

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología

Instituto del Agua



**PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
BIOPOLIMÉRICOS (PHAs) DESDE
ALPEORUJO POR MEDIO DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO**

**Polyhydroxyalkanoates production by nitrogen
fixing bacteria from olive mills wastewater**

Tesis doctoral (PhD Thesis)

Federico Cerrone

Febrero de 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Federico Cerrone
D.L.: GR 1872-2011
ISBN: 978-84-694-1297-8

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología

Instituto del Agua



**PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
BIOPOLIMÉRICOS (PHAs) DESDE
ALPEORUJO POR MEDIO DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO**

Federico Cerrone

Tesis doctoral

Febrero 2011

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA.

INSTITUTO DEL AGUA

**PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES
BIOPOLIMÉRICOS (PHAs) DESDE
ALPEORUJO POR MEDIO DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO**

MEMORIA PARA LA OBTENCIÓN DEL DOCTORADO EUROPEO

Fdo D. Federico Cerrone

Directores:

Fdo: D. Jesús González-López

Catedrático de Microbiología

Departamento de Microbiología

Universidad de Granada

Fdo: Dña. Clementina Pozo

Profesora Titular de Microbiología

Departamento de Microbiología

Universidad de Granada

Este trabajo ha sido financiado por la Unión Europea en el ámbito del proyecto de investigación titulado: “Production of polyhydroxyalkanoates from olive oil mills wastewater: POLYVER” (**COOP-CT-2006-032967**), proyecto europeo incluido en el VI Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico

1	Introducción	8	
	1.1	La olivicultura	10
	1.2	Sistemas de extracción del aceite de oliva	11
	1.2.1	Residuos generados y efectos medioambientales	12
	1.2.2	Bioensayos para determinar la ecotoxicidad del alpeorujo	14
	1.3	Alpeorujo	15
	1.3.1	Características químico-físicas	15
	1.3.2	Usos y aprovechamiento del alpeorujo	16
	1.4	Plásticos	19
	1.4.1	Definición	19
	1.4.2	Clasificación de los plásticos	19
	1.4.3	Consumo mundial de plásticos	20
	1.5	Bioplásticos	22
	1.5.1	Definición y características	22
	1.5.2	El mercado mundial del bioplástico	24
	1.6	Polihidroxicanoatos (PHAs)	28
	1.6.1	Definición y características	28
	1.6.2	Biosíntesis de PHA	30
	1.6.3	Interconexión entre la biosíntesis de PHAs y la síntesis de alginato. 33	
	1.6.4	Regulación del almacenamiento de PHAs en el gránulo	34
	1.6.5	Producción de PHAs desde diferentes sustratos	36
	1.6.6	Uso de los subproductos generados en el proceso de obtención del aceite de oliva (alpechín y alpeorujo) como sustratos para la síntesis de PHAs. 37	
	1.6.7	Producción de PHAs utilizando biorreactores	38
	1.6.8	Producción de PHAs por parte de cepas de <i>Azotobacter</i> sp	39
	1.6.9	Producción de PHAs en bioreactores mediante cepas de <i>Azotobacter</i> sp 40	
2	Objetivos	42	

3	Materiales y Métodos	46
3.1	Microorganismos.....	48
3.2	Selección de microorganismos con capacidad para almacenar polihidroxialcanoatos (PHAs).	48
3.3	Aplicación de técnicas microscópicas para la detección de gránulos intracelulares de polihidroxialcanoatos (PHAs)	49
3.3.1	Tinción con Negro Sudán	49
3.3.2	Tinción Azul Nilo II.....	49
3.4	Extracción de polihidroxialcanoatos (PHAs).....	50
3.4.1	Extracción de PHA usando un disolvente orgánico clorado: cloroformo	50
3.4.2	Extracción de PHA mediante solubilización de NPCM (<i>Non PHAs Cell Mass</i>) utilizando un tratamiento térmico en medio ácido.....	51
3.5	Determinación de la estructura de los biopolímeros extraídos mediante resonancia magnética nuclear (RMN)	51
3.6	Biorreactores anaeróbicos a escala de laboratorio.	53
3.7	BIORREACTOR (Biostat®- plus)	55
3.8	Biorreactor a escala de planta piloto.....	56
3.9	Caracterización química de las muestras de <i>alpeorujo</i>	57
3.9.1	Demanda química de oxígeno (DQO).....	57
3.9.2	Demanda biológica de oxígeno en 5 días: DBO₅.....	58
3.9.3	Azúcares solubles totales.	58
3.9.4	Determinación de ácidos grasos volátiles (VFAs) mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).....	59
3.10	Ensayo de ecotoxicidad: ensayo MICROTOX®.	60
4	Resultados.....	64

4.1	Caraterización de las muestras de <i>alpeoruj</i>o.....	66
4.2	Selección de las cepas productoras de PHAs	67
4.2.1	Tinción Negro Sudán y Rojo-Nilo	67
4.3	Crecimiento de las cepas bacterianas en medios químicamente definidos.....	68
4.4	Producción de PHAs en medios químicamente definidos	70
4.5	Producción de PHAs por parte de cepas de <i>Azotobacter</i> sp en medios químicamente definidos adicionado de fuente de nitrógeno.	72
4.6	Crecimiento de cepas de <i>Azotobacter</i> sp en presencia de diferentes ácidos grasos volátiles de cadena corta (VFAs)	74
4.7	Crecimiento y producción de PHAs en medio químicamente definido (simulación de alpeorujo)	76
4.8	Crecimiento y producción de PHAs por cepas bacterianas del género <i>Azotobacter</i> en medios de alpeorujo fresco diluido.....	79
4.8.1	Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas en muestras de alpeorujo fresco y diluido.	79
4.8.2	Producción bacteriana de bioplástico en medios de alpeorujo fresco y diluido.....	80
4.9	Crecimiento y producción de PHAs por cepas bacterianas del género <i>Azotobacter</i> en medios de alpeorujo diluido y digerido anaerobicamente.....	82
4.9.1	Resultados preliminares sobre crecimiento bacteriano en muestras de alpeorujo diluido y digerido anaerómicamente.	84
4.9.2	Producción del bioplástico utilizando como sustrato alpeorujo diluido en proporción creciente (20-60% w/v) y digerido anaerómicamente	85
4.10	Producción de PHAs en alpeorujo diluido y digerido anaerobicamente en presencia de micronutrientes	

4.11	Producción de PHAs por parte de las cepas de <i>Azotobacter</i> en muestras de alpeorujo digerido anaerobicamente usando biorreactores.....	91
4.11.1	Efecto de la aireación (como incremento de las revoluciones por minuto, RPM) sobre la producción de PHAs usando como sustrato alpeorujo digerido anaerobicamente y diluido al 60%.....	93
4.11.2	Efecto de la estrategia de “ <i>famine and feast</i> ” en la producción de PHAs usando como sustrato alpeorujo digerido anaerobicamente y diluido al 60%.....	97
4.12	Producción de PHAs en planta piloto. Estrategias de escalado	99
4.12.1	Adaptación de las cepas al sustrato en el proceso de escalado.....	99
4.12.2	Optimización del sustrato para la producción de PHAs en planta piloto.....	103
4.13	Caracterización de los diferentes biopolímeros obtenidos.	104
4.14	Bioensayo de toxicidad (MICROTOX®).....	107
5	Discussion.....	110
6	Conclusiones.....	122
7	Bibliografía.....	126

1 Introducción

1.1 La olivicultura.

El cultivo del olivo es uno de los pilares de la milenaria tradición cultural y culinaria de los pueblos de la cuenca del Mediterráneo. El olivo (*Olea europea* L.) es una planta con pocos requerimientos de agua, soporta muy bien los fuertes vientos, pero no la latitud, por lo que su cultivo se extiende mayoritariamente por los países ribereños del Mediterráneo: España, Francia, Italia, Grecia, Turquía, Siria, Israel, Palestina, y países del Magreb, correspondiendo la producción conjunta de todos estos países al 89% de la producción mundial.

Actualmente, la superficie total dedicada al cultivo del olivo es de 7 millones Has, con 800 millones de árboles en explotación (*International Olive Oil Council* 2004). En España, el cultivo del olivo ocupa aproximadamente el 15% de las tierras cultivadas correspondientes a unos 2.000.000 Has. La mayoría de ellas se localizan en Andalucía, concretamente en las provincias de Jaén y Córdoba (Figura 1.1).

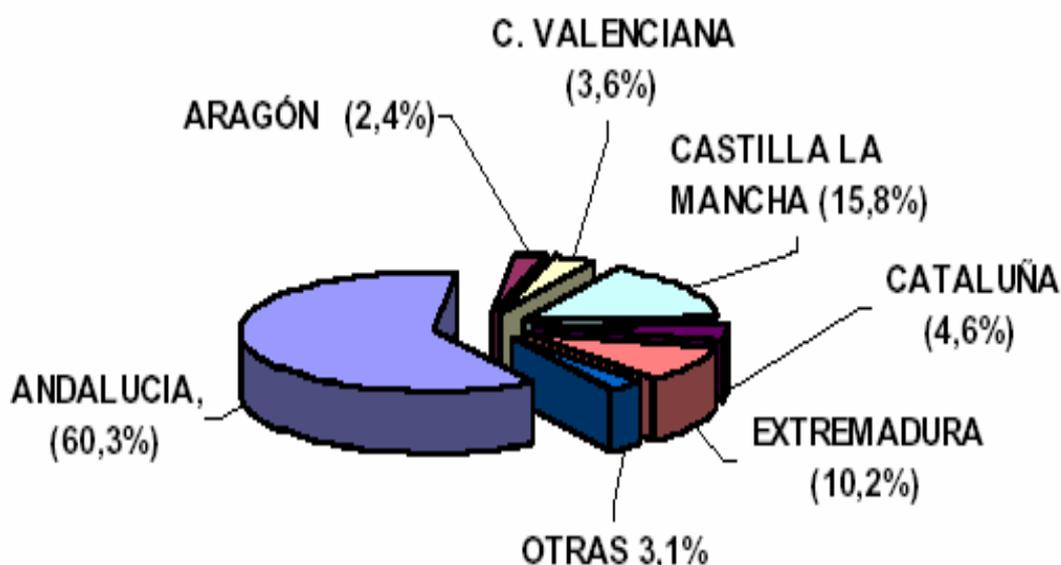


Figura 1.1. Distribución de superficie cultivada a olivar por Comunidad Autónoma. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Agencia para el aceite de oliva. Informe del mercado del aceite de oliva. Enero 2008.

1.2 Sistemas de extracción del aceite de oliva.

El proceso de obtención del aceite de oliva es un proceso largo y tedioso que incluye varias etapas. La calidad y eficiencia de cada una de ellas dará lugar a un producto final de alta calidad. Las fases son las siguientes: recepción, limpieza, lavado y pesada, molienda, batido, extracción y purificación. La extracción puede ser:

- a) Extracción por prensado, en desuso actualmente y sólo utilizada en la obtención de aceites muy específicos.
- b) Extracción por centrifugación ó sistema continuo:
 - Sistema continuo en tres fases (con la adición de agua)
 - Sistema continuo en dos fases.

El sistema de extracción en continuo en tres fases incluye generalmente dos centrifugados, uno horizontal y otro vertical. Mediante el primer centrifugado se separan las tres fases del proceso: fase sólida (orujo), fase líquida (alpechín) y fase oleosa (aceite). Generalmente el alpechín presenta restos sólidos y de aceite, mientras que el aceite presenta restos de alpechín y algunos sólidos. Estas fases son sometidas a una segunda centrifugación mediante la cual se extrae todo el aceite y todo el alpechín. La cantidad y composición del alpechín depende de varios factores como son: tipo de sistema de extracción, variedad de aceitunas, tipo de suelo, climatología del área y estado de maduración del fruto. En la campaña 1990-91 surgió un nuevo sistema de centrifugación que rápidamente se denominó "ecológico" el cual rendía dos fracciones: sistema en dos fases. En este sistema, la fase líquida se reduce (debido a la falta de agua), y el orujo se mezcla con el poco alpechín resultante, generando un residuo: alpeorujo.

En España, este sistema rápidamente sustituyó al sistema establecido de tres fases. Aunque el rendimiento en la producción es más bajo, se reduce la cantidad de agua utilizada en el proceso (el agua es un recurso escaso en la zona Mediterránea) y se evita la aparición de alpechín, aunque su sustituto, el alpeorujo también presenta graves problemas de contaminación medioambiental debido a su elevada carga orgánica y alto contenido en polifenoles. En Andalucía, el alpeorujo generado en la campaña 2005/2006 rozó las 4.000.000 toneladas (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, actualmente Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino)

España, es el país de la Unión Europea en el que el sistema de extracción en dos fases está mayoritariamente establecido (90% de las almazaras presentan este sistema de extracción, frente al 10% que siguen el sistema en tres fases). Este

hecho llama poderosamente la atención, considerando que en Italia, segunda productora mundial de aceite de oliva, el sistema en dos fases apenas se utiliza (<5%).

En base a las propiedades organolépticas de los mismos, se distinguen los siguientes tipos de aceite:

- Aceite de oliva extra virgen: aceite de oliva libre de acidez (expresada como ácido oleico) estando este compuesto en cantidad < de 0,8%
- Aceite de oliva virgen: ácido oleico < del 2%
- Aceite de oliva común: contenido de ácido oleico < del 3,3 %
- Aceite de oliva lampante: (no apto para el consumo humano): contenido de ácido oleico > del 3,3 %, y peor calidad, utilizándose en la industria.
- Aceite de oliva virgen refinado: contenido de ácido oleico < del 0,3 %, y además la refino no altera su estructura glicérica inicial.
- Aceite de oliva: expresado como mezcla de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen; (contenido de ácido oleico < del 1 %)
- Aceite de orujo: obtenido por extracción con solventes o extracción física; se divide en los siguientes subproductos:
 - aceite de orujo crudo
 - aceite de orujo refinado contenido de ácido oleico < del 0,3 %
 - aceite de orujo como suma de aceite de orujo crudo y aceite de orujo refinado (contenido de ácido oleico < del 1 %)

1.2.1 Residuos generados y efectos medioambientales

La agroindustria del olivar que gira en torno a la producción del aceite de oliva, conlleva la generación de residuos de alto poder contaminante debido principalmente a su carga orgánica y contenido en polifenoles. Los residuos generados (dependiendo del sistema de extracción del aceite de oliva utilizado) son dos: el *alpechín* y el *alpeorujo*. Su acción tóxica se basa principalmente en el papel antimicrobiano que desarrollan, su poder fitotóxico y alteración de la fertilidad del suelo, afectando igualmente a sistemas acuáticos.

1.2.1.1 Actividad antimicrobiana

Diferentes compuestos polifenólicos contenidos en las aceitunas en primer lugar, y luego presentes en solución tras la extracción, mantienen su poder

antimicrobiano, como demostraron algunos autores (Capasso *et al.*, 1995, Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996). (Capasso *et al.*, 1995) han manifestado que esta acción antimicrobiana puede ser un mecanismo de defensa del olivo contra bacterias fitopatógenas.

1.2.1.2 Fitotoxicidad y alteración edafológica

Al mismo tiempo, los compuestos contenidos en el alpechín ó el alpeoreujo (polifenoles principalmente) ejercen una acción fitotóxica frente a organismos vegetales (presumiblemente en respuesta a un mecanismo antagónico desarrollado por el mismo árbol), sea sobre organismos en fase de germinación (Casa *et al.*, 2003), ó sobre organismos vegetales adultos (Aranda *et al.*, 2007).

La alteración edafológica se manifiesta en un cambio de la fertilidad del suelo (Mekki *et al.*, 2007) que se evidencia, por ejemplo, en la formación de complejos coloidales, los cuales y debido a la hidrofobicidad de su constituyentes pueden resultar en centros de agregación de materia orgánica disuelta (DOM) y de liberación intermitente de compuestos de naturaleza tóxica (Konstantinou *et al.*, 2009); otra característica del suelo que puede ser afectada, es su composición mineral y valor de pH (Sierra *et al.*, 2001), así como su capacidad de intercambio con otros compartimentos medioambientales, por ejemplo la capacidad de retención hídrica (Mellouli *et al.*, 1998).

