



RECUPERACIÓN DE POLI- β -HIDROXIHEXANOATO-CO-OCTANOATO SINTETIZADO POR *Pseudomonas putida* MEDIANTE EL USO DE DISPERSIONES HIPOCLORITO-CLOROFORMO

N. Moreno-Sarmiento¹, D. Malagón-Romero¹, J. Cortázar, A. Espinosa-Hernández²

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá

ncmorenos@unal.edu.co

² Facultad de Ingeniería,

RESUMEN

Se estandarizó una técnica de recuperación de poli-3-hidroxihexanoato-co-hidroxi octanoato a partir de *P. putida*. El método emplea dispersiones de hipoclorito de sodio-cloroformo para la digestión del material celular y solubilización del polímero, respectivamente. Se evaluó el efecto de la concentración de hipoclorito, la temperatura y el tiempo sobre el porcentaje de recuperación, pureza, peso molecular y temperatura de fusión. Las mejores condiciones para recuperar este polímero fueron: hipoclorito al 5.25% (p/v) a 60°C durante 1 hora. Empleando estas condiciones fue posible mantener el peso molecular por encima del 87% con respecto al obtenido mediante extracción con cloroformo. La temperatura de fusión del polímero fue 57.7°C y 56.4°C para dos muestras al azar. La pureza del material recuperado es de 96%.

Palabras clave: *Pseudomonas putida*, PHAs, biopolímero, recuperación.

ABSTRACT

A technique for the recovery of poly-3-hydroxyhexanoate-co-hydroxy octanoate from *Pseudomonas putida* was developed. The method uses dispersions of sodium hypochlorite and chloroform for the digestion of the cellular material and the solubilization of the polymer, respectively. The effects of the sodium hypochlorite concentration, the temperature and the time, on the recovery percentage, purity, molecular weight and melting point were evaluated. The best conditions for the recovery of the polymer were: hypochlorite 5.25% (w/v) at 60°C for 1 hour. Under these conditions it was possible to maintain the molecular weight at above 87% of that obtained by chloroform extraction. The polymer melting point was 57.7 °C and 56.4 °C for two random samples. The purity of the recovered material was 96%.

Key words: Biopolymer, PHAs, *Pseudomonas putida*, recovery.

INTRODUCCIÓN

Entre los polímeros que pueden ser sintetizados en la naturaleza los PHAs (poli- β -hidroxialcanoatos) surgen como candidatos excelentes para remplazar los de origen petroquímico, por su similitud con éstos

y su facilidad para ser sintetizados a partir de sustratos económicos. Los PHAs son poliésteres de cadena lineal que presentan actividad óptica debido a la quiralidad del carbono β o carbono 3 que hace al compuesto perfectamente isotáctico. Dentro de la gama amplia de PHAs que se pue-

den obtener, solamente tres han sido producidos con alta productividad: PHB (poli- β -hidroxibutirato), P(HB-co-HV) (poli- β -hidroxibutirato-co-valerato) y P(HHx-co-HO)poli- β -hidroxihexanoato-co-octanoato) (Hahn *et al.*, 1995). El género *Pseudomonas* sintetiza principalmente este último tipo de co-polímeros (Witholt y De Koning, 1997).

El PHO (poli- β -hidroxioctanoato) tiene una temperatura de transición vítrea de -35°C por lo cual es un elastómero, amorfo y pegajoso a temperatura ambiente lo cual dificulta su procesamiento. Sin embargo, puede ser usado como látex al ser muy estable debido a que la densidad del polímero es muy cercana a la del agua (De Koning, 1995). La temperatura de fusión reportada para los PHA_{mc1} está entre 39°C y 61°C (De Koning, 1995). El peso molecular depende de la fuente de carbono, el método de recuperación y la cepa empleada (Sasikala y Ramana, 1995). Para *P. putida* el intervalo del peso molecular en peso (M_w) está entre 130.000 y 160.000 (Huijberts y Eggink, 1996).

