+C11:0). S'ha emprat àcid undecenoic (C11:1 Δ 10) i àcid undecanoic (C11:0). Enregistrat en l'equip Gemini-300 (300 MHz). (a) cultiu en condicions proliferants i (b) cultiu en condicions no proliferants (NP)

v. PHA-(C11:1+C11:0) obtinguts en els processos en el bioreactor

Els polímers obtinguts en els diferents cultius en bioreactor han estat analitzats i quantificats per RMN. A l'espectre de ^1H -RMN, la integració de les senyals corresponents al grup vinil així com la integració de les senyals dels grup metil permeten calcular el percentatge de monòmers insaturats i saturats, respectivament, que conté el polímer. D'altra banda, l'espectre de ^{13}C -RMN (en mode inverse gated decoupling) permet la integració de les senyals dels carbonis olefínics i dels carbonis metílics proporcionant així informació sobre la proporció relativa dels monòmers. En la Taula 4.19, es mostren les composicions obtingudes per als diferents polímers:

Taula 4.19. ^{13}C -RMN. Composició monomèrica dels polímers obtinguts en els cultius en bioreactor (HPR-F5, HPR-F7, HPR-F9 i HPR-F10). On els monòmers estan indicats de la següent manera: C7:0, 3-hidroxiheptanoat; C7:1 (C7:1 Δ 6), 3-hidroxiheptenoat; C9:0, 3-hidroxi-nonanoat; C9:1 (C9:1 Δ 8), 3-hidroxi-nonenoat; C11:1 (C11:0 Δ 10), 3-hidroxiundecanoat i C11:1 Δ 10, 3-hidroxi-undecenoat.

monòmers	PHA F5	PHA F7	PHA F9	PHA F10
C7:0	23,9	17,0	9,0	7,0
C7:1	5,3	14,8	15,0	20,0
C9:0	38,5	27,7	17,0	15,0
C9:1	9,0	17,2	40,0	40,0
C11:0	19,9	17,9	8,0	8,0
C11:1	3,4	5,4	11,0	10,0
saturats (%)	82,3	62,6	34	30
insaturats (%)	17,7	37,4	66	70

Tal i com es pot comprovar, els percentatges monomèrics obtinguts amb les anàlisis de ressonància estan en concordança amb els obtinguts anteriorment en les anàlisis de cromatografia de gasos. En alguns casos, com per exemple el PHA-F10, la intensitat de les senyals dels carbonis olefínics no era prou bona per fer una integració més precisa. A l'annex es mostra una taula comparativa de totes les tècniques emprades per a la determinació de la composició monomèrica dels polímers obtinguts en els cultius en bioreactor (CG, RMN i CG-EM).

Els resultats de les anàlisis de RMN han demostrat que la composició del polímer es pot modular controlant el règim d'alimentació. Al llarg dels quatre experiments en bioreactor s'han addicionat diferents concentracions de substrats, aquest fet s'ha traduït en una diferent composició monomèrica del polímer final. No obstant, malgrat haver emprat diferents estratègies de cultiu, així com també diferents concentracions dels dos substrats, els polímers que s'obtenen estan formats principalment per unitats monomèriques de nou àtoms de carboni (C9:0 i C9:1).

4.2.3.2. *CG-EM: Composició monomèrica*

Tots els polímers sintetitzats en aquesta part del treball (PHA-C9:0, PHA-C11:0; PHA-C11:1; PHA-(C11:1+C11:0)) presenten una composició similar. Els polímers

sintetitzats a partir de l'àcid nonanoic o l'àcid undecanoic, com s'ha comprovat en els espectres de ressonància, contenen totes les unitats monomèriques saturades, C11:0, C9:0 i C7:0. En canvi el PHA-C11:1, sintetitzat a partir de l'àcid undecenoic, ja s'ha vist en les anàlisis de RMN que conté tres tipus de monòmers diferents i tots ells amb un grup vinil C7:1, C9:1 i C11:1. En el cas dels PHAs-(C11.1+C11:0), produïts a partir de l'àcid undecenoic i de l'àcid undecanoic, és d'esperar que continguin una barreja de monòmers saturats i de monòmers amb el grup vinil, tal i com suggereixen les anàlisis de RMN i de CG que s'han comentat en apartats anteriors.

En la Figura 4.78 es mostren els espectres de masses d'impacte electrònic per als diferents monòmers.