1.2.1.3 Efecto en ecosistemas acuáticos

El uso de estos residuos (alpechín y alpeorujo), como enmiendas agrícolas provoca importantes daños en ecosistemas acuáticos y en las aguas subterráneas en particular. La presencia de estos residuos genera una importante disminución en la difusión de oxígeno, así como la quelación de metales pesados, básicamente en aquellos que tienen mayor afinidad por la materia orgánica (Cu II) y por los grupos -OH de los residuos fenólicos presentes en el compuesto (Konstantinou *et al.*, 2009), constituyendo de esta forma una importante fuente de lixiviado, con alta carga de metales pesados, contaminando las aguas subterráneas; así mismo, podrían generar la formación de compuestos con mayor acción tóxica, si al infiltrarse en las aguas subterráneas destinadas al consumo humano, posteriormente reaccionan con el cloro adicionado para la potabilización de estas masas, formándose compuestos altamente tóxicos como los clorofenoles (Spandre *et al.*, 1996).

1.2.1.4 Contaminación por transformación química

Otra posibilidad recogida por (Obied *et al.*, 2005) es que el almacenamiento de residuos sólidos derivados del proceso de obtención del aceite de oliva den lugar a alteraciones en la estructura de los compuestos polifenólicos presentes, determinando la acumulación de compuestos recalcitrantes y por lo tanto con mayor efecto contaminante.

1.2.2 Bioensayos para determinar la ecotoxicidad del alpeorujo.

En general, cualquier compuesto dependiendo de la dosis, puede provocar toxicidad en organismos vivos. Un análisis típico para determinar la toxicidad es la concentración letal que es capaz de matar al 50% de los organismos considerados diana: CL_{50} . Esos organismos son elegidos por su sensibilidad y/o representatividad en el medio dónde se prevé que el compuesto pueda ejercer su acción tóxica. Sin llegar a la muerte del organismo diana, hay otros ensayos que reflejan la toxicidad de un compuesto a través de la reducción de alguna manifestación metabólica. La pérdida de bioluminiscencia es uno de ellos. En ese caso, la toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC_{50}) (Onorati *et al.*, 2004).

Uno de los parámetros importantes que concierne a la toxicidad del alpeorujo es su actividad ecotóxica, especialmente como se ha comentado anteriormente, en los ecosistemas acuáticos y sobre su población planctónica; en este sentido, uno de los métodos más eficaces y rápidos de detección de dicha toxicidad es la aplicación del ensayo de reducción de la bioluminiscencia. Esta bioluminiscencia es propia de una bacteria marina (*Vibrio fischeri*), ubicua de aguas marinas, y a menudo establecida como ectosimbionte de invertebrados marinos y en casi la mayoría de organismos abismales. Su bioluminiscencia es debida a la expresión de un operón $LuXCDABE$, donde actúan como reguladores antagónicos $LuxR$ y $LuXI$, genes que codifican respectivamente para el regulador de la transcripción y la sintasa de AHLs (Meighen *et al.*, 1993). La reacción de bioluminiscencia bacteriana en la que un compuesto orgánico, que suele ser diferente para cada especie, y que es denominado genéricamente luciferina, es oxidado en una reacción catalizada por una enzima, también diferente para cada especie, denominada luciferasa, está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración

celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia.

Los ensayos basados en la reducción de la bioluminiscencia son altamente sensibles y dependientes del mecanismo denominado percepción del quórum ó *quórum sensing* (Paixão *et al.*, 1999). Son precisamente estas dos características (sensibilidad y dependencia de la densidad de población) lo que determina que la detección de la bioluminiscencia sea un ensayo viable de la ecotoxicidad de un compuesto. A esto se añade también la característica de ubicuidad de *Vibrio fischeri*, y su escala microbiana, que permiten una evaluación rápida y bastante sensible. Otro bioensayo a escala microbiana es aquel en el que se utiliza la bacteria *Photobacterium phosphoreum* (de manera análoga a *Vibrio fischeri*) la cuál exhibe un mecanismo de regulación diferente (Mancini *et al.*, 1988). Sin embargo, ha sido demostrado que la sensibilidad de respuesta del microorganismo depende de la concentración de algunos compuestos en las muestras por lo que su aplicación es limitada. Este mismo patrón se repite cuando se usan bioensayos con micro crustáceos (Paixão *et al.*, 1999). A todo esto se añade el hecho que no todos los compuestos actúan de la misma manera; en particular, compuestos volátiles y débilmente solubles pueden hacer subestimar el resultado del ensayo.

1.3 Alpeorujo.

1.3.1 Características químico-físicas.

La mezcla de los dos subproductos (orujo y alpechín) derivados de la extracción del aceite de oliva por el sistema continuo en dos fases, genera un subproducto único con características intermedias y elevado grado de humedad: alpeorujo.

Este residuo con un característico color marrón oscuro debido a la polimerización de los compuestos fenólicos, y fuerte olor, presenta un valor de pH ligeramente ácido (5,0-5,5), un elevado contenido en materia orgánica (60-98%), y un menor contenido (0,5-2,5%) en polifenoles respecto al presente en alpechín. Además, presenta una elevada relación C/N y contenidos en P y K que oscilan entre 0,41 y 2,93%, respectivamente (Cabrera, 2002). Su análisis químico también revela un contenido notable de lípidos (8-18%) así como de azúcares totales (9-19%), entre los que destacan principalmente dos carbohidratos hidrosolubles: glucosa y manitol, y en menor proporción polisacáridos pécticos: xilano y xiloglucano procedentes de la pared celular de las aceitunas. Los valores de los

parámetros químico-físico descritos varían extraordinariamente y dependen en diferente medida de numerosos factores tales como: características de la cosecha, climatología y variedad de la aceituna.

1.3.2 Usos y aprovechamiento del alpeorujo

Desde el establecimiento del sistema continuo en dos fases como sistema de extracción de aceite de oliva, el interés sobre los posibles tratamientos del alpeorujo ha sido muy difuso, tanto a nivel de investigación científica como de aplicación agroindustrial. De hecho, a pesar de no presentar el poder contaminante del alpechín (sobre todo en cuanto al contenido fenólico), este subproducto sigue presentando una importante problemática a nivel de aprovechamiento, fundamentalmente debido a los ingentes volúmenes generados. Los principales usos del alpeorujo son:

1.3.2.1 Aceite de orujo.

El alpeorujo húmedo es recogido y desecado en balsas durante 8-10 días; posteriormente le se aplica un secado mas enérgico (400° C) obteniendo un residuo con el 5% de humedad. En este punto del proceso se aplica una extracción química mediante n-hexano obteniendo el orujillo (alpeorujo seco y extractado) que presenta una humedad final entre el 10-13%. Debido al uso de disolventes químicos y a las elevadas temperaturas del proceso, este aprovechamiento está muy lejos de ser la solución ideal para el tratamiento del alpeorujo, debido a las alteraciones que sufre el aceite extraído. En este sentido, en el año 2001 surge la controversia de la detección de benzopirenos (sustancias altamente cancerígenas) en el aceite de orujo. El sector orujero sufre una importante recesión a partir de esa fecha. Sin embargo, y según los datos aportados por la Agencia para el Aceite de Oliva, el sistema mayoritario de extracción de aceite de oliva en España actualmente sigue siendo en dos fases.

1.3.2.2 Energía en plantas de cogeneración.

Una planta de cogeneración aprovecha el uso de un combustible para obtener al mismo tiempo energía eléctrica/mecánica y energía térmica. Debido a su elevado poder calorífico (400 Kcal/Kg) (Caputo *et al.*, 2003) el alpeorujo puede cumplir con ambas funciones. De hecho se dan ya notables ejemplos de utilización

de alpeorujos en las mismas almazaras como fuente de energía eléctrica para el funcionamiento de la planta.

De manera parecida, se puede utilizar el alpeorujos como fuente para producir biogas ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) previa digestión anaeróbica (Tekin *et al.*, 2000) y para la producción de metano (Borja *et al.*, 2003) ó *syngas* (Jurado *et al.*, 2003).

El problema principal del aprovechamiento del alpeorujos como combustible es la generación de cenizas de diferente tamaño de difícil tratamiento y compleja composición, que necesariamente tienen que ser filtradas y tratadas para no constituir un peligro para la salud humana, suponiendo un importante incremento de los costes debido al tratamiento.

1.3.2.3 Abono agrícola.

Aprovechando que la localización del alpeorujos es básicamente agrícola (por lo que los gastos de transporte serían mínimos) y el elevado contenido en materia orgánica y micronutrientes que presenta, numerosos estudios se han llevado a cabo para valorar los efectos de la aplicación de este residuo como enmienda agrícola. Por otra parte no hay que olvidar la presencia de polifenoles y altas concentraciones de iones K^+ que presenta en su composición y son considerados como factores negativos a la hora de elegir el alpeorujos como abono agrícola.

El ión K^+ desplaza al ión Mg^{2+} en el perfil del suelo provocando por lo tanto su inaccesibilidad a las plantas. Los polifenoles aunque ejerzan un efecto "positivo" como sustancias antimicrobianas y como factores de crecimiento para las plantas, presentan un papel fitotóxico importante a diversos niveles: ejercen un efecto negativo sobre los microorganismos rizosféricos y sobre las micorrizas arbusculares (Pedersen *et al.*, 1991; Fries *et al.*, 1997); además pueden causar alteración de la polaridad, afectando a los sistemas de transporte selectivo (Korte *et al.*, 2000).

1.3.2.4 Compostaje

Debido a las características físicas del alpeorujos (su consistencia semisólida) éste requiere ser mezclado con determinados compuestos para aumentar el volumen antes del compostaje. Algunos materiales susceptibles de ser utilizados son los restos de las cosechas de algodón, cereales, virutas de madera, cortezas secas...A diferencia del alpechín, el cual se añade repetidamente durante el proceso, el alpeorujos solamente se añade al inicio de la fermentación.

Las características físicas del alpeorujos hacen bastante difícil el compostaje por aireación forzada, debido a la presencia de canales preferenciales que conllevan

la aparición de agregados por lo que en el compostaje con este residuo, la aireación mediante volteo manual es la técnica más rentable.

El *compost* (también llamado abono orgánico) obtenido con residuos de la industria olivarera, se muestra como un producto altamente competitivo y eficiente debido a la ausencia de sustancias tóxicas recalcitrantes (ácidos fenólicos, fundamentalmente), elevado grado de humificación, alta carga orgánica y a la presencia de compuestos minerales. Sin embargo uno de los principales problemas que presenta es su elevada relación C/N cuando se utiliza junto con fertilizantes nitrogenados.

1.3.2.5 Uso como sustrato en la transformación biotecnológica: sustancias con interés industrial.

El contenido en determinados compuestos polifenólicos (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína) que presenta el alpeorujo atraen tanto la industria farmacéutica como a la cosmética, las cuales ven en el alpeorujo, de manera relativamente sencilla, el sustrato ideal para la obtención de tales sustancias. La industria alimentaria también ha dirigido su interés a la obtención de la pectina (contenida en la pared de las aceitunas) para su uso como agente gelificante.

Un aspecto muy importante que presenta el alpeorujo es la posibilidad de ser utilizado como fuente carbonatada (dado su alto contenido en azúcares) para la síntesis de polímeros con alto interés industrial mediante metabolismo microbiano. Este es el caso de la obtención de exopolisacáridos (EPS) usando una cepa de *Paenibacillus jamilae* (Morillo *et al.*, 2006). Otros polímeros con alto interés industrial lo constituyen los polihidroxialcanoatos, un grupo de plásticos biodegradables con características similares a los termoplásticos derivados del petróleo. En este sentido, y hasta la fecha, no se ha ensayado a nivel de laboratorio la síntesis microbiana de plásticos biodegradables utilizando el alpeorujo como sustrato carbonatado. Varios trabajos anteriores avalan la producción de bioplásticos utilizando otro residuo afín: alpechín, bajo distintas condiciones y utilizando bacterias pertenecientes al género *Azotobacter*, familia *Pseudomonadaceae* (Martínez-Toledo *et al.*, 1995; González-López *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 2002).

El hecho de utilizar este residuo con alto poder contaminante como sustrato para la obtención de sustancias con interés industrial (caso de plásticos biodegradables, altamente competitivos con los plásticos derivados del petróleo) contempla una doble vertiente: la del tratamiento del residuo en sí, con el

consiguiente interés para la protección del medio ambiente que ello conlleva y la producción de bioplásticos “respetuosos” con el mismo.

1.4 Plásticos

1.4.1 Definición

“Polímeros constituidos a partir de la condensación orgánica de diferentes monómeros con la pérdida de una molécula de agua, y dotados de propiedades plásticas”. Las propiedades plásticas de un producto dependen tanto del tipo de monómero como de los aditivos añadidos.

En cualquier plástico, dos parámetros son particularmente importantes: el punto de transición vidriosa (T_g) y el punto de fusión (T_m); básicamente los polímeros derivados del petróleo y usados para constituir productos con propiedades plásticas (termoplásticos) son susceptibles de ser remodelados infinitamente cuando son calentados a temperaturas superiores a T_g , y al ser enfriados bajo ese punto, se portan como un sólido vidrioso. Para evitar este hecho, la industria del plástico utiliza varios procedimientos para disminuir T_g y así obtener unos polímeros de mejores propiedades plásticas, reduciendo su fragilidad y ampliando su plasticidad: 1) añadir agentes plastificantes (que se entrelazan con puentes a H en las cadenas de polímeros), 2) añadir cadenas laterales no reactivas antes de la polimerización y 3) ampliar la longitud de las cadenas esqueléticas constituyentes de los polímeros.

1.4.2 Clasificación de los plásticos.

Los plásticos se pueden dividir en tres grandes grupos: los **termoplásticos**, los **elastómeros** y los plásticos **termoestables**. Esta clasificación atiende a los comportamientos que presentan ante distintas situaciones físico-mecánicas.

Los **termoplásticos**, grupo en el que se engloban plásticos tales como el PVC (cloruro de polivinilo), HDPE (polietileno de alta densidad), ó PP (polipropileno), son los que adquieren propiedades plásticas (capacidad de deformación y moldeo estable por tiempo indefinido) una vez calentados por encima de su punto de fusión, y tras el cuál adquieren un estado viscoso-líquido que se mantiene hasta que se enfrían adquiriendo aspecto sólido; una de sus características principales es que precisamente en ese estado sólido asumen un comportamiento vidrioso. No es preciso que el enfriamiento sea repentino, puede ser también muy lento, pero el polímero por su composición, tenderá a no poder

organizarse en una estructura cristalina; es todavía objeto de investigación científica, si un sólido amorfo tiene o no tiene un grado de cristalización, en cuanto se puede considerar el hecho que se formen enlaces químicos entre los monómeros, a modo de ligero grado de cristalización. De hecho, es la naturaleza de los constituyentes (monómeros de larga cadena) la que dificulta la formación de cristales (cuanto más largas más difíciles). Los **elastómeros** y plásticos **termoestables** no adquieren la plasticidad referida una vez calentados. Los primeros tienen capacidad de deformación bajo determinadas situaciones, pero tienden a volver a su aspecto inicial, como por ejemplo la goma; los segundos son rígidos y presentan escasa capacidad de extensión ante una situación de ruptura; además presentan consistencia dura a temperatura ambiente. Por lo tanto estos últimos no pueden ser moldeados indefinidamente una vez calentados resultando así imposible el reciclado secundario.

1.4.3 Consumo mundial de plásticos

Según el estudio titulado "*El sector de los plásticos: estadísticas, situación y perspectivas*" editado por el Centro Español del Plástico, la demanda mundial de plásticos en el año 2006 fue de 235 millones de toneladas, pero se prevé un aumento cercano al 30% en los próximos cinco años superando de esta forma en el año 2011, los 300 millones de toneladas. Europa consume el 25% del total y España ocupa el cuarto lugar entre los países europeos en demanda de estos materiales. La demanda en nuestro país crecerá a un ritmo del 1,0 %, aunque todavía estamos algo por debajo del incremento europeo que en media superará el 5,3 por ciento anual durante el próximo quinquenio. En las siguientes Figuras se muestra la distribución (en %) de la utilización de plásticos por diversos sectores, así como el porcentaje de utilización de los diferentes polímeros plásticos.