La mayoría de los métodos de recuperación de PHAs, reportados en la literatura, son para el PHB. Inicialmente se recuperaba con solventes clorados tales como cloruro de metileno, cloroformo, tricloroetano o dicloroetano; sin embargo, ninguno de estos métodos es usado a nivel industrial, pero son técnicas comunes de laboratorio para la recuperación de PHAs (Ramsay, 2000). Uno de los inconvenientes que presenta este método es la alta viscosidad de soluciones de PHB por encima del 5%(p/v) lo que dificulta la eliminación de residuos celulares. Aunque la mayoría del solvente se recuperaba, los costos de recuperación resultaban demasiado altos para el proceso. Una alternativa a este método es el uso de enzimas, tales como lisozima, alcalasa y fosfolipasas combinadas con agentes con actividad superficial que degradan los componentes celulares distintos al polímero.

Una desventaja de este método es la pureza baja (cercana al 90% del material recuperado) (Hahn *et al.*, 1995).

Hahn *et al.* (1995) muestra el empleo de hipoclorito de sodio para la digestión de componentes celulares distintos al polímero; sin embargo, el hipoclorito causa una disminución del peso molecular en peso del PHB hasta en un 50% comparado con la extracción con cloroformo. Para evitar este problema Kwang *et al.* (1994) y Hahn *et al.* (1995) han usado dispersiones de hipoclorito-cloroformo donde se busca que el hipoclorito libere el polímero mediante la digestión de la membrana celular y demás organelos celulares y el cloroformo solubilice los gránulos liberados protegiéndolos de la acción degradativa del hipoclorito.

En este trabajo se establecen las condiciones para la recuperación del polímero acumulado en *P. putida* aislada de suelos colombianos mediante dispersiones de hipoclorito-cloroformo. *Pseudomonas putida* es un microorganismo que cumple con las condiciones adecuadas para producir PHAs con fines industriales, por lo cual se escogió para producir esta clase de materiales, según lo planteado por Griffin (1994): habilidad de la cepa para usar una fuente de carbono económica, alta velocidad de crecimiento y síntesis de polímero y alta acumulación de polímero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. Se empleó *Pseudomonas putida* aislada por el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes (CIMIC) a partir de suelos colombianos. La cepa se conservó liofilizada y fue activada en caldo nutritivo y repicada a Agar nutritivo de donde se tomó la semilla para la fermentación.

Medio de cultivo. El medio de cultivo es el empleado por Brandl *et al* (1988), el cual

fue modificado en la concentración de la fuente de carbono ya que *P. putida* presenta inhibición por sustrato (ácido octanoico) como lo demostraron Suárez y Suárez (1997). La composición del medio es: ácido octanoico 1g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.1 g/l, K_2HPO_4 5.8 g/l, KH_2PO_4 3.7 g/l, Solución 100 mM de MgSO_4 10 ml/l y solución de microelementos 1 ml/l.

Condiciones de fermentación. Las fermentaciones necesarias para la producción del biopolímero se realizaron en un fermentador SOVILAB con volumen de operación de 3 l a 200 rpm, 26°C y 1.7 v.v.m de aire durante 20 horas.

Seguimiento de la fermentación. La semilla se tomó del medio sólido (agar nutritivo) y se pasó a un preinóculo (30 ml), se dejó en agitador orbital a 200 r.p.m. durante 12 horas a 25°C. De allí se pasó al inóculo (300 ml) y permaneció 8 horas en las mismas condiciones de agitación y temperatura.

La fermentación fue monitoreada en su concentración de biomasa mediante la medición de absorbancia teniendo una curva patrón que relaciona absorbancia y concentración. El espectrofotómetro usado fue VARIAN modelo DMS 100 a una longitud de onda de 450 nm usando como blanco solución salina isotónica estéril. También se hizo un seguimiento a la acumulación de polímero en las células mediante tinción con sudán negro (Schlegel *et al.*, 1970).

Una vez finalizada la fermentación la biomasa fue separada del medio de cultivo mediante centrifugación en centrífuga SORVALL a 7200 X g durante 30 minutos. La biomasa fue separada del sobrenadante y resuspendida en solución Tris-HCl 0.01 M a pH 7.0 y congelada a -70°C. La biomasa se liofilizó en un equipo LABCONCO modelo 77500-00 durante 72 horas a una temperatura de -50°C y una presión de vacío de 5 μm de Hg.