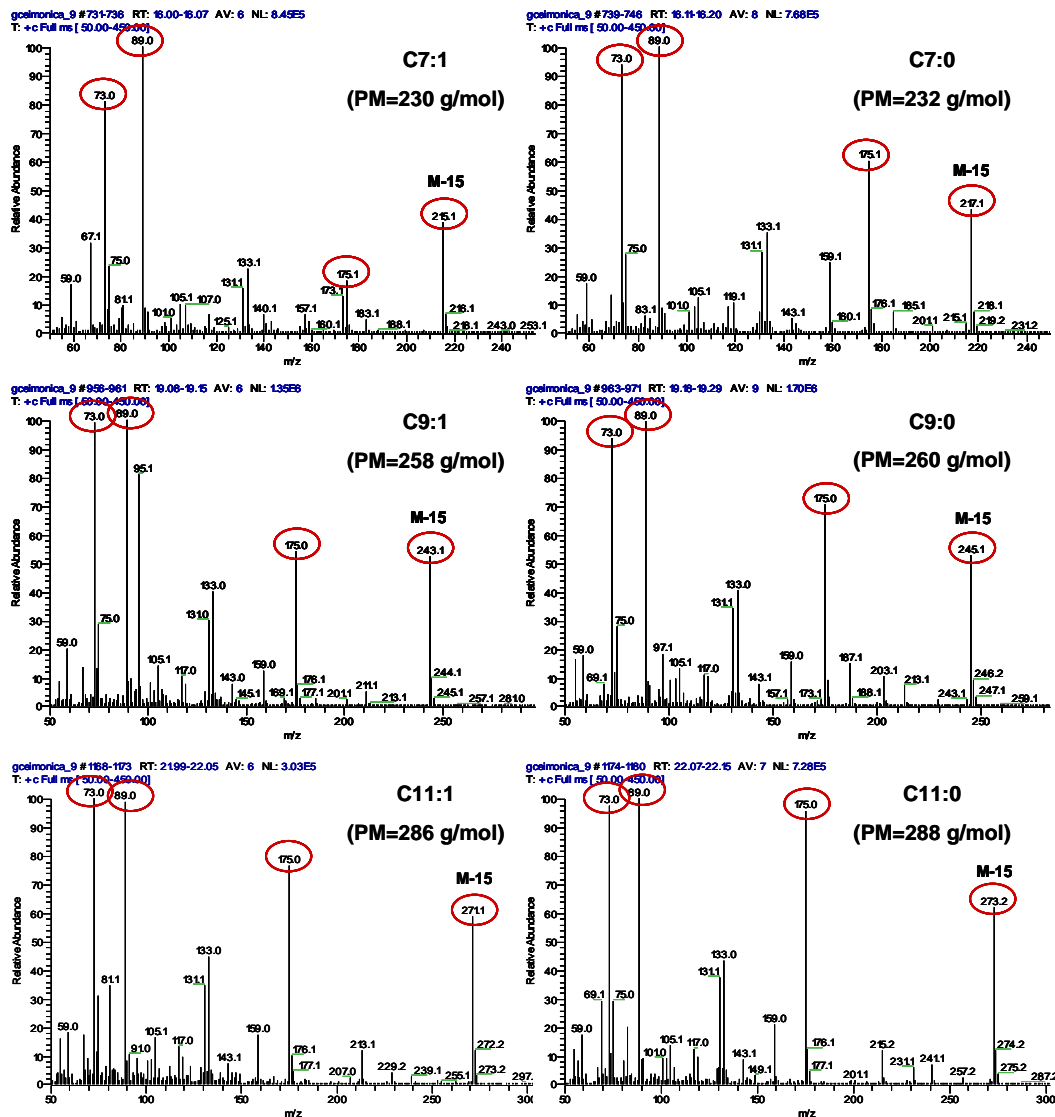


Figura 4.78. Espectre de masses d'impacte electrònic (70ev) per als diferents monòmers. Els monòmers estan indicats de la següent manera.: C7:0, 3-hidroxi-heptanoat; C7:1, 3-hidroxi-6-heptanoat; C9:0, 3-hidroxi-nonanoat; C9:1, 3-hidroxi-8-nonenoat; C11:0, 3-hidroxi-undecanoat i C11:1, 3-hidroxi-10-undecenoat.

i. PHAs obtinguts en els cultius en matrassos

La composició monomèrica obtinguda amb les anàlisis de CG-EM dels polímers obtinguts a partir de diferents substrats simples es mostren a la Taula 4.20.

El polímer obtingut a partir de l'àcid nonanoic, PHA-C9:0, presenta una composició molt regular ja que conté un 92 % del monòmer C9:0. D'altres espècies de *Pseudomonas*, com *P. oleovorans*, quan es fan créixer en àcid nonanoic s'obté un polímer amb una major diversitat monomèrica, ja que conté unitats de C9:0 (55 %), C7:0 (40 %) i C5:0 (5 %) (Barbuzzi *et al.*, 2004). En el cas de *P. stutzeri* 1317, el polímer que s'obté també presenta una major diversitat monomèrica, ja que tot i que majoritàriament conté les unitats C9:0 (67 %) i C7:0 (20 %), també es va detectar l'existència de monòmers C10:0 (5 %), C8:0 (5 %) i C6:0 (0,5 %).