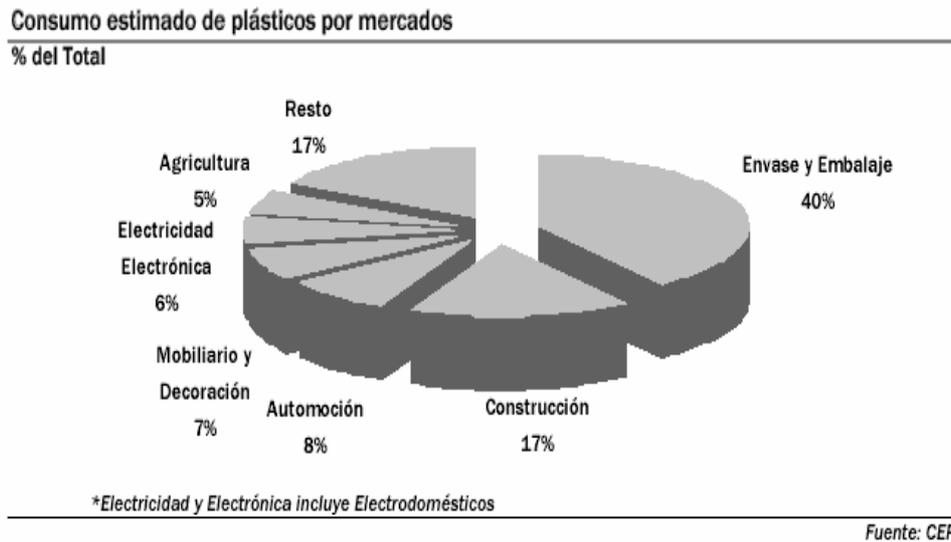


Figura 1.2. Consumo de plásticos por sectores de empleo (en porcentaje) Fira de Barcelona-Departamento de Estudios-October 2008 sobre Fuente: Informe Centro Español del Plástico.

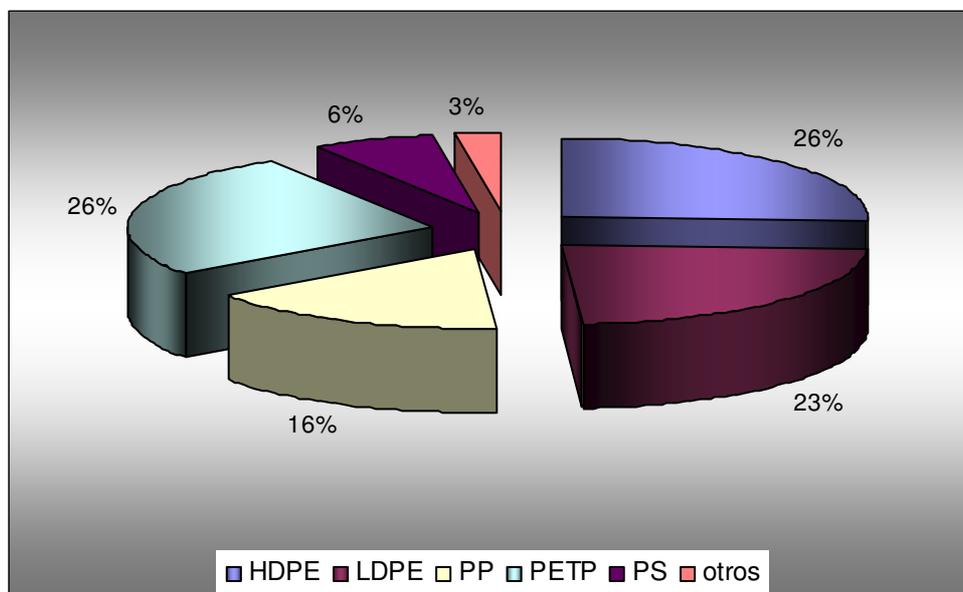


Figura 1.3. Porcentaje de utilización de los diferentes polímeros plásticos.

Como se puede apreciar en las gráficas anteriores, el sector que más plásticos ha demandado en años anteriores ha sido el sector de envases/embalaje (casi 40% del total), seguido por el sector de la construcción (15%) debido principalmente a la gran explosión inmobiliaria que se ha vivido en España en los últimos años. La suma de los porcentajes de estos dos sectores supera la mitad del consumo, correspondiendo a los PEPT, HDPE y LDPE los tipos de plásticos mayoritariamente utilizados (juntos alcanzan el 75% del total).

Tal y como se desprende de lo expuesto anteriormente, la producción, uso y por tanto la presencia de materiales plásticos en los residuos sólidos generados en nuestro país es elevada y creciente año a año y esto convierte la gestión de los mismos en una cuestión compleja, dado el impacto ambiental que produce su acumulación en localizaciones naturales. Por otro lado, a medida que las economías emergentes y países en vías de desarrollo vayan alcanzando el nivel occidental, este problema se agravará, lo que hace necesario desarrollar estrategias para hacer frente al mismo. En la actualidad dichas estrategias incluyen la recuperación de los materiales plásticos presentes en los residuos sólidos urbanos (RSU) mediante su reciclaje mecánico, lo que requiere la previa separación y clasificación de los mismos, hecho que incrementa notablemente el costo de la recogida y tratamiento de los RSU. Otras posibles estrategias para la eliminación de los plásticos, como el soterramiento, la incineración y el compostaje, no son tampoco adecuadas desde el punto de vista ambiental, dada la escasa biodegradabilidad que presentan. Un enfoque diferente para resolver el problema expuesto consiste en la sustitución de los plásticos derivados del petróleo, los cuales son muy inertes desde el punto de vista biológico, por otros procedentes de fuentes renovables y capaces de ser degradados por los microorganismos presentes en medios naturales: **plásticos biodegradables ó bioplásticos**

1.5 Bioplásticos.

1.5.1 Definición y características

Con respecto al origen, se considera **bioplástico** todo *“aquel polímero con propiedades plásticas parecidas a la de un polímero termoplástico pero que en lugar de proceder de petróleo, procede de una fuente orgánica renovable”*. Toda la materia plástica derivada del petróleo es de por sí reciclable: es cuestión de tiempo y condiciones ambientales, pero el problema radica en la lentitud del proceso. Actualmente existe una gran controversia sobre el término bioplásticos, sobre todo en relación al concepto de biodegradabilidad.

El protocolo EN13432 establecido por la ISO (*Internacional Standard Organization*) describe todas las características que tiene que cumplir un plástico para poder ser considerado como biodegradable. Estas características están basadas en ensayos químicos y agronómicos los cuales deben ser superados satisfactoriamente. Esos ensayos están basados en los precedentes protocolos de los estándares ISO 18452 (*Aerobic Degradability in Water*), ISO 18453 (*Anaerobic Degradability in Water*) e ISO 18455 (*Aerobic Composting*).

Protocolo EN13432: contenido.

- Ensayo químico: reducción de todos los constituyentes a moléculas de estructura más sencilla y fácilmente metabolizables, manteniéndose el contenido en metales pesados después del proceso, por debajo del valor umbral.
- Biodegradabilidad en medio acuoso (consumo de O₂ y producción de CO₂): el 90% de todo el material debe ser transformado en CO₂ transcurridos 6 meses.
- Desintegración en compost: después de 3 meses del compostaje, un máximo del 10% del residuo puede permanecer en el subsiguiente tamizado en una malla de 2 mm.
- No tiene que producirse ningún efecto negativo inhibitor del compostaje (en una planta de compostaje a escala semi-industrial ó superior)
- Ensayo agronómico: efecto de la aplicación del compost resultante sobre el crecimiento de las plantas (ensayo ecotoxicológico).

Todos los ensayos tienen que ser superados para considerar un plástico como biodegradable.

Los polímeros biodegradables se pueden clasificar en:

- Polímeros extraídos o removidos directamente de la biomasa: polisacáridos como almidón y celulosa. Proteínas como caseína, queratina, y colágeno.
- Polímeros producidos por síntesis química clásica utilizando monómeros biológicos de fuentes renovables y,
- Polímeros producidos por microorganismos, bacterias productoras nativas o modificadas genéticamente.

Entre los **plásticos biodegradables**, los más prometedores desde el punto de vista comercial son los derivados del almidón y la celulosa (Figura 1.4), y los polímeros producidos por microorganismos, como por ejemplo los polihidroxicanoatos (PHAs) (Figura 1.5), los polímeros del ácido láctico (PLA) (Figura 1.6), las policaprolactonas (PCL) y los polialquilsuccinatos (Gross *et al.*,2002).

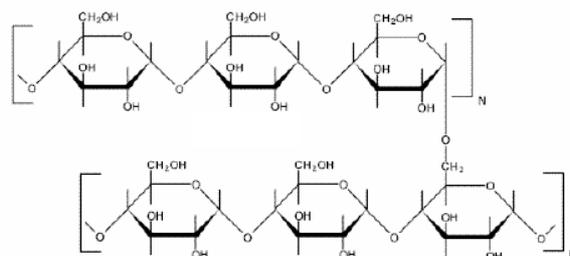


Figura 1.4. Plástico biodegradable derivado del almidón

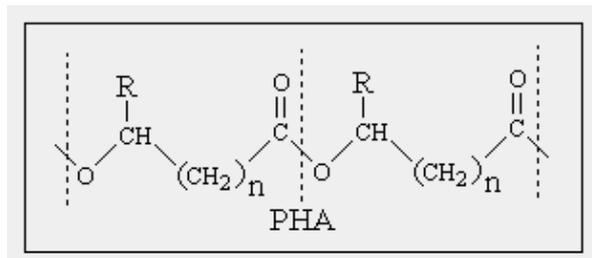


Figura 1.5. Estructura del PHA

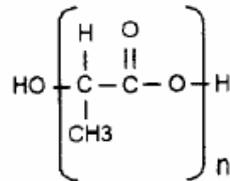


Figura 1.6. Monómero del ácido poli-láctico (PLA)

Entre todos los **polímeros biodegradables** con aplicación industrial anteriormente citados, los PHAs han despertado un creciente interés tanto a nivel científico como comercial debido a que presentan propiedades similares a los termoplásticos convencionales y son completamente biodegradables (Lee, 1996) siempre que se encuentren en el ambiente adecuado. Además y a diferencia de los polímeros del ácido láctico (PLA) cuya producción supera actualmente a la producción de los PHAs, son polímeros susceptibles de ser sintetizados mediante metabolismo bacteriano a partir de cualquier residuo, y por lo tanto con un coste *cero* desde el punto de vista económico y ambiental, convirtiéndose un *residuo* en un *sustrato*. Por el contrario, la producción de PLA conlleva el uso de recursos agrícolas (caso de plantas de maíz, por ejemplo) para obtener el almidón y posteriormente PLA, con el consiguiente agotamiento de los recursos naturales.

1.5.2 El mercado mundial del bioplástico

Debido al constante crecimiento del precio del petróleo (lo que ha provocado que el precio de producción de plásticos tradicionales se haya disparado un 20%, según la Asociación Alemana del Plástico: *IK Industrievereinigung Kunststoffverpackungen, e.V.*), el sector de los bioplásticos se encuentra en la posición de poder representar un camino viable hacia la producción de plásticos no procedentes de combustibles fósiles; este hecho se ha reforzado en gran medida al involucrarse grandes compañías del sector (Metabolix, BASF, Cargill, Novamont, ó

PHB) en asociaciones de productores y proveedores de bioplásticos. Son ya numerosos los ejemplos de patentes, por ejemplo aquellos basados en la polimerización del ácido láctico ó del 2 hidroxipropiónico para dar lugar al ácido poliláctico (PLA), bioplástico de origen vegetal.

La producción mundial de bioplásticos se situó en el año 2005 entorno a 150.000 toneladas, siendo uno de los datos más llamativos la progresiva sustitución de los termoplásticos en sectores donde éstos están fuertemente asentados (datos procedentes del Centro de Investigación en Procesamiento de Polímeros de la Universidad de los Andes, CIPP-Agosto 2007) por plásticos biodegradables, proceso respaldado por los resultados obtenidos en numerosos estudios a nivel de laboratorio, los cuales han mostrado las similitudes en numerosas características químicas y físicas entre bioplásticos (por ejemplo PHB) y termoplásticos tradicionales (caso del polipropileno, PP).

Tabla 1.1. Comparación de las propiedades químico-físicas entre termoplásticos tradicionales (PP) y bioplásticos (poli-β-hidroxibutirato, PHB).

Parameter	Plastic Material					Mazin (PLA)	CDP's PLA	BAK 1095	BAK 2195	Parag. from Avebe	Parag. from Avebe	PVOH	PLLA
	LDPE	HDPE	PP	PS	PHB								
Film Formation								Yes			SE 1620		Yes
Injection moulded									Yes	SE 1500			Yes
Melting point Tm [°C]	115	266°F	171-186	230-270	171-182	150.0	120-170	125	177				170-180
Glass transition temperature Tg [°C]	-120		-15	80-100	5-10	63.8	60			80	55		58
Crystallinity [%]			65-70		65-80								
Density [g cm ⁻³]	0.92	0.95	0.905 - 0.94	1.05	1.23 - 1.25		1.25			1.35	1.33		1.25
Mol. Weight Mw (x10 ³)			2.2 - 7		1 - 8								
Mol. Weight distribution			5 - 12		2.2 - 3								
MFI (g/10min)	0.1-22 (0.7)	0.02-1.5	0.3- 40	1.2-25	5-20								
Hardness (Rockwell H Scale)					56-67 (Shore D)	20.6							
Transparency (%)	T	T	T										94
Flexural modulus [GPa]			1.7	62-76	3.5 - 4								
Tensile strength [MPa]	3000	3350	39	40-48	40	32.22		220	550	2400	1500		500kg/cm
Tensile strength at break [MPa]	8-10		23	35 (30-60)	15-27	21.87				34	25		70
Extension to break [%]	150-600	>800	400-900	1.0-2.5	4-18	30.72	35	>400	120				2.4
UV resistance	Poor	Poor	Poor		Good								

*. Fuente: "Polímeros biodegradables" CIPP-CIPEM Centro Investigación de Procesamiento de Polímeros de la Universidad de los Andes. 2007.

Considerando la situación actual en la cual la producción de sólo el sector de embalaje termoplástico ronda los 12,3 millones de toneladas anuales, y comprobado su probable potencial de sustitución por parte de los bioplásticos, resulta por lo tanto evidente y factible la ampliación del campo de acción de los bioplásticos en este sector, el cuál crece a nivel mundial desde hace años.

Según la fuente <http://www.bioplastics24.com/> el radio de acción de los bioplásticos en sólo 5 años puede llegar a ser 3 veces su tamaño actual y además se estima según la misma fuente, que actualmente 6 millones de toneladas de embalaje puedan ser sustituidas por bioplásticos (Figura 1.7).

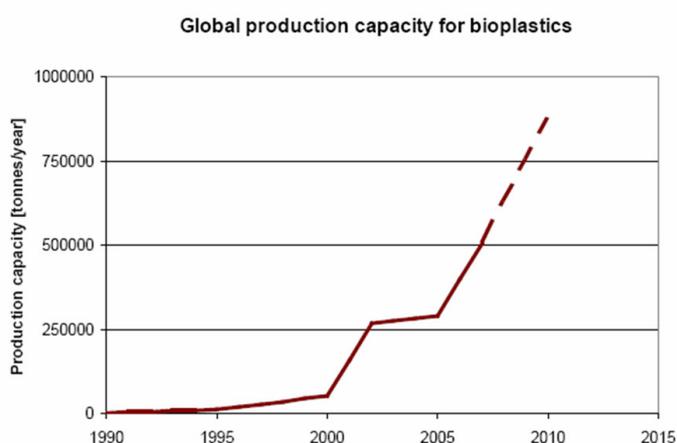


Figura 1.7. Capacidad de crecimiento del sector del bioplásticos en los próximos años. Fuente: <http://www.bioplastics24.com/content/view/89/28/lang.en/>

Es difícil concretar qué sectores serán los más prometedores en los cuales los bioplásticos puedan introducirse masivamente; seguramente y así lo han demostrado numerosas iniciativas, puedan competir allá donde se exija obtener un producto de duración limitada (por ejemplo, embalaje y envases de usar y tirar, agricultura, ámbito biomédico...) ó un producto de constante rápida renovación (por ejemplo: sector informático). Sea suficiente considerar un dato en este sentido: una de las conclusiones generadas en el Congreso "Electronics Goes Green"

1.Introducción

mantenido en Berlín en el año 2004, fue que el 10% de los plásticos que se emplean en la industria electrónica pueden ser reemplazados por biopolímeros.