Recuperación del polímero

Debido a que se usaron varios lotes de *P. putida* liofilizada se hizo necesario tener un patrón de comparación entre cada uno de los lotes. Se escogió la extracción con cloroformo como patrón. De esta manera, cada resultado obtenido con la dispersión hipoclorito-cloroformo se comparaba con el obtenido con cloroformo para el mismo lote. Se realizó un diseño factorial para la determinación de la influencia del tiempo, concentración de hipoclorito y temperatura en la recuperación del polímero teniendo como variable de respuesta la relación porcentaje de acumulación del ensayo a porcentaje de acumulación con cloroformo.

Inicialmente se determinó la relación peso de biomasa a volumen de dispersión; Kwang *et al.* (1994) y Hahn *et al.* (1995) muestran que el rango para dicha relación está entre 0.01 y 0.04 g biomasa/ml dispersión. Con base en esta información se realizaron 4 ensayos preliminares evaluando distintas relaciones: 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 g células liofilizadas/ml dispersión. Fijada la relación anterior se examinaron 3 variables (temperatura: 30 y 60°C; concentración de hipoclorito: 5 y 14% (p/v); tiempo: 30, 60, 90 minutos). Los ensayos de recuperación se realizaron por duplicado bajo un diseño factorial.

La biomasa se dejó en contacto con la dispersión (50% v/v) en un balón de 100 ml con agitación el tiempo según el ensayo. Se centrifugó en tubos de 50 ml a 10.000 X g durante 10 minutos; una vez finalizó la centrifugación, se retiraron la fase superior y la fase intermedia en la cual se hallan restos celulares. La fase orgánica se concentró en rotaevaporador a 70°C, sin vacío, hasta alcanzar un volumen cercano a 10 ml. El polímero se precipitó en metanol frío manteniendo una relación 1/10 en volumen de cloroformo a metanol. Se dejó decantar durante 12 horas a 4°C. Se desechó el sobre-

nadante y el polímero obtenido se dejó secar hasta alcanzar peso constante.

Para la determinación de la pureza de las muestras, una vez obtenido el polímero se solubilizó en cloroformo y se filtró a través de membranas de acetato de celulosa (0.45 μm) para retener las impurezas que pueda tener el material. Se dejó secar la solución filtrada a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante.

Evaluación de propiedades. El peso molecular en peso (M_w) se determinó mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) en un equipo HPLC Waters 510 Millipore usando dos columnas Water Styragel HT4 y HT5 empacadas con estireno y divinilbenceno altamente entrecruzados, colocadas en serie a 30°C y detector de índice de refracción (IR) a 30°C. La fase móvil fue tetrahidrofurano con un flujo de 0.3 ml/min. Se utilizaron patrones de poliestireno monodispersos entre 2×10^4 y 1×10^6 de peso molecular.

La temperatura de fusión se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo TA modelo 2100, en modo estándar, con flujo de helio 20 cm^3/min ., una rampa de calentamiento de 10°C/min entre 25 y 110°C.

Una muestra de polímero recuperado se sometió a metanólisis siguiendo la metodología descrita por Braunegg *et al.* (1978) para obtener el metil-éster del polímero y ser detectado mediante cromatografía de