Taula 4.20. Composició monomèrica dels PHAs obtinguts a partir de l'àcid nonanoic (PHA-C9:0), de l'àcid undecanoic (PHA-C11:0), de l'àcid undecenoic (PHA-C11:1) i barreges dels dos últims (PHA-(C11:1+C11:0)) en condicions proliferant i no proliferants (NP). On Cn, representa el nombre d'àtoms de carboni en les unitats 3-hidroxi-alcanoat del polímer.

CG-EM					
monòmers	PHA-C9:0	PHA-C11:0	PHA-C11:1	PHA (C11:1+C11:0)	PHA-NP (C11:1+C11:0)
C7:0	-	-	-	15,8	11,1
C7:1	-	-	2,4	-	3,4
C8:0	-	-	5,6	7,1	4,5
C9:0	91,9	48,5	-	39,3	46,1
C9:1	-	-	73,5	-	6,8
C10:0	4,1	1,6	5,6	7,2	0,9
C11:0	4,0	49,9	-	30,6	19,1
C11:1	-	-	12,9	-	8,1
saturats (%)	100	100	11,2	100	81,7
insaturats (%)	-	-	88,8	-	18,3

La presència d'unitats monomèriques de longitud de cadena superior a la del substrat emprat suggereix, que malgrat que el microorganisme utilitza de forma majoritària la ruta de la β -oxidació per a la producció de PHA, la presència de les unitats C10:0 i C11:0, indica que possiblement també utilitza d'altres rutes metabòliques com per exemple, la síntesis *de novo* dels àcids grassos o la reacció d'elongació de cadena. Aquest fet ha estat descrit per d'altres autors, en cultius on s'ha emprat un substrat amb nous àtoms de carboni, ja sigui nonanoat sòdic, nonà o el mateix àcid nonanoic (Gross *et al.*, 1989), (Preusting, 1990) (Xi *et al.*, 2000). En el cas

del PHA-C11:0 es torna a obtenir un polímer regular amb dues unitats monomèriques principals, C11:0 (49,9 %) i C9:0 (48,5 %). Tant *P. oleovorans* com *P. stutzeri* 1317, quan es fan créixer en un medi de cultiu emprant àcid undecanoic, produeix polímer amb una major diversitat monomèrica (C5:0-C11:0) Aquest fet contrasta amb els polímers obtinguts (Xi *et al.*, 2000; Barbuzzi *et al.*, 2004). Els resultats obtinguts per a la composició monomèrica del PHA-C11:1 són semblant als descrits per Kim *et al.*, (2000), on en cultius amb *P. putida* KCTC 2407 obtenen un polímer que conté C11:1 (24 %), C9:1 (66.1 %) i C7:1 (9,9 %) (Kim *et al.*, 2000). En canvi, *P. putida* GP01 produeix un polímer amb C11:1 (15,6 %), C9:1 (69,9 %) i C7:1 (14,9 %) (Hartmann, 2005).

Tal i com ja es suggeria en els resultats de ressonància el PHA-(C11:1+C11:0) (cultiu condicions proliferants) és un polímer amb les cadenes laterals completament saturades. La composició és semblant a l'obtinguda en el PHA-C11:0, les unitats principals són el monòmer C9:0 i C11:0, però en aquest cas també s'ha format el monòmer C7:0 (15 %). En canvi, en el PHA-NP-(C11:1+C11:0) (cultiu no proliferant), el polímer conté un 18 % dels monòmers amb el grup vinil. La proporció relativa dels monòmers és molt semblant a l'obtinguda en els polímers PHA-C11:1 i PHA-C11:0.

ii .PHAs obtinguts en els cultius en bioreactor

Els cromatogrames corresponents a les anàlisis de CG-EM dels polímers obtinguts en els processos en el bioreactor es mostren a l'annex.

A la Taula 4.21 es pot veure la composició monomèrica per als diferents polímers obtinguts així com també el percentatge de monòmers saturats i insaturats que conté el polímer.

Taula 4.21. Composició monomèrica dels PHAs obtinguts en els processos en bioreactor emprant com a substrats l'àcid undecenoic i l'àcid undecanoic, en diverses concentracions. On Cn, representa el nombre d'àtoms de carboni en les unitats 3-hidroxil-alcanoat del polímer. (*) aquestes dades pertanyen a l'anàlisi de RMN, ja que les de CG-EM no s'han pogut realitzar.