En las siguientes fotografías se muestran varios ejemplos de estos productos.



Macetas realizadas en Mater-Bi® por Novamont



Película de embalaje Ecoflex® realizada por BASF



Reproductor de archivos musicales realizado por Sony® con panel frontal en biopolímeros a partir de almidón de maíz.

Figura 1.8. Ejemplos de productos realizados comercialmente con bioplásticos.

De todas formas resulta indudable que ante una situación de constante inestabilidad del precio del petróleo, agotamiento del recurso y graves problemas medioambientales generados no sólo por el uso (y abuso) de los plásticos tradicionales (por ejemplo incremento del efecto invernadero, lluvia ácida, desertificación...), el sector de los bioplásticos surge como una solución viable para conjugar los conceptos de avance tecnológico y sostenibilidad que nuestra sociedad demanda.

1.6 Polihidroxicanoatos (PHAs).

1.6.1 Definición y características

Los PHAs son homopolímeros o copolímeros de hidroxicanoatos, tales como el 3-hidroxi butirato, el 3-hidroxi valerato y el 3-hidroxi hexanoato, que han ido adquiriendo una gran importancia en las últimas décadas (Byrom, 1992; Brandl *et al.*, 1990, Doi, 1990; Steinbuchel *et al.*, 1995). Se trata por tanto de poliésteres lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente.

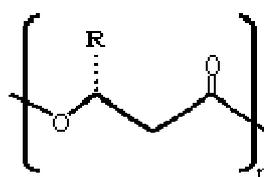


Figura 1.9 Estructura general de los PHAs

Se distinguen dos tipos de PHAs según la longitud de la cadena lateral: PHAs scl (**s**hort **c**hain **l**ength) con cadena alquílica lateral (hasta 2 carbonos) y PHAs mcl (**m**edium **c**hain **l**ength) con cadena alquílica lateral de más de 3 carbonos (Steinbüchel, 2001). Las características principales de los PHA scl son ser demasiado rígidos y frágiles, mientras los PHA mcl son más elásticos pero dotados de menos fuerza mecánica. Por lo tanto y en paralelo a una mejora en la cantidad de producción (para bajar los costes totales) se hace necesaria una mejora en la calidad de la composición del biopolímero, al objeto de satisfacer un más amplio abanico de sectores industriales.

Entre los homopolímeros, los más importantes son el **polihidroxi butirato (PHB)**, con $R \equiv \text{CH}_3$, el **polihidroxi valerianato (PHV)**, con $R \equiv \text{CH}_3\text{CH}_2$, y el **polihidroxi hexanoato (PHH)**, con $R \equiv \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$. La inclusión de dos de los anteriores monómeros permite obtener copolímeros, tales como el **poli(3-**

hidroxibutirato-co-3-hidroxicvalerianato) [P(3HB-co-3HV)], el cuál fue producido comercialmente con el nombre de BioPol™ por Zeneca Bio Products (Billingham, UK). Como puede apreciarse se trata de una vasta familia de productos, y en función de los monómeros constituyentes, presentan diferentes propiedades.

Históricamente fueron descubiertos en 1925 por Lemoigne y son producidos por una extensa variedad de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos como fuente de reserva de carbono y energía en la forma de gránulos amorfos y líquidos en el citoplasma. El número y tamaño de estos gránulos, su composición monomérica, la estructura macromolecular y propiedades físico-químicas dependen del microorganismo productor. Pueden ser observados intracelularmente como gránulos refringentes y en algunos casos pueden provocar la deformación de las células.

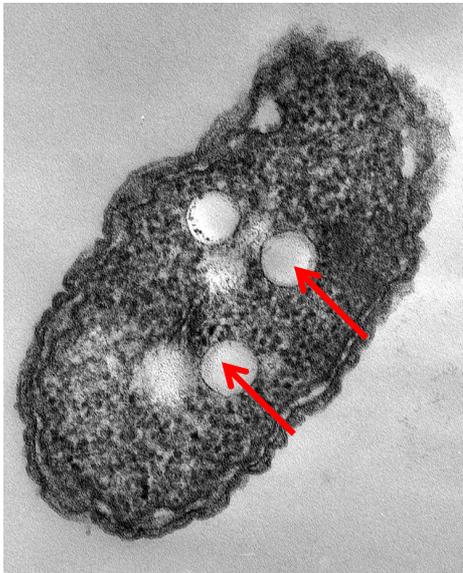


Figura 1.10. *Azotobacter vinelandii*. (Aqueous Geochemistry and Biogeochemistry-Earth and Environmental Systems Institute-picture by Susan L. Brantley <http://www.essc.psu.edu/~brantley/recent.html>)

Sus aplicaciones han sido exploradas por varios sectores ya que presentan una serie de ventajas importantes cuando se comparan con los plásticos convencionales (caso del PP), como el hecho de ser completamente degradados por bacterias, hongos y algas hasta agua, dióxido de carbono ó metano. De esta forma, simplemente cambiando la fuente de carbono y la cepa bacteriana usada en el proceso fermentativo, es posible producir biopolímeros (homo y copolímeros) con propiedades que abarcan desde los plásticos rígidos y quebradizos hasta los elastómeros (Poirier *et al.*, 1995).

1.6.2 Biosíntesis de PHA

Numerosas bacterias tienen la capacidad de sintetizar PHAs como material de reserva y fuente de poder reductor. A pesar de conseguir un biopolímero parecido y almacenable, las rutas metabólicas implicadas se diferencian tanto en base al tipo de bacteria como por el sustrato empleado. Existen tres grandes rutas metabólicas, con diferente grado de interconexión:

- la síntesis directa desde los azúcares
- la síntesis a partir de la β -oxidación (degradación) de ácidos grasos y
- la síntesis desde la biosíntesis *de novo* de los ácidos grasos

Las 3 rutas coinciden en crear un intermediario metabólico (3-hidroxiacil-CoA), sustrato que será incorporado gracias a una PhaC (polimerasa) en un biopolímero, almacenado gracias a una serie de proteínas con diferentes funciones.

1.6.2.1 Síntesis desde los azúcares.

Es una ruta metabólica de aprovechamiento energético de los azúcares, que en lugar de introducir el piruvato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), desvía la ruta hacia la formación del Acetil-CoA. A continuación la ruta utiliza 3 enzimas en secuencia: **PhaA** (β ketotiolasa), una enzima que provoca la condensación de una molécula de Acetil-CoA en una de acetoacetil-CoA, **PhaB** (hidrolasa ó acetoacetilCoA reductasa-NADPH dependiente), una enzima que provoca, mediante la pérdida de una molécula de agua, la incorporación de un radical -OH y la formación de un intermediario: (R)-3-hidroxiacilCoA, y finalmente una **PhaC** (polimerasa) que une en cadenas los (R)-3-hidroxiacilCoA sintetizados.

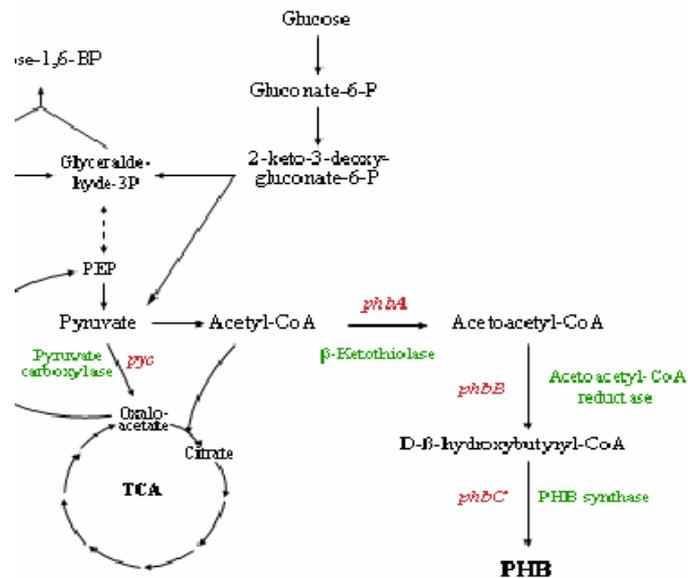


Figura 1.11 Ruta metabólica de biosíntesis de PHB a partir de la glucosa (Figura tomada de Galindo et al 2007)

1.6.2.2 Síntesis a partir de la β -oxidación de ácidos grasos.

Desde la fuente de C en forma de ácidos grasos, y mediante una β -oxidación utilizando cuatro enzimas (acilCoA transferasa, acil-CoA deshidrogenasa-FADH dependiente, enoil-CoA hidratasa y epimerasa), el microorganismo sintetiza el sustrato clave:(R)-3-hidroxiacilCoA.

Las enzimas que actúan en secuencia son: **acil-CoA ligasa** (tioquinasa u acilCoA transferasa), que genera la formación de una molécula de acil-CoA, que posteriormente será reducida por la **acil-CoA deshidrogenasa**-FADH dependiente mediante la pérdida de una molécula de agua, a trans-2-enoil-CoA, para dejar actuar la **enoil-CoA hidratasa** que genera el intermediario (S)-3-hidroxiacilCoA, que gracias a una **epimerasa** cambia de conformación, sintetizándose (R)-3-hidroxiacilCoA.

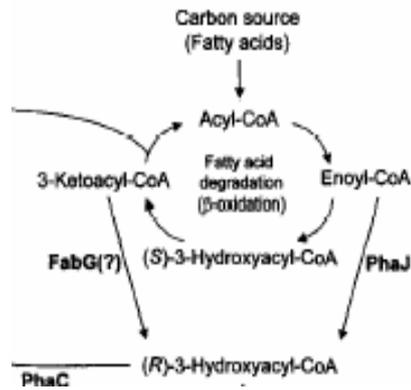


Figura 1.12. Ruta metabólica de biosíntesis de PHB a partir de los ácidos grasos (β -oxidación) (Figura tomada de Tsuge *et al.*, 2002)

1.6.2.3 Síntesis desde la biosíntesis de *ново* de los ácidos grasos.

Representa un desvío desde la ruta de síntesis de los ácidos grasos, hacia la obtención del monómero necesario para la polimerización en PHAs; el comienzo de la ruta involucra el acetilCoA, que gracias a la **AcetilCoA carboxilasa** (13) se convierte en Malonil-Coa, el cual gracias a la **ACP-maloniltransferasa** (14) obtiene la adición al grupo ACP convirtiéndose en Malonil-ACP, siendo así transformado en 3-ketoacil-ACP por la **3-cetoacil-ACP sintasa**-dependiente de NADPH (15), y gracias a una final reducción por la **3-cetoacil-ACP reductasa** (16) se genera el (R)-3-hidroxiacil-ACP, liberándose el grupo ACP, gracias a la acción de la **3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilasa** (19) generando (R)-3-hidroxiacilCoA y permitiendo la polimerización en PHAs.

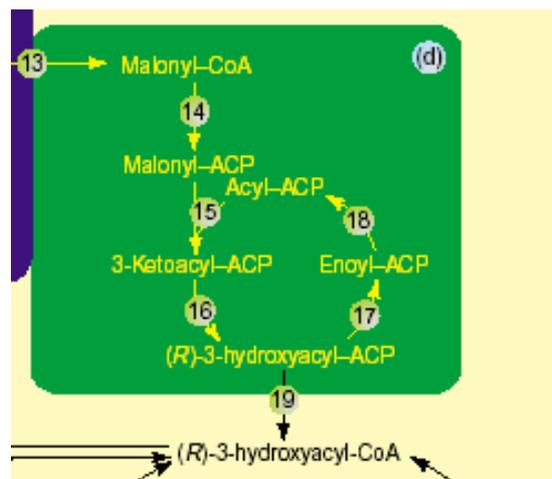


Figura 1.13 Ruta metabólica de biosíntesis de PHB a partir de la síntesis de ácidos grasos (Figura tomada de Luengo *et al.*, 2003)

La siguiente figura muestra la conexión entre las tres rutas metabólicas:

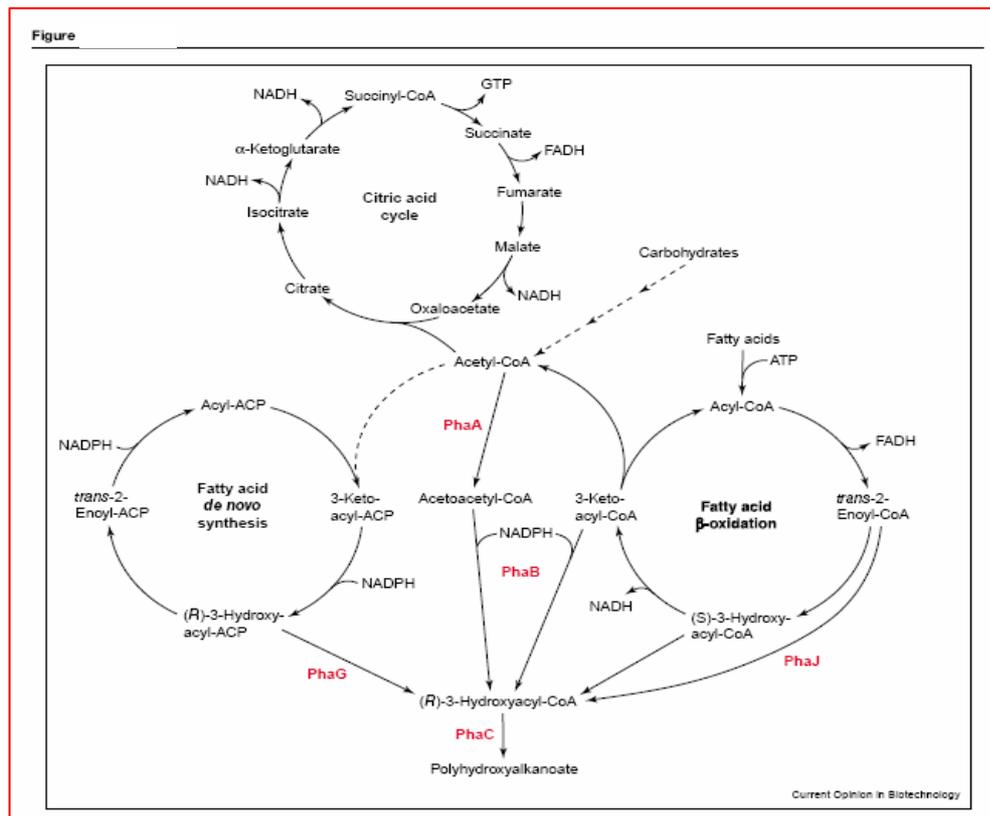


Figura 1.14. Interconexión entre las rutas de la síntesis de PHB (Figura tomada de Aldor *et al.*, 2003)

1.6.3 Interconexión entre la biosíntesis de PHAs y la síntesis de alginato.

Las bacterias pertenecientes al género *Azotobacter*, se caracterizan también por conseguir sintetizar un derivado exopolisacárido complejo, que se llama alginato, que le proporciona una defensa frente a la variación en las condiciones ambientales, al objeto de proteger el enzima nitrogenasa. Ha sido bien documentada (Yan *et al.*, 2000; Segura *et al.*, 2003) la interconexión entre la biosíntesis de alginato, y la biosíntesis de PHAs, y en estas publicaciones se ha demostrado cómo esas dos rutas metabólicas se excluyen mutuamente según el siguiente esquema:

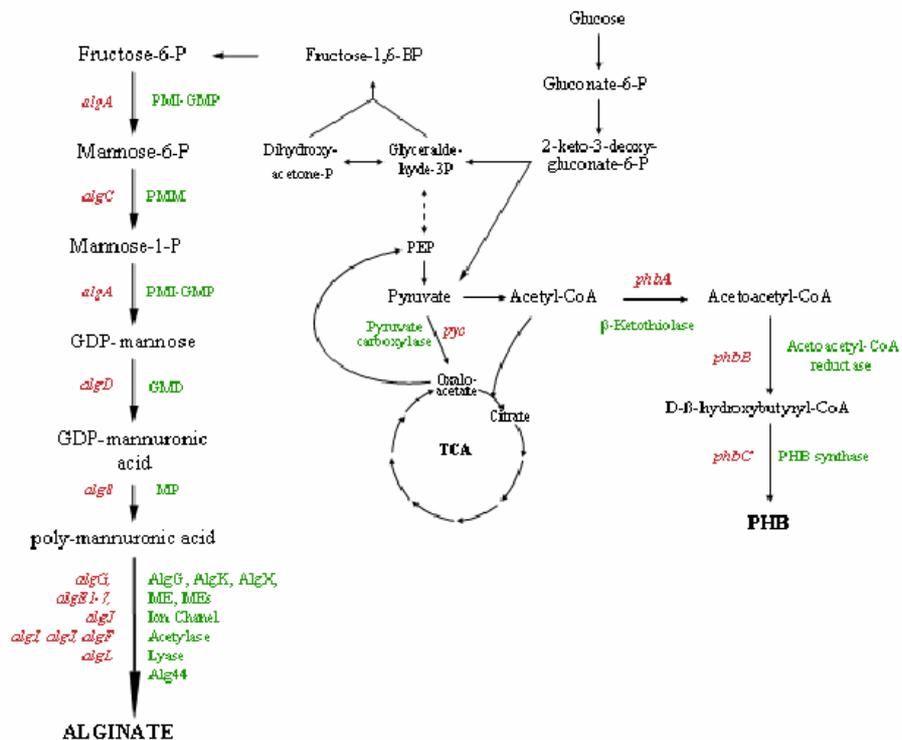


Figura 1.15 Ruta metabólica entera de la síntesis de PHB y de alginato y su correlación (Figura tomada de Galindo *et al.*, 2007)

Bajo un exceso de C, presencia de nitrógeno y reducción de la tensión de O₂, el microorganismo se encuentra en condiciones favorables para almacenar PHAs, ya que existiría una alta concentración de sustrato útil para su metabolismo heterótrofo, sin necesidad de fijar el nitrógeno ni de proteger a la nitrogenasa frente a unas condiciones aeróbicas. Por lo tanto, la mayoría de su gasto energético se dirigiría a la polimerización de PHAs.