gases en un equipo VARIAN 3400 usando una columna DB-WAX semicapilar (15 m*0.53 mm*0.1 μm) con un flujo de helio de 10 ml/min. El programa de la columna fue 1 min a 60°C y luego una rampa de calentamiento de 15°C/min hasta 220°C donde permanece 1 minuto. Los estándares externos empleados fueron ácido β -hidroxibutírico, β -hidroxihexanoato, β -hidroxioctanónico y β -hidroxidecanoato marca SIGMA-ALDRICH; el estándar interno usado fue ácido ben-zocio marca MERCK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos realizados para determinar la relación biomasa a dispersión se presentan en la Tabla 1. En la relación de 25 ml de dispersión / g de biomasa, el volumen de dispersión fue muy pequeño y no alcanzó a entrar en contacto con toda la biomasa. En la relación de 75 ml de dispersión / g de biomasa la fase orgánica queda demasiado viscosa, lo cual dificulta la filtración. En la relación 100 ml de dispersión / g de biomasa se obtiene la fase orgánica fácilmente filtrable y la fase acuosa con pocos residuos celulares. Con base en estos resultados se escogió la relación 100 ml de dispersión / g de biomasa para la realización de los demás ensayos. Con el fin de mantener la relación anterior, en todos los ensayos se usaron 0.5 g de biomasa liofilizada y 50 ml de dispersión (25 ml de hipoclorito de sodio y 25 ml de cloroformo) y se varió la concentración de hipoclorito, la temperatura y el tiempo.

Tabla 1
Relación volumen de dispersión a cantidad de biomasa

Volumen de la dispersión a cantidad de biomasa (ml/g)	Rendimiento (g de polímero recuperado / g biomasa)
100	0.0894
75	0.0416
50	0.0200
25	Imposible determinar

La Tabla 2 presenta los resultados del análisis de varianza obtenido para el diseño factorial previsto, el valor de F calculado es el obtenido para un nivel de confianza

de 95%. En dicha tabla se ve que existe efecto significativo del tiempo, en tanto que no existe un efecto significativo de temperatura y concentración.

Tabla 2
Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculado	F tabla
Temperatura	0.00015	1	0.0015	0.05	4.75
Concentración	0.00482	1	0.00482	1.67	4.75
Tiempo	0.44880	2	0.22440	78.05	3.89
Temperatura-concentración	0.00735	1	0.00735	2.56	4.75
Temperatura-tiempo	0.01277	2	0.00638	2.22	3.89
Concentración-tiempo	0.04625	2	0.02315	8.04	3.89
Temperatura-concentración-tiempo	0.02995	2	0.01497	5.20	3.89
Error	0.03450	12	0.00287		
Total	0.58458	23			

En cuanto a los efectos conjuntos (interacción de dos variables) se aprecia en la Tabla 2 que es el par concentración-tiempo el que tiene una mayor influencia sobre el rendimiento, en tanto que los otros pares temperatura-tiempo y temperatura-concentración no es significativa su influencia. El efecto de la interacción de las tres variables estudiadas resultó ser significativo.

Hahn *et al.* (1995) reportan que en la medida que transcurre el tiempo se recupera más polímero, pero se corre el riesgo que disminuya el peso molecular. Con respecto a la concentración de hipoclorito, dicho autor concluye que a medida en que aumenta la concentración aumenta el porcentaje de recuperación. Desafortunadamente no estudió una temperatura distinta a 30°C. Al comparar los resultados presentados por dichos investigadores y el presente trabajo se encuentran grandes similitudes: el tiempo es fundamental en la recuperación de polímero pero también lo es la concentración del hipoclorito; la temperatura no resulta ser significativa en la recuperación.

La Figura 1 muestra que el porcentaje de acumulación resulta ser muy similar al ob-

tenido mediante extracción con cloroformo y en algunos ensayos fue mayor, lo cual es un gran avance al disminuir el volumen de solvente empleado y el tiempo de recuperación frente al método de recuperación con cloroformo.

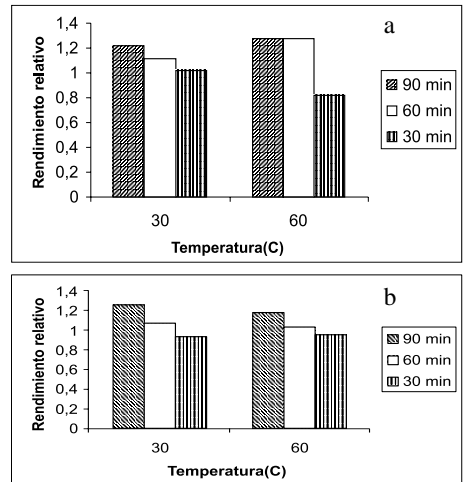


FIGURA 1. Resultados de la recuperación del polímeros con dispersiones hipoclorito-cloroformo. a) Concentración de hipoclorito 5% (p/v); b) concentración de hipoclorito 14% (p/v).