CG-EM				
monòmers	PHA-F5*	PHA-F7	PHA-F9	PHA-F10
C7:0	23,9	13,3	9,1	7,9
C7:1	5,3	9,7	9,6	10,0
C9:0	38,5	36,9	23,0	22,8
C9:1	9,0	21,1	39,8	41,9
C11:0	19,9	14,2	8,6	7,1
C11:1	3,4	4,8	9,9	10,3
saturats (%)	82,3	64,4	40,7	37,8
insaturats (%)	17,7	35,6	59,3	62,2

En tots els casos s'obté un polímer que conté monòmers procedents de les dues fonts de carboni emprades, l'undecenoat sòdic (NaC11:1) i l'undecanoat potàssic (KC11:0). Els percentatges relatius de monòmers saturats i monòmers insaturats corroboren els obtinguts anteriorment en les anàlisis de RMN. En el cas del PHA-F10, els resultats difereixen una mica ja que per RMN s'havia calculat un 70 % de monòmers insaturats i en canvi per CG-EM s'obté un 62 %. Aquesta desviació en els resultats es deguda a l'error experimental a l'hora d'avaluar els cromatogrames. La poca resolució cromatogràfica entre els pics dificulta les integracions. Tal i com es pot veure a l'annex, el cas del PHA-F10 ha estat necessari fer una anàlisi del SIM per a cada pic per a poder extreure una proporció relativa de cada ió en l'àrea total. Ha estat especialment delicat separar els pics per a la parell (C11:1+C11:0).

A continuació, en la Figura 4.79 s'han representat els percentatges monomèrics obtinguts per CG-EM, per tal de poder comparar les proporcions relatives entre les parelles de monòmers de la mateixa longitud de cadena, així com també la relació entre els monòmers de diferent longitud de cadena.

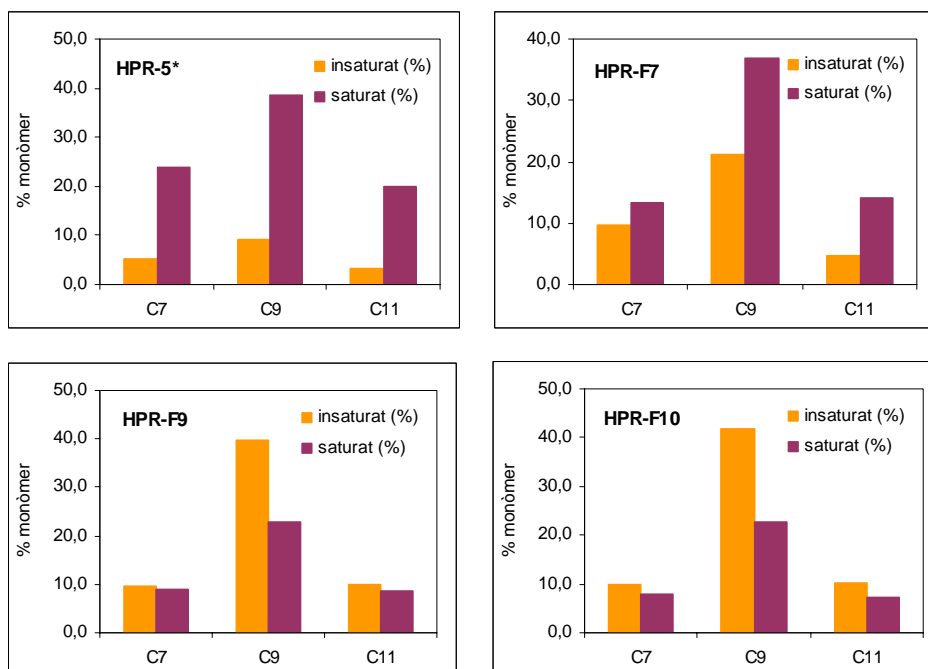


Figura 4.79 Composició monomèrica obtinguda de les anàlisis de CG-EM. Proporció relativa entre els monòmers saturats/insaturats de la mateixa longitud de cadena. Cn, on n indica el nombre d'àtoms de carboni del monòmer. Les dades del PHA sintetitzat en el bioreactor HPR-F5 no s'han pogut determinar, en el seu lloc s'han representat les dades de RMN.

Com es pot apreciar en la gràfica de barres, la distribució entre les longituds de cadena dels monòmers es repeteix sempre, independentment del tipus i de la concentració de la font de carboni. El monòmer majoritari és el de nou àtoms de carboni de longitud de cadena (C9), mentre que les unitats de set i onze àtoms de carboni (C7, C11), en general, guarden la mateixa proporció relativa respecte la unitat C9.