En las condiciones opuestas (alta tensión de O₂ y falta de nitrógeno) la nitrogenasa se activaría para conseguir metabolizar de manera orgánica ese elemento, en forma de aminoácidos y al hacerlo deberá protegerla, dotándose de una capa de exopolisacárido (a base de alginato), tan espesa cuanto más alta sea la tensión de O₂ presente en su entorno.

1.6.4 Regulación del almacenamiento de PHAs en el gránulo.

La síntesis de PHAs está regulada por un sistema constituido por numerosas proteínas entre las que podemos citar las fasinas (PhaP1) y los activadores diméricos de transcripción PhaR. (Potter *et al.*, 2002).

Estos últimos agentes son codificados sólo bajo condiciones de biosíntesis de PHAs, para que actúen sobre el promotor del gen *phaP* que codifica para PhaP

(fasina). A la vez que el gránulo de PHAs se va agrandando, contribuyen a crear una barrera hidrofóbica (monocapa fosfolipídica) respecto al entorno citoplasmático en el cual se está formando el gránulo. La siguiente figura esquematiza la regulación de la acumulación de PHAs en el gránulo.

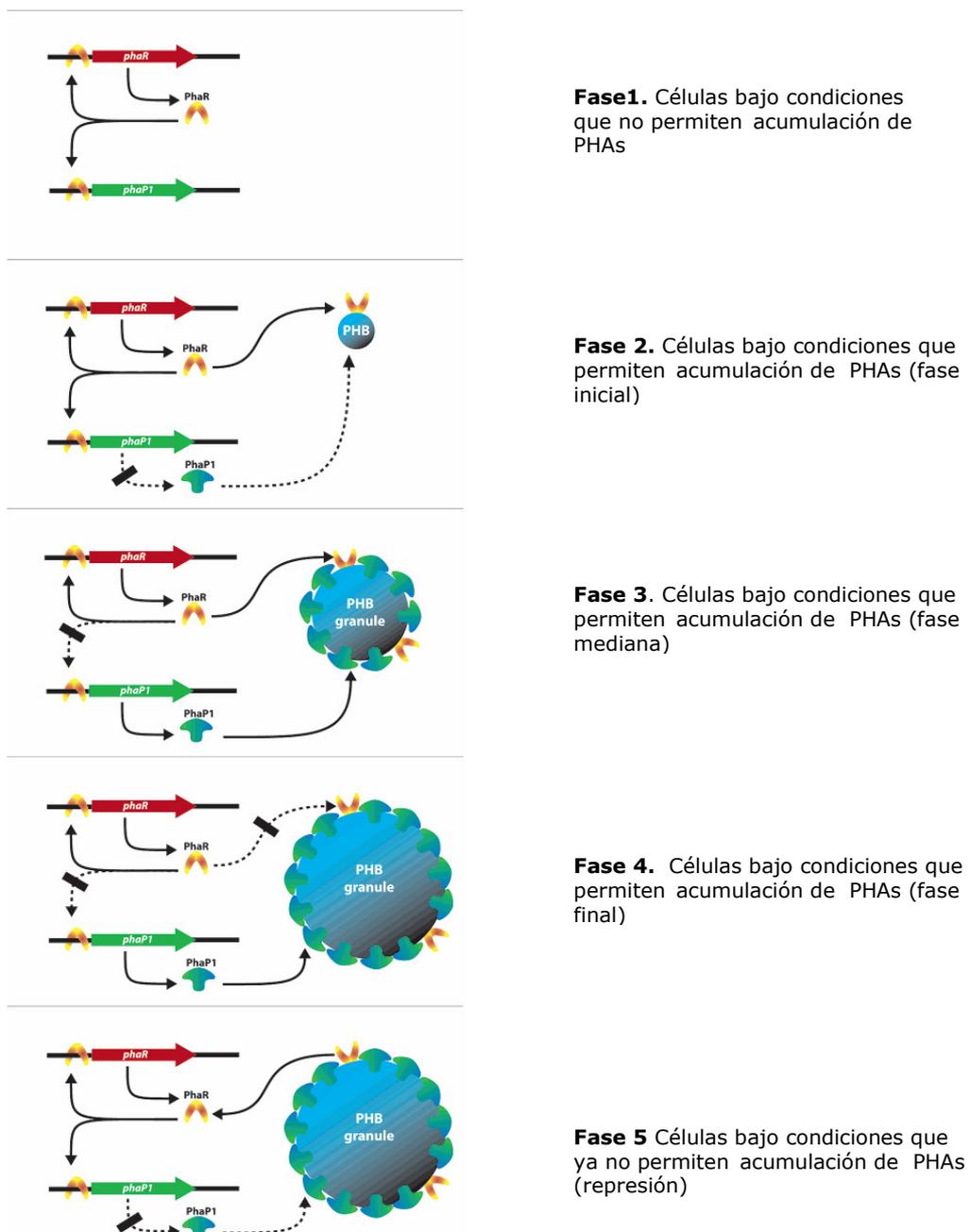


Figura 1.16 Fases del almacenamiento de gránulos de PHB y su regulación génica. (Figura tomada de Potter *et al.*,2005).

En la síntesis de esta barrera participan también una depolimerasa y otras proteínas en espera de identificación. Es importante subrayar que el proceso es un proceso dinámico, que refleja la función llevada a cabo por los gránulos de PHAs como material de reserva. (Steinbüchel *et al.*, 2001) reportaron cómo el mismo activador de transcripción (PhaR) en el momento de llenado del gránulo, actúa como terminador de la transcripción del mismo gen *phaP*, codificador de las fasinas, involucradas en el mantenimiento del gránulo, y por lo tanto sin función, una vez que el gránulo de PHAs, se haya formado.

1.6.5 Producción de PHAs desde diferentes sustratos

La mayoría de los estudios publicados sobre la producción de plásticos biodegradables y en concreto de PHAs (Poirier *et al.*, 1995; Lee, 1996; Gross *et al.*, 2002), coinciden en señalar que uno de los principales inconvenientes a los que se enfrenta el desarrollo comercial de estos productos, es su elevado coste de producción lo que hace que se presenten en desventaja frente a los plásticos convencionales derivados del petróleo. En la mayoría de los estudios publicados sobre la producción de PHAs, la fuente de carbono elegida para el crecimiento de los microorganismos responsables de la producción del polímero es glucosa, sacarosa y ciertos ácidos orgánicos de cadena corta. Se trata de sustratos caros, especialmente en el caso de que se quieran obtener copolímeros.

Al objeto de modificar esta realidad, numerosos investigadores han dirigido sus estudios hacia varias estrategias:

- 1) selección de nuevas cepas bacterianas con capacidad para sintetizar PHAs,
- 2) optimización de los procesos de fermentación y separación de los bioplásticos y
- 3) el uso de sustratos más baratos.

Aunque existen bacterias capaces de producir PHA usando fuentes de carbono baratas, el contenido en PHA y la productividad son menores que cuando se usan sustratos purificados. Por esta razón, la posibilidad de emplear fuentes de carbono disponibles a coste cero sin sacrificar demasiado la productividad del proceso, ha abierto horizontes muy prometedores en la industria de los bioplásticos, y en este sentido, los sustratos más prometedores son los que proceden del sector agrícola ó los fangos de las plantas de tratamiento de aguas residuales tanto urbanas como industriales. En general deben caracterizarse por un exceso en contenido de materia orgánica y el rendimiento suele mejorarse si se

realiza una digestión anaeróbica como pre-tratamiento al objeto de obtener diversos ácidos orgánicos que serán utilizados como precursores de copolímeros. Por lo tanto los ejemplos de sustratos van desde fangos activos utilizados bajo una alternancia de condiciones anaeróbicas/aeróbicas (Liu *et al.*, 2000), pasando por residuos generados en el refinamiento del aceite de palmera previa digestión anaeróbica de los productos (Hassan *et al.*, 1996), aceites vegetales de diferente naturaleza, con la inclusión eventual de ácidos grasos volátiles como precursores de un mayor grado de polimerización (Thakor *et al.*, 2005), alcanos y CH₄ (muy interesante en éste último caso si procede de la fermentación de otros sustratos) (Wendlandt *et al.*, 2001; Steinbüchel *et al.*, 2003; Helm *et al.*, 2008), aguas residuales procedentes de plantas de producción de almidón (Yu *et al.*, 2001), aguas residuales generadas en la industria papelera (Bengtsson *et al.*, 2008) hasta hidrolizados de biomasa forestal (Keenan *et al.*,2006) y residuos agrícolas con alto contenido en xilosa (Tsuge *et al.*, 2002).

1.6.6 Uso de los subproductos generados en el proceso de obtención del aceite de oliva (alpechín y alpeorujo) como sustratos para la síntesis de PHAs.

Los subproductos generados en el proceso de obtención del aceite de oliva, presentan características idóneas para ser considerados *sustratos* en la síntesis de biopolímeros mediante metabolismo bacteriano: una elevada concentración de materia orgánica y el elevado contenido en carbohidratos hidrosolubles (Dionisi *et al.*, 2005), susceptibles de ser sometidos a metabolismo acidogénico generando ácidos orgánicos volátiles (VFAs) usados por la misma bacteria productora de PHAs, como precursores eventuales en el proceso de biopolimerización (Beccari *et al.*, 1996).

Hasta hoy, son muy escasas las investigaciones (Martínez-Toledo *et al.*, 1995; Pozo *et al.*, 2002; Dionisi *et al.*, 2005) sobre la producción bacteriana de PHAs a partir de subproductos tales como el *alpechín* y el *alpeorujo*, y ninguno hasta la fecha, según nuestro conocimiento, a escala de planta piloto.

Debido a la complejidad y heterogeneidad de los subproductos en cuestión, resulta bastante difícil estandarizar el proceso de obtención de bioplásticos. En este sentido, el *alpechín* presenta una concentración en polifenoles más alta que la que tiene el *alpeorujo*, siendo por lo tanto mayor el carácter inhibitor del metabolismo bacteriano que exhibe. Por otra parte su contenido en materia orgánica es menor, así como la cantidad de sólidos totales. Por su parte el *alpeorujo* presenta mayores concentraciones de materia orgánica, menores cantidades de polifenoles y mayores

cantidades de azúcares hidrosolubles (susceptibles de ser sustrato para el crecimiento bacteriano) y en contrapartida mayores cantidades de sólidos totales.

1.6.7 Producción de PHAs utilizando biorreactores.

Para la obtención de PHAs mediante la optimización de los parámetros de producción, se hace necesario un proceso de escalado, que traduzca los resultados obtenidos en experimentos a escala de laboratorio (típicamente mediante cultivos en *batch*) y de una manera paulatina, hasta experimentos utilizando plantas piloto, plantas piloto a escala industrial e incluso a un proceso industrial. Un paso clave para conseguir este objetivo es la utilización de biorreactores mediante la aplicación de distintas estrategias tales como:

a) Utilización de una población mixta con capacidad para acumular PHAs

(Serafim *et al.*, 2008) pusieron de manifiesto en sus experimentos, los dos factores clave a considerar en la optimización del proceso de producción de PHAs cuando se trabaja con una población microbiana mixta:

- 1) selección de la capacidad acumuladora de PHAs por medio de la variación de los factores químicos-físicos involucrados en el proceso y
- 2) el incremento de la capacidad acumuladora por célula.

Esta afirmación llevaría a considerar un sistema con alternancia de condiciones aeróbicas/anaeróbicas ó un sistema en el que se adicione el sustrato en condiciones aeróbicas ó un sistema que actúe en tres fases:

- 1) producción de sustrato
- 2) selección de la población mixta con capacidad acumuladora mediante la adición de nuevo sustrato y
- 3) producción de PHAs bajo condiciones óptimas por parte de la población seleccionada.

b) Utilización de un inóculo selectivo con capacidad para acumular PHAs

Otra estrategia es la utilización de una población microbiana seleccionada (inóculo selectivo) con probada capacidad para acumular PHAs; a pesar que algunos factores puedan ser similares al caso anterior, hay diferencias en la elección del tipo de biorreactor. La principal diferencia es la posibilidad de evitar el segundo paso del esquema anterior, y por lo tanto conseguir la optimización de la producción mediante dos fases: 1) producción de sustrato y 2) máxima producción de PHAs.

El biorreactor más común por su funcionalidad a escala de laboratorio, es el *batch reactor* (cuba sencilla dotada de un agitador mecánico y sensores para el control del oxígeno disuelto, la temperatura, el pH...) el cuál puede disponer de diversas bombas peristálticas para la adicción de sustratos, sustancias correctoras de pH, sustancias antiespumantes....., ó para el enriquecimiento del inóculo (en cuyo caso se pasaría a definir como *fed-batch reactor*). Debido al metabolismo típico de los microorganismos productores de PHAs (crecimiento y acumulación en fase estacionaria), el procedimiento que mejor se adapta es aquél que recoge la variación conjunta de la composición y del flujo del sustrato. Eso se obtiene mediante biorreactores en secuencia (*sequencing-batch reactor*, SBR), y tal y como (Serafim *et al.*, 2004) evidencian en sus trabajos, es gracias a la variación de los parámetros en el curso del ensayo, en lugar de tener diferentes biorreactores en secuencia. (Johnson *et al.*, 2009) compararon los dos ejemplos de biorreactores (SBR y *fed-batch reactor*) para la producción de PHAs, y concluyeron que la máxima eficiencia se obtiene cuando ambos se pusieron en secuencia, uno respeto al otro. La eficacia de un biorreactor sobre todo en términos de control de parámetros, permite poder variar de manera aislada (Lee *et al.*, 2006) u evidenciar su efecto controlándolos de manera combinada (Din *et al.*, 2006). Un estricto control de los parámetros y la evolución de todo el proceso, permite una modelización a partir de los datos reales de manera tal que se pueda sugerir el comportamiento del proceso a mayor escala, y dar así respaldo a un análisis de los costes reales del proceso.

1.6.8 Producción de PHAs por parte de cepas de *Azotobacter sp*

Para la elección de cepas de capacidad acumuladora de PHAs son factores determinantes: la ubicuariedad, la facilidad de cultivo, las reducidas exigencias metabólicas y los rápidos tiempos de crecimientos de la susodichas cepas.