Para definir las condiciones para la recuperación de polímero se deben revisar los resultados de peso molecular para cada uno de los ensayos realizados. La Figura 2 muestra el peso molecular para cada uno de los ensayos realizados. Como se puede concluir de dicha figura el peso molecular disminuye en la medida que aumenta la concentración de hipoclorito, con lo cual se demuestra que a altas concentraciones de hipoclorito éste hidroliza las cadenas del polímero. A mayor tiempo de contacto también se presenta una disminución en el peso molecular. A 60°C se conserva mejor el peso molecular que a 30°C. Para todos los ensayos el peso molecular resultó ser superior al 87% del valor obtenido con el patrón (polímero extraído con cloroformo) mientras en otros casos se obtiene una conservación del peso molecular cercana al

60% del obtenido mediante extracción con cloroformo cuando recuperan PHB de *R. eutropha* y *E. coli* recombinante (Hahn *et al.*, 1995). De lo anterior se puede concluir que dependiendo de la cepa utilizada y del polímero sintetizado el ataque del hipoclorito sobre el polímero será mayor o menor.

El punto de fusión determinado mediante DSC de dos muestras al azar es 57.7°C y 56.4°C. Estas temperaturas, comparadas con la temperatura al usar extracción con cloroformo (59.8°C) para recuperar el polímero muestra una leve disminución lo cual está relacionado con la disminución del peso molecular debido al hipoclorito. La disminución es baja lo cual indica que el método estandarizado no afecta considerablemente los enlaces del polímero.

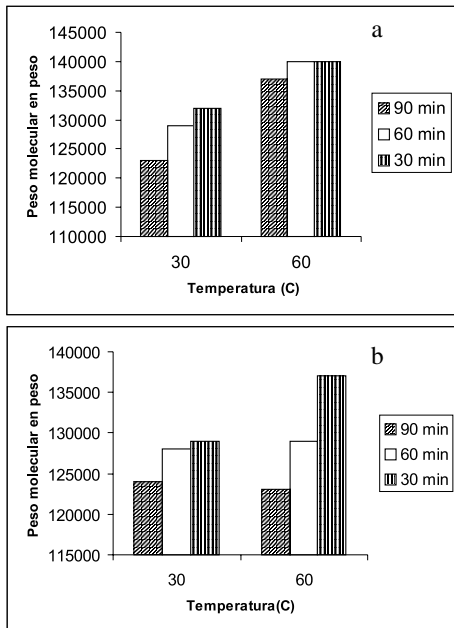


FIGURA 2. Peso molecular en peso (M_w) para cada uno de los ensayos. a) Concentración de hipoclorito 5% (p/v); b) concentración de hipoclorito 14% (p/v).

La Figura 3 muestra la cromatografía realizada a una muestra de polímero recuperada según el método estandarizado. En dicha figura se aprecia el pico del ácido benzoico (5.01 min.), el metil-β-hidroxihexanoato (5.354 min.) y el metil-β-hidroxi octanoato (6.969 min.), por lo cual se concluye que el polímero sintetizado y recuperado es el poli-β-hidroxi hexanoato-co-octanoato. Este resultado es similar al reportado por Witholt y De Koning (1997) para cepas del género *Pseudomonas*; bajo las condiciones de fermentación el aislamiento colombiano no produjo PHB (tiempo de retención 3.90 min.).

Las condiciones finales para la recuperación del polímero son entonces:

- Concentración de hipoclorito: 5% (p/v) por resultar más económico que la del 14% (p/v).
- Temperatura: 60°C por ser la que mejor conserva el peso molecular del polímero.
- Tiempo: 60 minutos para conservar el peso molecular.