4.2.3.3 *Propietats tèrmiques i Pes molecular*

En general els PHAs de cadena mitja (mcl-PHA) són considerats materials amorfs amb temperatures de transició vítria (Tg) baixes i en alguns casos presenten temperatura de fusió (Tm) al voltant dels 40-45 °C.

i. PHAs obtinguts en els experiments en matrassos

A la Taula 4.22 es mostren les propietats tèrmiques dels polímers obtinguts en els cultius de *P. aeruginosa* 42A2 emprant com a substrats l'àcid nonanoic (C9:0), l'àcid undecanoic (C11:0), l'àcid undecenoic (C11:1) i una mescla dels dos últims (C11:1+C11:0):

Taula 4.22 Propietats tèrmiques.. On Tg, temperatura de transició vítria, Tm, temperatura de fusió, Tpeak, temperatura del pic exotèrmic i ΔH l'energia associada a aquest pic i finalment Td, temperatura de descomposició del polímer.

	Tg (°C)	Tm (°C)	Tpeak (°C)	ΔH (J/g)	Td (°C)
PHA-C9:0	-56,4	-	-	-	294,8
PHA-C11:0	-56,5	-	-	-	294,5
PHA-C11:1	-54,8	-	-	-	294,8
PHA-(C11:1+C11:0)	-54,6	44,6	274	14,1	302,7
PHA-(C11:1+C11:0) NP	-57,3	-	227	136,9	302,7

Tots els polímers tenen un valor de Tg que oscil·la entre -54 °C i -57 °C i només en el cas del PHA-(C11:1+C11:0) (obtingut en condicions de cultiu proliferants), s'observa una Tm de 42,6 °C i una ΔH de 6,9 J/g. El PHA-C9:0 i el PHA-C11:0 tenen Tg més baixes a les descrites en d'altres treballs (Ashby *et al.*, 2002). Els resultats obtinguts difereixen dels descrits per Barbuzzi *et al.*, (2004), que en un l'estudi realitzat amb *Pseudomonas* ATCC 27853 i emprant com a substrats diferents àcids grassos amb número imparell d'àtoms de carboni, els polímers que obtenen a partir de l'àcid nonanoic i de l'àcid undecanoic, tenen una Tg de -38 °C i -48 °C, respectivament

(Barbuzzi *et al.*, 2004). El PHA-C11:1 també presenta un temperatura de transició vítria inferior (T_g $-54,6$ °C) a la descrita en altres PHAs produïts a partir d'àcid undecenoic i que oscil·la entre els -45 °C i -50 °C (Bear, 1997), (Park, 1998), (Hartmann, 2005).

En el cas dels PHAs produïts a partir de C11:1 i C11:0, PHA-(C11:1+C11:0) tant en condicions proliferants com en condicions no proliferants, presenten valors de T_g més baixos en relació a d'altres copolímers d'aquestes característiques. En el cas del PHA-(C11:1+C11:0) en condicions de cultiu proliferants, la composició és molt semblant a la del PHA-C11:0 i per tant és d'esperar un comportament tèrmic semblant. En canvi el PHA-(C11:1+C11:0) en condicions NP conté un 20 % aproximadament d'unitats insaturades. En d'altres estudis realitzats de producció de copolímers anàlegs al PHA-(C11:1+C11:0)-NP, concretament copolímers produïts a partir d'àcid octanoic i àcid undecenoic , i que contenen un 20 % aproximadament d'unitats insaturades, s'han descrit valors de T_g entre -35 °C i -39 °C (Bear, 1997), (Park, 1998), (Hartmann, 2005). En el cas dels PHA-(C11:1+C11:0), tant en condicions proliferants com en condicions NP, s'ha detectat un pic exotèrmic entre 230 - 280 °C, que podria estar associat a reaccions d'autooxidació del polímer. D'acord amb les anàlisis termogravimètriques, en aquest rang de temperatures, el polímer ni perd ni guanya pes.

En general, tots el polímers obtinguts en aquests experiments tenen una temperatura de descomposició al voltant de 300 °C

A la Taula 4.23 es mostren els pesos moleculars d'aquests polímers.

Taula 4.23 GPC. Pesos moleculars dels polímers obtinguts dels cultius en matrassos emprant com a font de carboni àcid nonanoic (C9:0), àcid undecanoic (C11:0), àcid undecanoic (C11:1) i una barreja de (C11:1+C11:0). On Mn, pes molecular en nombre; Mw, pes molecular en massa i PI, índex de polidispersitat.

	Mn (KDa)	Mw (KDa)	PI
PHA-C9:0	135	267	1,98
PHA-C11:0	131	232	1,77
PHA-C11:1	83	180	2,20
PHA-(C11:1+C11:0)	120	230	1,91
PHA-(C11:1+C11:0) NP	113	220	1,95

El pesos molecular d'aquests polímers estan en el rang esperat i s'obtenen valors molt semblants als descrits a la bibliografia (Bear, 1997), (Park, 1998), (Hartmann, 2005).