Una eficaz población, en tal sentido es representada por las cepas del género *Azotobacter sp*. Esas son cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre, mesófilas, y ubicuaritaria en suelos (Aquilanti *et al.*, 2004), sus exigencias metabólicas son

reducidas, en el sentido de no necesitar de micronutrientes esenciales de difícil búsqueda. La capacidad de acumulación de PHAs es documentada (Pozo *et al.*, 2002, Quagliano *et al.*, 1997) y especialmente en condiciones de limitación de oxígeno (Quagliano *et al.*, 1997), como vía de protección de su característica enzima (nitrogenasa) que necesita de una protección respiratoria y se encuentra aventajada en condiciones de microaerofilia, en cuanto permite a la bacteria emplear menos energía para el proceso metabólico de fijación de nitrógeno, permitiendo el desvío energético hacia la producción y acumulación de PHAs. Por lo tanto la candidatura de esas cepas para una estrategia de uso de inóculo selectivo para la producción de PHAs resulta recomendable y de eficaz puesta en marcha; además esas mismas cepas han demostrado ya una elevada capacidad acumuladora de PHAs (González-López *et al.*, 1996) así como una habilidad en la heteropolimerización a partir de sustratos a base de alpechín (Pozo *et al.*, 2002); así que el empleo de ese inóculo selectivo representa la natural prosecución investigadora de el uso de esas cepas para el mismo fin en sustratos agroalimentares análogos a los de las precedentes investigaciones.

1.6.9 Producción de PHAs en biorreactores mediante cepas de *Azotobacter* sp

A pesar de la probada eficacia (en términos de producción) que conlleva el uso de inóculos selectivos para la síntesis de PHAs, muy pocas investigaciones se han llevado a cabo utilizando como inóculos selectivos, cepas del género *Azotobacter*.

La mayoría de los estudios se han centrado en la optimización de los parámetros de producción de PHAs utilizando biorreactores con población residente mixta (Serafim *et al.*, 2008^{a-b}; Dionisi *et al.*, 2007). (Quagliano *et al.*, 1997) estudiaron la variación de parámetros tales como la relación C/N y la aeración sobre la producción de PHAs por parte de un inóculo selectivo de *Azotobacter* sp. Evidenciando como es la limitada tensión de oxígeno la mayor responsable para la acumulación de PHAs, ante factores como la limitación de nitrógeno y la mayor carga orgánica.

Por lo tanto un proceso que partiendo desde ensayos de laboratorio y se vaya escalando para volúmenes mayores mediante inóculo selectivo de *Azotobacter* sp crecido sobre aguas residuales procedentes de la industria olivarera representa una posible estrategia para la producción optimizada de PHAs a partir de la valorización de un residuo.

2 Objetivos

Tal y como hemos referido anteriormente, uno de los principales inconvenientes a los que se enfrenta el desarrollo comercial de los bioplásticos es su elevado coste de producción, lo que hace que se presenten en desventaja frente a los plásticos convencionales derivados del petróleo. La posibilidad de emplear fuentes de carbono disponibles a coste cero, ha abierto horizontes muy prometedores en la industria de los bioplásticos, y en este sentido, uno de los sustratos más satisfactorios son los que proceden del sector agrícola.

En este contexto, y como objetivo principal de esta investigación, se pretende *optimizar la capacidad de producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) por parte de cepas bacterianas usando como sustrato, residuos generados en el proceso de obtención del aceite de oliva, considerando este bioproceso como posible tratamiento ecosostenible.*

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el crecimiento de distintas cepas bacterianas y su capacidad de producción de PHAs en medios químicamente definidos adicionados o no de ácidos grasos volátiles.
2. Evaluar el crecimiento de las cepas seleccionadas y su producción de PHAs en medios de alpeorujos fresco y en medios de alpeorujos digeridos anaerobicamente, así como valorar el efecto de la presencia de micronutrientes.
3. Identificar mediante técnicas analíticas los bioplásticos producidos. Y por último,
4. Estudiar la producción de polihidroxialcanoatos en biorreactores y desarrollar estrategias para su escalado a planta piloto.

Estos objetivos han sido desarrollados en el ámbito del proyecto de investigación titulado: "Production of polyhydroxyalkanoates from olive oil mills wastewater: POLYVER" (**COOP-CT-2006-032967**), proyecto europeo incluido en el VI Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico.

3 Materiales y Métodos

3.1 Microorganismos

Considerando la naturaleza y complejidad del residuo agrícola utilizado en esta Tesis Doctoral como sustrato para el crecimiento y producción de bioplásticos por parte de diversas cepas bacterianas, se planteó al inicio del mismo, utilizar como posibles microorganismos productores de bioplásticos, una colección de cepas bacterianas (16 en total) aisladas de varios subproductos generados en el proceso de obtención del aceite de oliva: alpechín, alpeorujo y agua de lavado de aceitunas, y por tanto adaptadas a las especiales características químicas que exhiben estos residuos. Esta colección de cepas, es producto de previas investigaciones que el grupo de investigación "Microbiología Ambiental", al cuál pertenecen los directores de esta Tesis doctoral, ha realizado en diversos proyectos.

La nomenclatura de las cepas bacterianas fue la siguiente:

- Cepas aisladas de medios adicionados de alpechín (10%): *a*, *b*, *crem*, *c*, *d*, *e*, *moc*, *m*, *s* y *t*.
- Cepas aisladas de medios adicionados de alpeorujo (10%): *x*, *y*, *z* y *alf*
- Cepas aisladas de muestras de agua de lavado de aceitunas: *Ochrobactrum intermedium* cepa WW01 y *Pseudomonas putida*, cepa WW02.

3.2 Selección de microorganismos con capacidad para almacenar polihidroxicanoatos (PHAs).

Los estudios se iniciaron recuperando los liófilos de las 16 cepas bacterianas anteriormente citadas almacenados hasta ese momento en cámara frigorífica (4⁰C) utilizando para ello 2 ml de medio TSB (Trypticase Soja Broth, Difco®). Los viales con el medio líquido se mantuvieron en agitación 3 h a 28⁰C, para posteriormente realizar siembras de alícuotas (0.1 ml) en placas de medio TSA. Tras la incubación (72h, 28⁰C) se valoró la viabilidad de las cepas liofilizadas, así como su pureza mediante siembras sucesivas en placas de medio TSA y finalmente se sembraron en tubos (agar inclinado) del mismo medio para su conservación.

Junto con estas cepas bacterianas también se recuperaron varios liófilos de bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae* y con probada capacidad para almacenar bioplásticos como material de reserva: *Azotobacter chroococcum* H23 (CECT4435) (Martínez-Toledo *et al.*,1995), cepa aislada de raíces de maíz, *Azotobacter vinelandii* UWD (Page *et*

al., 1989), cepa hiperproductora de PHB y *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837. El medio para recuperar los líofilos y testar su viabilidad y pureza, fue en este caso un medio químicamente definido, exento de nitrógeno: medio Burk líquido.

3.3 Aplicación de técnicas microscópicas para la detección de gránulos intracelulares de polihidroxialcanoatos (PHAs)

La detección de gránulos intracelulares de PHAs se realizó mediante el uso de técnicas microscópicas: microscopía de contraste de fase y microscopía de epifluorescencia usando para ello 2 colorantes lipofílicos: Negro Sudán y Azul Nilo II.

3.3.1 Tinción con Negro Sudán

Es un tipo de tinción que colorea los lípidos intracelulares, lo que permitió distinguir *a priori* entre cepas positivas y negativas en cuanto a la capacidad para almacenar estas sustancias. Posteriormente en aquellas cepas positivas se realizó una tinción con Azul Nilo, específica para los gránulos intracelulares de PHB.

Para realizar la tinción de lípidos intracelulares, 0,3 g de Negro Sudán II (Sigma-Aldrich®) se disolvieron en 75 ml de etanol al 95% y enrasados a 100 ml con agua desionizada. Con esta solución se cubrieron durante 15 minutos las extensiones de los cultivos previamente fijadas. El colorante excedente se secó con papel de filtro. Después, las extensiones se decoloraron con xileno durante 20 segundos, se secaron y se tiñeron con safranina (solución acuosa al 10 %) durante 1 minuto. Los hipotéticos gránulos de PHB se colorean de gris-negro y la célula vegetativa de rosado.

3.3.2 Tinción Azul Nilo II.

Es un tipo de tinción que requiere la visión mediante microscopía de epifluorescencia; el colorante específico (azul Nilo) se une con gran afinidad a los gránulos de PHB, sobre todo bajo su forma oxidada: rojo Nilo. Este hecho ocurre en presencia de agua o de una solución débilmente ácida; bajo esta forma, el colorante es soluble en los lípidos intracelulares a la temperatura de fijación de las células. Para llevar a cabo la tinción, se preparó una solución de azul Nilo al 1% en agua destilada y se filtró usando un filtro de 0,2 μm (Millipore®); las células se

fijaron a 55° C y se tiñeron; una vez teñidas, se eliminó el exceso de colorante y se procedió a la adición de una solución de ácido acético al 8% durante 1 minuto; se deja actuar adicionándole con posterioridad un protector de fluorescencia CITIFLUOR/Glycerol/Phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma® , conservándose a 4°C. La observación se llevó a cabo en un microscopio Zeiss Axioplan equipado con un sistema de epifluorescencia bajo emisión de luz azul (460 nm - específico para conseguir la emisión en naranja) mediante los filtros: BP 546, FT 580,LP 590. Las imágenes fueron registradas con una cámara digital Canon Power Shot S40. Los controles negativos fueron tratados de la misma forma (resultados no mostrados).

3.4 Extracción de polihidroxicanoatos (PHAs)

El método de extracción y purificación de los PHAs sintetizados y almacenados intracelularmente es fundamental en la efectividad y en el coste de cualquier proceso de obtención de bioplásticos. La concentración de PHAs en la biomasa celular tras el proceso puede ser bastante elevada, hasta del 80% en peso seco, bajo condiciones adecuadas (Brandl *et al.*, 1990). El proceso de extracción y recuperación de los PHA requiere eliminar de forma selectiva la masa celular que no es PHA. Técnicamente esto presenta dificultades, debido a que ambas materias, son sólidas y están íntimamente ligadas.

En este trabajo de investigación hemos utilizado dos metodologías diferentes para extraer el bioplástico acumulado en las células bacterianas. Una ha sido la extracción mediante cloroformo y la otra metodología ha estado fundamentada en la solubilización de la masa celular que no es PHA (NPCM, *Non PHAs Cell Mass*).

3.4.1 Extracción de PHA usando un disolvente orgánico clorado: cloroformo

Este método, muy útil, rápido y eficaz a nivel de laboratorio, permite el cálculo de la cantidad de biopolímero producido por la biomasa bacteriana. La adición de cloroformo sobre la biomasa liofilizada, a temperatura próxima al punto de ebullición, es esencial para permitir la disolución orgánica del biopolímero acumulado intracelularmente. El método consta de las siguientes fases:

- ✓ Liofilización de la biomasa
- ✓ Adición de cloroformo (solubilización de PHAs intracelular)

- ✓ Sonicación
- ✓ Centrifugación para separar las fracciones
- ✓ Recogida del sobrenadante
- ✓ Secado
- ✓ Pesada y caracterización del residuo obtenido

3.4.2 Extracción de PHA mediante solubilización de NPCM (*Non PHAs Cell Mass*) utilizando un tratamiento térmico en medio ácido.

Este método modificado del descrito por (Yu and Chen 2006), el cuál utiliza distintas combinaciones de pH y temperatura, puede ser considerado como un método ideal y más respetuoso con el medio ambiente si la producción de bioplástico se realiza a una escala superior a la escala de laboratorio. La digestión ácida tiene la función de disolver todos los fragmentos proteicos y los constituyentes NPCM, protegiendo a los PHAs, favoreciendo por lo contrario su cristalización y por lo tanto dando protección frente al sucesivo pase de digestión alcalina.; la última etapa (decoloración mediante lejía) permite una mayor purificación del producto.

Las etapas del método se enumeran a continuación:

- ✓ Liofilización de la biomasa
- ✓ Digestión ácida (H_2SO_4 0,1M) 30 min a 120°C
- ✓ Adición de NaOH (5M) para alcanzar un valor de pH: 10,0
- ✓ Centrifugación
- ✓ Lavado
- ✓ Centrifugación
- ✓ Adición de NaClO 5% (producto comercial) sobre el pellet (2 horas) para decolorar
- ✓ Lavado con agua destilada
- ✓ Secado
- ✓ Pesada y caracterización del residuo obtenido.

3.5 Determinación de la estructura de los biopolímeros extraídos mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

Al objeto de comprobar la naturaleza de los productos obtenidos tras la fase anterior, se realizaron análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en los servicios de RNM del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de

Granada. Los espectros de RMN de los productos así obtenidos se registraron mediante espectrómetro Bruker AM-300 con modalidad de transformación pulse-Fourier, a las frecuencias de 250 MHz(H1) y 62,9 MHz (C3) en tubos de 5 mm de diámetro interior. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, respecto a la cual se tabularon los corrimientos químicos ó ppm. En las Figuras 3.2. y 3.3. se muestran los cromatogramas obtenidos para los productos puros polihidroxibutirato (PHB) y poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerianato) [P(3HB-co-3HV)], homo y heteropolímero respectivamente, suministrados por Sigma Aldrich®

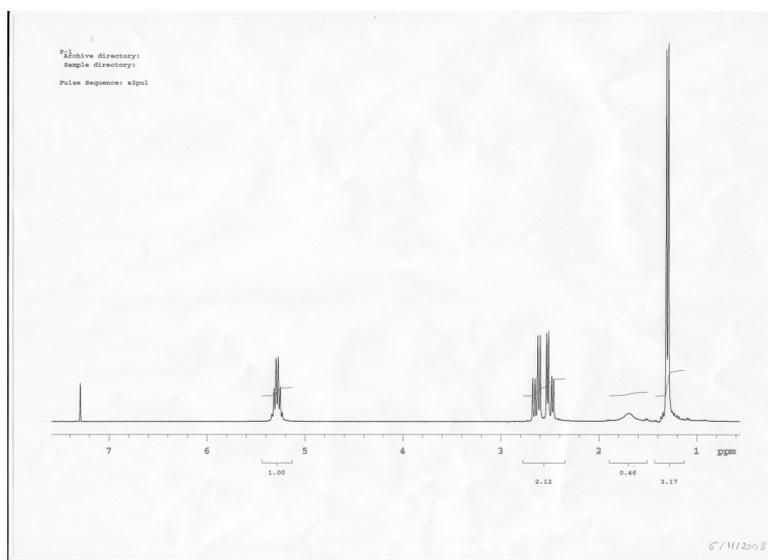


Figura 3.2. Cromatograma obtenido mediante RMN del producto puro PHB

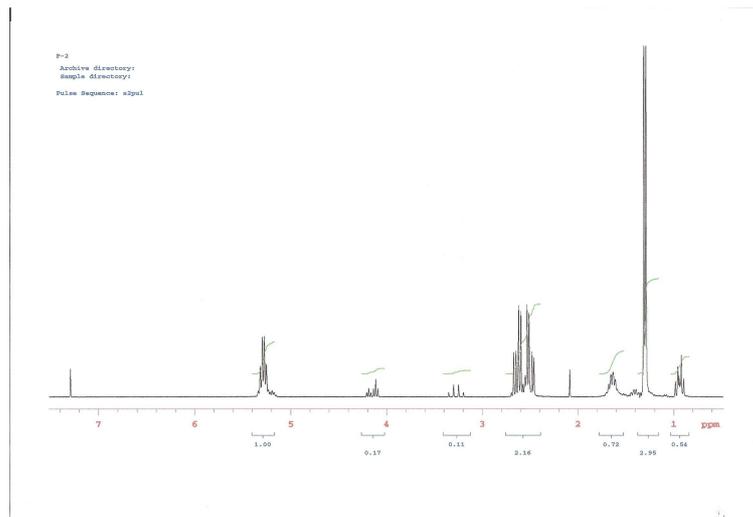


Figura 3.3. Cromatograma obtenido mediante RMN del producto puro poli (HB-co-HV)

3.6 Biorreactores anaeróbicos a escala de laboratorio.

Tal y como hemos descrito en el capítulo de *Introducción*, el alpeorujó es un residuo bastante complejo en cuya composición predominan polímeros de alto peso molecular y de difícil biodegradación.