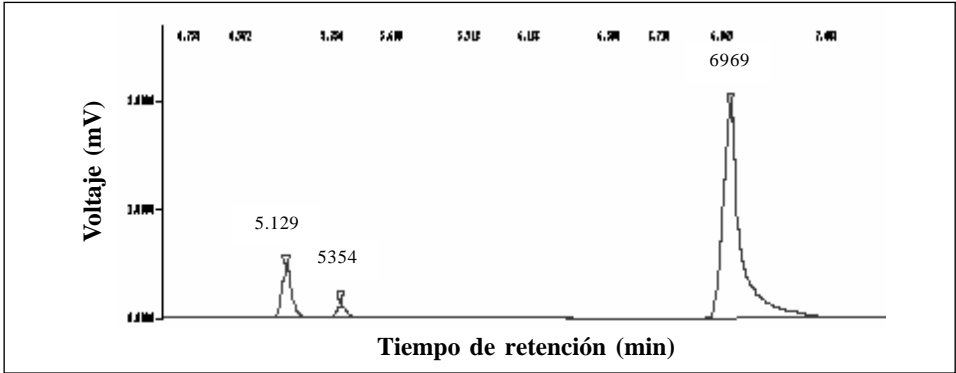


FIGURA 3. Cromatografía del biopolímero sintetizado por *P. putida* en el cual se aprecian los picos del metil-benzoato (5.129 min), metil- β -hidroxihexanoato (5.354 min) y metil- β -hidroxioctanoato (6.969 min).

La pureza obtenida con estas condiciones finales es 96%, la cual es cercana a la reportada por Kwang *et al.* (1994) cuando recupera PHB de *R. eutropha* la cual es de 97%.

CONCLUSIONES

A través del presente trabajo se establecieron las condiciones para la recuperación de un PHA sintetizado por *P. putida* usando dispersiones de hipoclorito-cloroformo, disminuyendo en 5 veces el volumen de cloroformo usado hasta el presente. La relación volumen de dispersión a cantidad de biomasa establecida fue 100 ml de dispersión/g biomasa. Las condiciones que se establecieron para recuperar este polímero son: temperatura 60°C, tiempo 1 hora y concentración de hipoclorito de sodio: 5%(p/v). Bajo estas condiciones la pureza es del 96% conservando el 87% del peso molecular obtenido mediante extracción con cloroformo.

LITERATURA CITADA

- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. 1978. A rapid gas chromatographic method for determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology* 6: 29-37.
- DE KONING, G. 1995. Physical properties of bacterial poly- α -hydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology* 41 (suplemento 1): 303-309.
- GRIFFIN, G.L. 1994. *Chemistry and Technology of biodegradable polymers*. Primera edición. Blackie Academic and Professional. Londres, Inglaterra, 48-96.
- HUIJBERTS, G.; EGGINK, G. 1996. Production of poly (3 - hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT 2442 in continuous cultures. *Applied Microbiology Biotechnology* 46: 233-239.
- KWANG, S.; CHANG, Y.; KIM, B.; CHANG, H. 1994. Optimization of Microbial Poly (3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnology and Bioengineering* 44 (2): 256-261.
- HAHN, S.K.; CHANG, Y.K.; LEE, S.Y. 1995. Recovery and characterization of poly

- (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 61 (1): 34-39.
- RAMSAY, J. 2000. Separation of PHA from microbial biomass and its intracellular and extracellular biodegradation. Memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- SASIKALA, CH.; RAMANA, CH. 1995. Biodegradable polyesters. *Advances in applied microbiology* 42: 97-165.
- SCHLEGEL, H.G; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly- α -hydroxybutyric acid. *Archives of Microbiology* 71: 283-294.
- SUÁREZ, C; SUÁREZ, J. 1997. Biosíntesis y caracterización de polímeros biodegradables PHAs (poli - β -hidroxialcanoatos), mediante bacterias del género *Pseudomonas*. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- WITHOLT, B.; DE KONING, G. 1997. A process for the recovery of poly (hidroxyalkanoates) from *Pseudomonas*. Part 1: Solubilization. *Bioprocess Engineering* 17: 7-13.

Recibido: 02.09.2005

Aprobado: 14.03.2006