Només s'ha pogut trobar un cas, on s'hagi descrit un PHA de les mateixes característiques amb un pes molecular més alt al que s'obté en cultius de *P. aeruginosa* 42A2. *P. aeruginosa* ATCC 27853 es capaç de produir un PHA, a partir d'àcid nonanoic, amb un pes molecular de Mn 297 KDa i un polidispersitat de 2,0 (Barbuzzi *et al.*, 2004).

ii. PHAs obtinguts en els cultius amb bioreactor

Tal i com es pot observar en la Taula 4.24, malgrat la diferent proporció de monòmers saturats/insaturats no es pot establir cap tipus de tendència. Tots els copolímers obtinguts tenen una valor de Tg al voltant de -50 °C i una Tm entre 40-45 °C.

Taula 4.24. Propietats tèrmiques.. On Tg, temperatura de transició vítria, Tm, temperatura de fusió, Tpeak, temperatura del pic exotèrmic i ΔH l'energia associada a aquest pic i finalment Td, temperatura de descomposició del polímer.

PHA	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	monòmers saturats (%)	monòmers insaturats (%)
HPR-F5	-50.4	44.8	7.33	85	15
HPR-F7	-52.1	43.5	1.12	65	35
HPR-F9	-50.0	37.6	0.24	34	66
HPR-F10	-49.6	44.9	0.70	30	70

En l'estudi realitzat per *Bear et al.*, per a cultius de *P. oleovorans* ATCC 29347 i emprant àcid octanoic i àcid undecenoic com a font de carboni, s'ha descrit la producció de copolímers (PHOU) amb diferent proporció de monòmers insaturats, en els quals s'observava un augment de la Tm a mesura que augmentava el percentatge de monòmers saturats (procedents de l'àcid octanoic) (Bear, 1997). Un comportament semblant ha estat descrit en cultius de *P. putida* GP01 emprant els mateixos substrats (Hartmann, 2005). En el polímers sintetitzats per *P. aeruginosa* 42A2 no s'observa aquesta tendència, possiblement aquest fet és degut a que els dos substrats presenten un comportament tèrmic molt semblants.

En la Figura 4.80 es mostren les distribucions dels pesos moleculars obtingudes per als polímers PHA-F5, PHA-F7, PHA-F9 i PHA-F10.

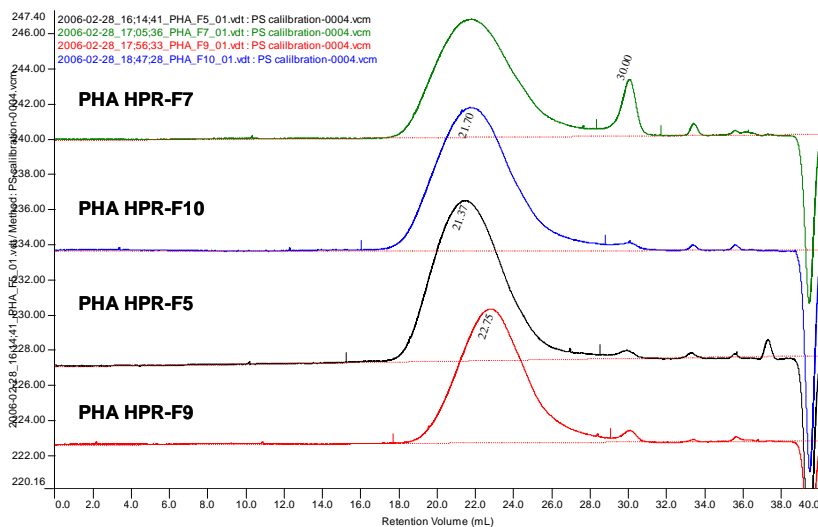


Figura 4.80. Distribució dels pesos moleculars per als diferents polímers obtinguts en els cultius en bioreactor .

En la Figura 4.80 es pot apreciar que tots els polímers obtinguts en cultius en el bioreactor, independentment del seu percentatge de monòmers insaturats, presenten una distribució de pesos moleculars molt semblant. Destacar que el cromatograma del PHA-F5 s'observa un segon pic, que apareix a temps de retenció més alts (RT 30,0 min.) i de pes molecular molt baix, al voltant de 7 Da i un índex de polidispersitat de $PI=1$.

Els pesos molecular d'aquests polímers es recullen a la Taula 4.25. Els valors obtinguts són els pesos moleculars característic per als PHA de cadena mitja (Witholt and Kessler, 1999).

Taula 4.25. GPC. Pesos moleculars dels polímers obtinguts dels cultius en bioreactor emprant com a substrat una barreja de (C11:1+C11:0). On Mn, pes molecular en nombre; Mw, pes molecular en massa, PI, índex de polidispersitat i TR, temps de retenció.