La digestión anaeróbica de un residuo es un proceso complejo que se inicia con una fase hidrolítica en donde se produce la hidrólisis ó ruptura de compuestos de alto peso molecular en otros más sencillos e hipotéticamente más susceptibles de biodegradación. A esta fase le sigue una fase acidogénica en dónde los microorganismos acidogénicos generan alcohol, CO_2 , H_2 y ácidos grasos volátiles (VFAs) tales como el ácido acético, butírico, iso-butírico, ó ácido pentanoico considerados como precursores en la síntesis de copolímeros tales como el ácido hidroxibutírico-co-hidroxivalérico, (HB-co-HV), bioplásticos con características termoplásticas muy interesantes. Estos compuestos son sustratos para la microbiota metanogénica productora de metano en la última fase de un proceso anaeróbico.

Al objeto de conseguir una digestión anaeróbica parcial del alpeorujó, con la que se obtendrían compuestos químicos menos complejos que los originales, así como VFAs susceptibles de actuar como precursores de bioplásticos de naturaleza copolimérica, se diseñaron y construyeron biorreactores a nivel de laboratorio. En la Figura 3.4. se muestra un esquema y la fotografía del sistema utilizado. El biorreactor fue sellado herméticamente con un tapón de silicona, en el cuál se

perforaron agujeros en los que se ensamblaron tres tubos de vidrio: 2 verticales (uno para mantener la presión y el otro para toma de muestras) y un tubo en U, lleno de agua para garantizar la anaerobiosis durante el proceso. La ausencia de aire en el sistema se garantizó mediante burbujeo de He durante 15 minutos.

Los biorreactores con el medio de alpeorujos en su interior se introdujeron en cámaras de incubación en las que la temperatura estuvo controlada y mantenida a 35°C durante todo el tiempo que duraron los experimentos.

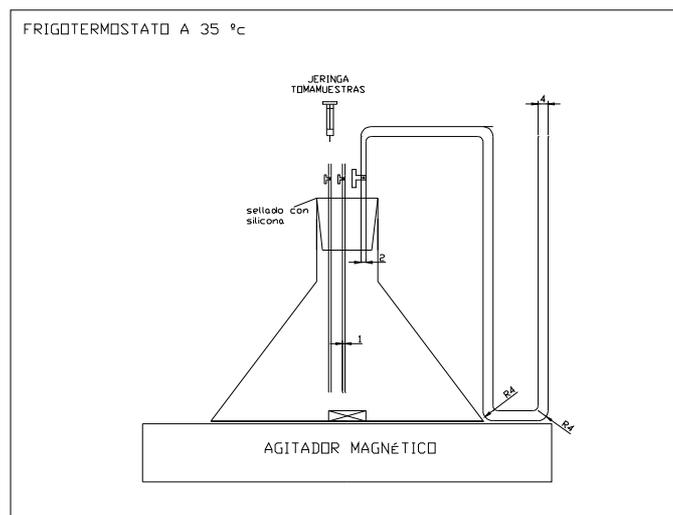


Figura 3.4. Esquema y fotografía de los sistemas utilizados

3.7 BIORREACTOR (Biostat®- plus)

El biorreactor utilizado en los ensayos de optimización de la síntesis y acumulación de bioplásticos por parte de las cepas bacterianas seleccionadas, constó de una cuba de cristal de volumen de trabajo aproximadamente de 2L de volumen total, sellada de manera hermética por tres tornillos, y dotada de una serie de sensores conectados a una unidad central (CPU) estando controlado todo el sistema por ordenador, con dos *software* al objeto de monitorizar la evolución de los parámetros y poder modificarlos, así como para la grabación de datos y elaboración de gráficas.

En el sistema se pueden determinar los siguientes elementos:

- “dedo frío” para el enfriamiento del biorreactor que actúa de manera antagónica a la camisa calefactora.
- Camisa calefactora (para la calefacción)
- Sensor de T
- Sensor de presencia de espuma para el control *antifoaming*
- Oxímetro (para la medida de O₂ disuelto)
- Medidor de pH
- Sistema de muestreo a triple cierre para el mantenimiento de la esterilidad del medio
- Trampa de gases (también para un eventual muestreo)
- Rotor
- Salida estéril de aire para el burbujeo en el medio
- Sistema de tamponamiento ácido/base
- Sistema de adicción de sustrato

Esos últimos componentes en particular funcionan por medio de bombas peristálticas. En la figura 3.5. se muestra un detalle del reactor con diversos sensores.



Figura 3.5. Fotografía del reactor Biostat®- plus con diversos sensores

3.8 Biorreactor a escala de planta piloto

Este biorreactor utilizado en el escalado del proceso a escala semi-técnica constó de una cuba plexiglas y dotada de camisa de agua para la calefacción con volumen de trabajo de 30L. Al igual que el biorreactor a escala de laboratorio, éste se dotó de una serie de sensores conectados a una unidad central para el control y modificación de parámetros. Entre los elementos se incluyeron:

- Camisa calefactora de agua (para la calefacción) circulante en la doble capa que envuelve el bioreactor
- Sensor de T
- Sensor de presencia de espuma para el control *antifoaming*
- Oxímetro (para la medida de O₂ disuelto)
- Medidor de pH
- Trampa de gases (también para eventual mostreo)
- Rotor
- Salida de aire para el burbujeo en el medio
- Sistema de tamponamiento ácido/base
- Sistema de adicción de sustrato



Figura 3.6. Fotografía del reactor de 30 L de capacidad con diversos sensores

3.9 Caracterización química de las muestras de *alpeoruj*

Las muestras de alpeoruj tanto frescas como digeridas en los biorreactores anaeróbicos contruidos para este fin, así como los efluentes obtenidos tras la fase aeróbica de acumulación de PHAs, fueron sometidas a análisis químico. A continuación se describen los parámetros analizados y metodología aplicada.

3.9.1 Demanda química de oxígeno (DQO).

Es una medida indirecta de la materia orgánica total que presenta una muestra, debido al hecho que el fuerte oxidante ($K_2Cr_2O_7$) en presencia de un exceso de solución ácida (H_2SO_4), y con $AgSO_4$ como catalizador, es capaz de oxidar por lo menos el 95% de la materia orgánica presente; esta medida se expresa mediante la cantidad de oxígeno consumido (mg/L) en tal oxidación.

El método empleado es el método del flujo cerrado, que resulta más rápido, reproducible y menos contaminante; Los reactivos utilizados se describen a continuación:

- **Solución digestora:** $K_2Cr_2O_7$ (0,0521M), se obtuvo disolviendo 12,25g $K_2Cr_2O_7$ en una solución de 40g of $HgSO_4$ disueltos en 167 ml de H_2SO_4 (98%) y enrasando hasta 1L con agua destilada.
- **Solución ácida:** obtenida por disolución de 6,6 g $AgSO_4$ en 1L de H_2SO_4 .

Metodología: En tubos de vidrio vacíos y limpios se añadieron 2 ml de la solución digestora, 3 ml de la muestra a analizar y 4 ml de la solución ácida. Posteriormente los tubos se agitaron cuidadosamente y se dispusieron en un bloque térmico a 150° C durante un tiempo de 2 horas y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se sacaron del bloque térmico, se enfriaron a Tª ambiente y se procedió a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Hitachi® U2000 usando una longitud de onda $\lambda = 600$ nm, longitud de onda óptima para la lectura de la presencia de los iones Cr reducidos por la reacción de oxido-reducción debida a la oxidación de la materia orgánica presente. Las lecturas fueron transformadas a valores de mg O₂ /L mediante su comparación con la curva patrón.

Preparación de la curva patrón: Se preparó una solución 41 mM de monopotasio f-talato anhidro (8,503 g en 1L de agua desionizada) para formular 5 patrones con valores de DQO entre 20 y 900 mg/L, los cuales se trataron como muestras utilizando los mismos reactivos, tubos, volúmenes y procedimiento antes descritos.

3.9.2 Demanda biológica de oxígeno en 5 días: DBO₅.

Es una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica que puede ser degradada por microorganismos, es decir la cantidad de materia orgánica susceptible de degradación biológica: materia orgánica biodegradable.

Metodología: El método utilizado para determinar este parámetro tanto en muestras frescas de alpeorajo como digeridas anaeróbicamente, ha sido una modificación del método manométrico, utilizando para ello distintos volúmenes de muestra que fueron introducidos en botellas opacas tapadas con tapones de lectura directa Oxitop®. Para evitar la interferencia del CO₂, en cada botella se adicionaron varias lentejas de NaOH (Panreac®). Estas botellas se colocaron sobre agitadores magnéticos y dentro de armarios frigostatos a Tª: 20 °C durante 5 días. Transcurridos los 5 días de incubaron se registraron las medidas las cuales fueron transformadas a valores de mg O₂/L.

3.9.3 Azúcares solubles totales.

El objetivo de esta analítica fue determinar la cantidad de azúcares solubles totales (en forma de glucosa) que contenía el alpeorajo y disponibles (como fuente de carbono) para la microbiota con capacidad para almacenar polihidroxialcanoatos en su citoplasma. El método utilizado fue el método de la antrona (Witham *et al.*, 1971), basado en la determinación colorimétrica de los compuestos que se generan por oxidación de los carbohidratos totales reducidos y no reducidos, en presencia

de H_2SO_4 . Para ello, se preparó una solución digestora ácida disolviendo 2 g de antrona en 1 L de H_2SO_4 (98%).

Metodología: Volúmenes de 1 ml de muestras de alpeorujos fresco y digerido anaeróbicamente se mezclaron con 2 ml de solución digestora ácida y la mezcla así preparada se colocó en un baño con agua (100°C) durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo las muestras se enfriaron a T^a ambiente y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro Hitachi® U2000 a una $\lambda=525$ nm. Los datos de absorbancia fueron transformados a mg/L, mediante una curva patrón construida con concentraciones crecientes (20, 40, 80 y 160 mg/L) de una solución madre de glucosa (1 g/L).

3.9.4 Determinación de ácidos grasos volátiles (VFAs) mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

Las propiedades y calidad de los polihidroxicanoatos están fuertemente influenciadas por la composición monomérica de los mismos, la cuál en definitiva, depende de la mezcla de ácidos grasos volátiles (VFAs) usados como fuente de carbono. La bibliografía consultada recoge numerosos estudios donde se pone de manifiesto la producción de PHB (polihidroxibutirato), un homopolímero, cuando el ácido acético es utilizado como única fuente de carbono, así como la producción de heteropolímeros (tales como el ácido 3 hidroxibutírico-co-3 hidroxivalérico) cuando el ácido propiónico y acético están presentes en los medios de cultivo (Haywood *et al.*, 1989; Page *et al.*, 1992, 1997).

Al objeto de conocer qué ácidos grasos volátiles eran generados en los biorreactores anaeróbicos diseñados y en qué momento la producción de los mismos fue máxima, se realizó un análisis cromatográfico de las muestras de alpeorujos tratadas bajo condiciones de anaerobiosis siguiendo la metodología que a continuación se describe.

El principio consiste en obtener con la máxima pureza posible, los diferentes ácidos orgánicos volátiles que se hayan generado en el proceso anaeróbico de hidrólisis, evitando interferencias con los componentes pigmentados del alpeorujos digerido.

Metodología:

- ✓ Dilución de las muestras de alpeorujos con 3 volúmenes de agua destilada.
- ✓ Sonicación durante 30 minutos.

- ✓ Acidificación con HCl a pH: 2.0.
- ✓ Adición de polivinil pirrolidona (PVP) para reducir la interferencia de los polifenoles
- ✓ Adición de una solución de acetona (agua:acetona 1:2) para disolver los componentes lipofílicos del alpeorujo para poder así recoger los VFAs en el sobrenadante
- ✓ Centrifugación y recogida del sobrenadante.
- ✓ Preconcentración de las muestras y extracción de analitos mediante columnas ENV+ (Isolute[®] SPE), columnas de extracción de amplio espectro para solutos aniónicos, previo acondicionamiento de las mismas con metanol.
- ✓ Análisis de las muestras mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS), utilizando para ello un cromatógrafo Hewlett Packard (HP 6890 Series GC System/HP 5973 Mass Selective Detector)

3.10 Ensayo de ecotoxicidad: ensayo MICROTOX[®].

El sistema Microtox[®] es un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC_{50}) (Onorati F. *et al.*, 2004). La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia (García, 2004).

Para la realización del estudio de ecotoxicidad se han empleado muestras tanto frescas como digeridas anaerobicamente del residuo alpeorujo diluido al 60%, así como muestras procedentes de la fase aeróbica de producción y acumulación de PHAs por parte de las cepas bacterianas, siendo la metodología aplicada para dichos análisis la que se expone a continuación.

Preparación del sustrato

- Filtración previa de los eventuales sólidos en suspensión mediante filtro de PTFE 0.22 μm (Millipore Millex[®] GN)
- Ajuste de la salinidad (NaCl al 2% y NaCl al 20%). La razón principal de la utilización de estas disoluciones salinas es garantizar el adecuado equilibrio osmótico de la bacteria, asegurándose así que la disminución de la emisión de luz de la bacteria se debe exclusivamente al efecto de los contaminantes
- Ajuste de pH (pH neutro 6,0-8,0)
- Ajuste de la temperatura. Es muy importante mantener estable la temperatura, porque puede afectar sensiblemente la emisión de bioluminiscencia. (Ribo *et al.*, 1990).
- Diluciones de la muestra inicial con NaCl al 2%.

Preparación del microorganismo

Los microorganismos son suministrados como liófilos y antes de su uso deben ser aclimatados en la solución reconstituyente manteniéndolos a 15°C.

- Resuspensión de la bacteria, con NaCl 2% e incubación de la suspensión.
- Medida de la luminiscencia mediante luminómetro

Para determinar el tiempo de incubación, debe evaluarse la atenuación de la bioluminiscencia en la muestra considerada como control (suspensión de *Vibrio fischeri* en una muestra de solución salina al 2%). Una vez determinado el tiempo de reacción, es necesario calcular f_{kt} , esto es, la relación entre luminiscencia inicial y luminiscencia al final del tiempo de contacto: $t = x$ minutos

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_{k0}} \quad (t = \mathbf{x} \text{ min})$$

Usando este factor de corrección, se puede obtener I_0 de cada muestra, que vendrá así corregido con el valor del control.

De una forma sencilla, se pondrá en contacto el sustrato del cual se quiere determinar el efecto tóxico, con la suspensión bacteriana, detectándose la pérdida de bioluminiscencia, a un tiempo determinado H_t (% de inhibición de la actividad bioluminiscente) y expresándose la toxicidad aguda de la muestra según la fórmula:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100$$

Dónde I_{ct} es la intensidad de luminiscencia inicial y I_{Tt} la final al tiempo de contacto con la muestra (ej.: 30 minutos).

Finalmente puedo calcular el efecto dosis/respuesta por la cual a una determinada concentración de contaminante obtendré la concentración efectiva 50, EC_{50} :

$$\Gamma_t = \frac{\overline{H}_t}{100 - \overline{H}_t}$$

Donde Γ_t es la relación entre el % de inhibición después del tiempo de exposición y la diferencia porcentual por la cual se consigue esa inhibición a una determinada concentración de sustancia inhibidora. Para una reducción de la bioluminiscencia del 50%, el valor de Γ_t será 1.

4 Resultados

4.1 Caracterización de las muestras de *alpeorujo*.

Las características físico-químicas de este subproducto se ven influenciadas por multitud de factores ambientales, climáticos (régimen de lluvias, periodos de sequía) y edafológicos (contenido en materia orgánica del suelo, minerales del suelo). En la Tabla 4.1.se muestran los valores de los parámetros analizados en este estudio: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno en 5 días (DBO₅), pH, contenido en agua y carbohidratos hidrosolubles (expresados como glucosa), así como los valores reseñados en la literatura científica revisada, para otros parámetros como serían: P, N, K, polifenoles, proteínas, lignina y lípidos.