PHA	Mn (KDa)	Mw (KDa)	PI	TR (m in.)
PHA-F5	175	401	2.3	21.37
PHA-F7	147	339	2.3	21.72
PHA-F9	105	209	2.0	22.74
PHA-F10	142	366	2.5	21.70

4.2.4 Estudi microscòpic dels grànuls de PHA

Al llarg d'aquest estudi s'ha demostrat que *P. aeruginosa* 42A2 pot acumular PHA a partir de diferents substrats. En els cultius en bioreactor s'ha treballat amb dos substrats per tal d'intentar de produir un copolímer. Ara bé, tot i que s'ha estudiat a nivell estructural no s'ha pogut demostrar si a l'alimentar el cultiu amb àcid undecenoic en una primera fase i després amb àcid undecanoic, el polímer que s'obté és un polímer de bloc, una mescla física "d'homopolímers" o bé si un polímer aleatori.

Es va creure interessant observar en el microscopi electrònic de transmissió la morfologia dels grànuls quan es treballa amb àcid undecenoic i àcid undecanoic. Així com també l'aspecte dels grànuls a l'alimentar el cultiu amb ambdós substrats.

En la Figura 4.81, es mostren les micrografies de TEM de *P. aeruginosa* quan es fa créixer amb (a) àcid undecanoic (C11:0) i (b) àcid undecenoic (C11:1).

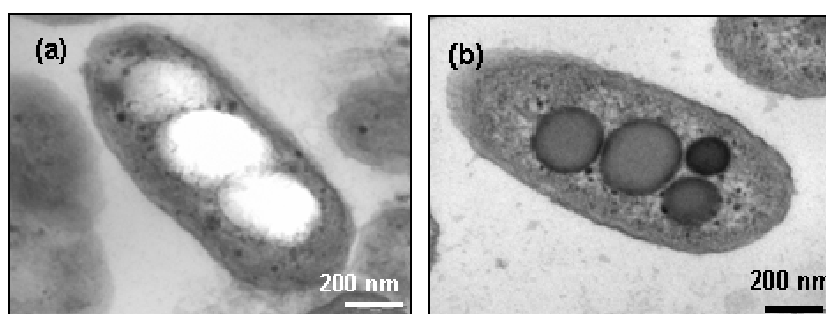


Figura 4.81 Micrografies de TEM. *P. aeruginosa* 42A2 quan es fa créixer en medi mínim mineral emprant com a substrat (a) àcid undecanoic i (b) àcid undecenoic.

Tal i com es pot observar en les micrografies, quan *P. aeruginosa* es fa créixer en medi mínim mineral i àcid undecanoic com a substrat, les inclusions lipídiques són blanques. En canvi, quan s'utilitza l'àcid undecenoic com a substrat les inclusions que es formen són fosques i perfectament esfèriques. El fet que tinguin colors diferents és degut a que els reactius que s'utilitzen per a contrastar les cèl·lules, el tetròxid d'osmi i l'acetat d'uranil. Aquests reactius reaccionen amb els dobles enllaços del polímer i tanyeixen la part més amorfa ja que té major difusió i major temps de residència (Curley *et al.*, 1996).

Considerant els resultats obtinguts, es va creure interessant observar també la morfologia dels grànuls de PHA, quan el cultiu s'alimentava amb aquests dos substrats.

A continuació, a la Figura 4.82, es mostren les micrografies obtingudes de cèl·lules de cultius en condicions proliferants i de les cèl·lules obtingudes dels cultius en condicions no proliferants.

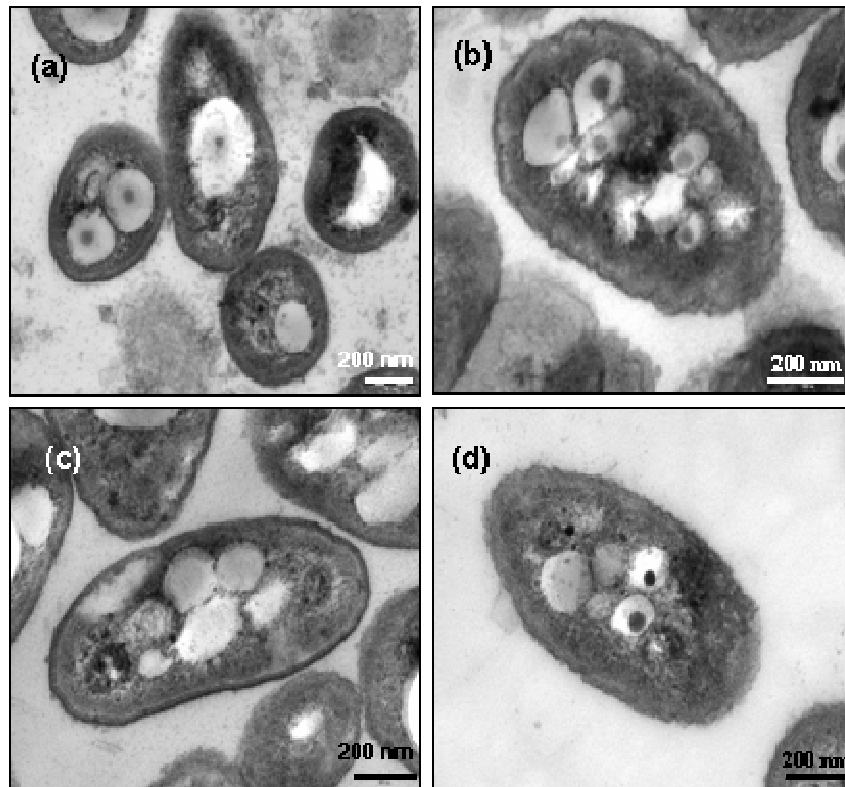


Figura 4.82. Micrografies de *P. aeruginosa* 42A2 quan es fa créixer en medi mineral mínim i se li subministren dues fonts de carboni (àcid undecenoic i àcid undecanoic). (a) 24 h cultiu proliferant, (b) 24 h cultiu NP, (c) 48 h cultiu proliferant i (d) 48 h cultiu NP.

Al cap de 24 h de l'addició del substrat, tant en els cultius en condicions proliferants com en no proliferants, s'observa la formació de grànuls en capes. S'observa que el centre del grànul és més fosc i les capes que l'envolten són més clares. Això és degut, a que el grànul s'ha començat a formar amb el primer substrat i que el segon s'ha anat addicionant al voltant. És a dir, el nucli del grànul està format per PHA-C11:1 i les capes externes estan formades per PHA-C11:0. Val a dir que no tots els grànuls presenten aquesta estructura. De totes maneres és molt difícil de poder quantificar quin percentatge representen dels grànuls totals ja l'observació de l'estructura en capes dependrà de que el tall ultrafí passi pel centre de la inclusió (Kelley *et al.*, 1999). A més a més, les micrografies de les 48 h de cultiu (després de l'addició del segon substrat) suggereixen que el grànul tendeix a colapsar perdent

l'estructura en capes que s'havia format. Les micrografies de TEM mostren que la formació d'ambdós polímers té lloc en el mateix grànul. L'estructura en capes suggereix que el polímer que es forma quan s'alimenta un cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 amb àcid undecenoic i àcid undecanoic de forma seqüencial, és una mescla física dels copolímers de PHA-C11:1 i de PHA-C11:0.

D'acord amb els resultats obtinguts en aquest estudi, quan es fa créixer *P. aeruginosa* 42A2 emprant dos substrats, àcid undecenoic i àcid undecanoic i amb un règim d'alimentació seqüencial, el PHA acumulat en la cèl·lula no es degrada quan s'addiciona el segon substrat, tal i com s'ha pogut observar en els processos HPR-F7 i HPR-F9. Aquest comportament està en concordança amb el descrit per Kim *et al.*, (1997) en el cas de *Pseudomonas oleovorans*. Per tant, és d'esperar que el polímer que es forma sigui una barreja física dels copolímers o bé que es formi un polímer de bloc. En canvi, en cultius amb *Alcaligenes eutrophus*, s'ha descrit la degradació del PHB acumulat quan s'addiciona el segon substrat. Amb aquest comportament s'afavoreix la producció del copolímer de poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerat) (Kim *et al.*, 1997).

En el nostre cas, es fa difícil distingir entre la formació del copolímer (PHA-C11:1-co-PHA-C11:0), una barreja física dels copolímers PHA-C11:1 i PHA-C11:0 i la formació d'un polímer de bloc dels dos copolímers, ja que ambdós copolímers tenen un pes molecular, un comportament tèrmic i uns valors de Tg molt semblants. Les micrografies de TEM mostren l'estructura en capes dels grànuls. Aquest fet suggereix la formació d'una mescla física dels copolímers, tot i que d'acord amb Hartmann, (2005) és possible la formació d'un percentatge petit del polímer de bloc. La formació del baix percentatge de polímer de bloc es pot explicar considerant les diferents distribucions de les cadenes polimèriques. Només les cadenes polimèriques que estan en l'etapa de formació o elongació durant el període de transició entre els dos substrats poden formar un polímer de tipus bloc. No així, les cadenes que ja estan acabades abans de l'addició del segon substrat o bé les que comencen a formar-se amb l'addició del segon substrat. Així doncs, els resultats d'aquests estudis suggereixen que la producció biosintètica, emprant cultius en règim d'alimentació seqüencial, de copolímers de bloc té moltes limitacions i que possiblement seria més fàcil obtenir els polímers de bloc mitjançant síntesi química (Hartmann, 2005).