Tabla 4.1. Principales parametros químicos-físicos del alpeorujo

DQO (mg*L⁻¹ O₂)	175000
DBO₅(mg*L⁻¹ O₂)	8000
Agua (%)	74
pH	4.5
P(g/kg)	0.3-1.5
Lípidos(%)	8.0-18.0

Carbohidratos(%)	9.0-19.0
N total (%)	10-18
K (g/kg)	6.0-29.0
Polifenoles (%)	0.5-2.5
Proteínas (%)	6.0-7.0
Lignina (%)	20-47

Los parámetros que cabe destacar son el elevado valor de DQO (medida indirecta de la cantidad de materia orgánica total), el reducido valor relativo de DBO₅, lo que indicaría "a priori", la baja biodegradabilidad de este subproducto; el porcentaje de carbohidratos, lo que indicaría que es una buena fuente carbonatada, el relativo bajo porcentaje de polifenoles sobre todo si se compara con el alpechín, y por último el elevado contenido de lignina, lógico por otra parte si consideramos el origen del alpeorujo.

4.2 Selección de las cepas productoras de PHAs

En esta sección de nuestra investigación se procedió a seleccionar diferentes cepas con capacidad para almacenar gránulos de polihidroxicanoatos (PHAs) en su citoplasma, cepas bacterianas aisladas desde muestras de alpechín y de agua de lavado de las aceitunas. En nuestro estudio también se incluyeron 3 cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*, cuya capacidad para almacenar PHAs a partir de medios adicionados de alpechín fue puesta de manifiesto por diversos miembros del grupo de investigación (Martínez-Toledo *et al.*, 1995 González-López *et al.*, 1996, Pozo *et al.*, 2002)

4.2.1 Tinción Negro Sudán y Rojo-Nilo

Para evaluar la capacidad para almacenar polihidroxicanoatos por parte de las cepas bacterianas, se procedió a realizar la tinción Negro-Sudán a las cepas aisladas en el transcurso de nuestra investigación, siendo sólo 4 cepas bacterianas: cepa B, cepa M, *Ochrobactrum intermedium* cepa WW01 y *Pseudomonas putida* cepa WW02 las que mostraron contener gránulos refringentes negro-grisáceos en su citoplasma (Figura 4.1). Las tres cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*, esto es, *Azotobacter chroococcum* H23 (CECT4435) (Martínez-Toledo *et al.*, 1985), cepa aislada de raíces de maíz, *Azotobacter vinelandii* UWD (Page *et al.*, 1989), cepa hiperproductora de PHB y *Azotobacter vinelandii* (ATCC 12837) consideradas como control, también mostraron gránulos gris-negro refringentes en su citoplasma tras esta tinción Negro-Sudán. (Figura 4.2) y gránulos fluorescentes cuando fueron sometidas a tinción de Rojo-Nilo y observación mediante microscopia de epifluorescencia (Figura 4.2) utilizando un microscopio Zeiss Axioplan equipado con un sistema de epifluorescencia bajo irradiación de luz azul (460 nm - específico para conseguir la emisión en naranja) mediante los filtros: BP 546,FT 580,LP 590. Las imágenes fueron registradas con una cámara digital Canon Power Shot S40.

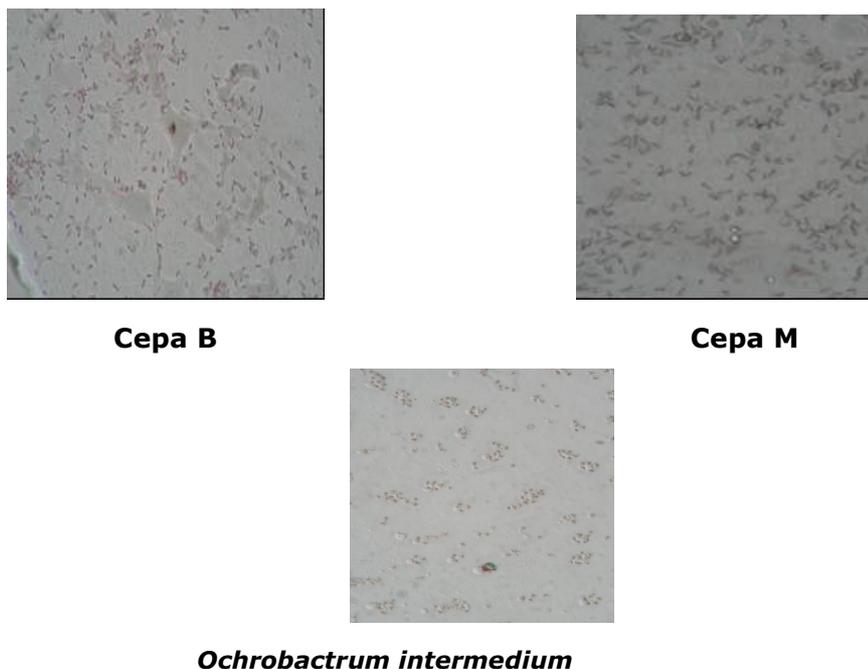


Figura 4.1. Fotografías al microscopio óptico de las diferentes cepas positivas (Tinción Negro-Sudán)

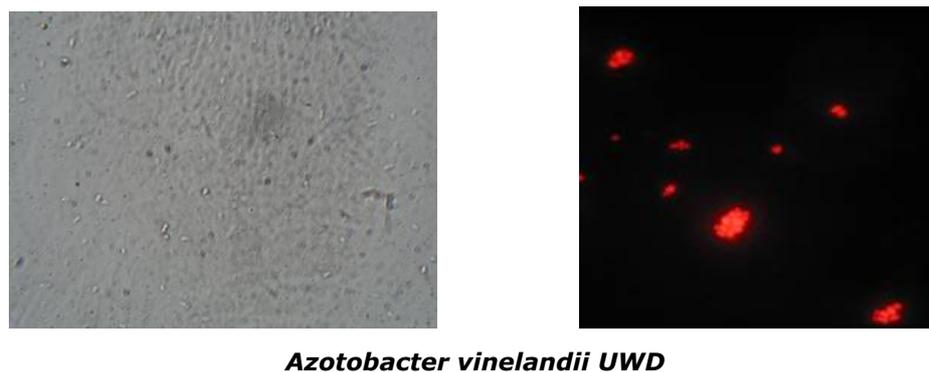


Figura 4.2. Fotografías al microscopio óptico y de epifluorescencia.

4.3 Crecimiento de las cepas bacterianas en medios químicamente definidos.

Una vez seleccionadas las cepas bacterianas con mayor capacidad para almacenar polihidroxicanoatos (como gránulos en su citoplasma) puesta de manifiesto mediante microscopía óptica y de epifluorescencia, se procedió a evaluar su crecimiento en medios químicamente definidos.

El medio elegido para evaluar el crecimiento, fue el medio Burk's (Page *et al.*, 1992), medio que garantizó la reproducibilidad de los ensayos en cuanto

permitió variar su composición (en cuanto al N y P) según las exigencias metabólicas.

Inicialmente, las cepas fijadoras de nitrógeno se inocularon en medio Burk's sin fuente de N, contrariamente a las condiciones en las cuales se hicieron crecer las otras cepas estudiadas (cepa B, M, *O. intermedium* y *P. putida*), es decir en medio Burk's con fuente de N: NH₄Cl al 0,12%.

Los resultados de crecimiento de todas las cepas pueden considerarse como optimo bajo las condiciones de cultivo óptimos, sobre todo el alcanzado por la cepa B y por las cepas de *Azotobacter*: *A. chroococcum* H23 y *A. vinelandii* UWD (Figura 4.3).

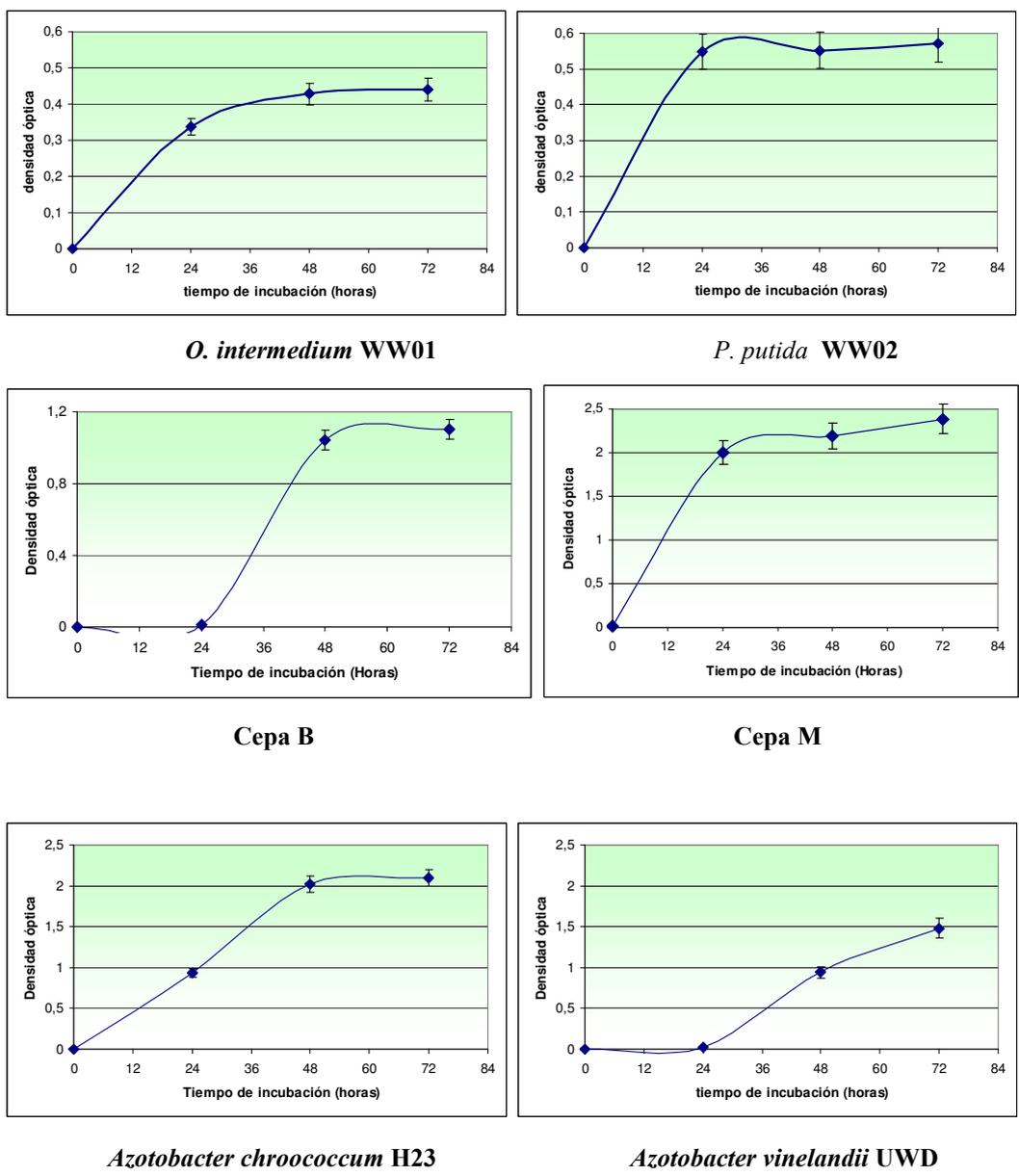


Figura 4.3 Curvas de crecimientos de las diferentes cepas positivas en medio químicamente definido

4.4 Producción de PHAs en medios químicamente definidos

Las cantidades (g/L) de PHAs sintetizadas por parte de las cepas objeto de nuestro estudio, se muestran en las Figuras 4.4-4.8; la producción de PHAs por parte de las cepas B y M fue indetectable. Las únicas cepas bacterianas capaces de producir cantidades apreciables de PHAs fueron las cepas pertenecientes a la familia *Pseudomonadeceae*, alcanzándose producciones máximas, en términos porcentuales, de 53, 25 y 16% por parte de *A. vinelandii* UWD, *A. chroococcum* H23 y *A. vinelandii* 12387, respectivamente. En términos absolutos, bajo nuestras condiciones de cultivo (medios sin la adición de N) la máxima producción fue de 0,56 g/L, alcanzada por parte de *A. chroococcum* H23.

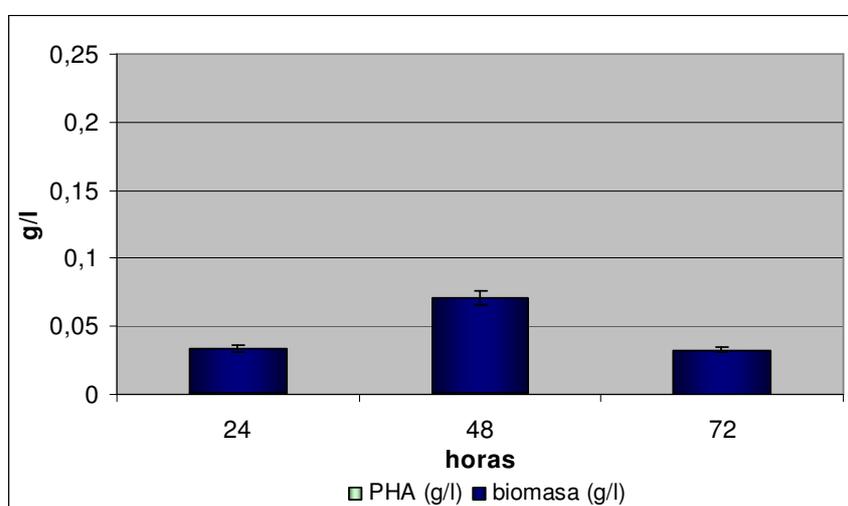


Figura 4.4. *Ochrobactrum intermedium*, cepa WW01. Producción de PHAs en medio Burk's

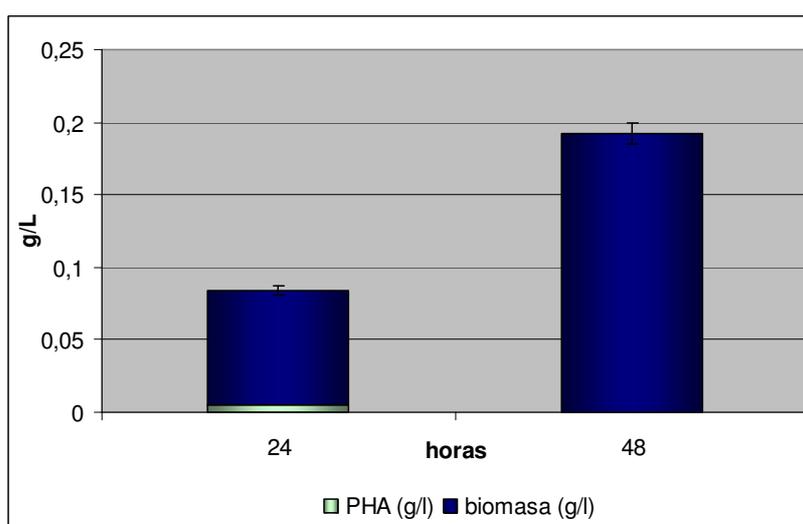


Figura 4.5. *Pseudomonas putida*, cepa WW02. Producción de PHAs en medio Burk's

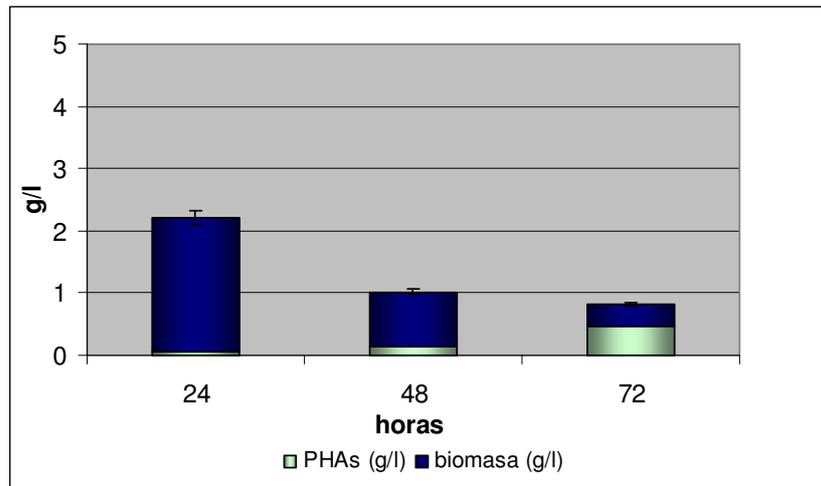


Figura 4.6. *Azotobacter vinelandii* UWD. Producción de PHAs en medio Burk's

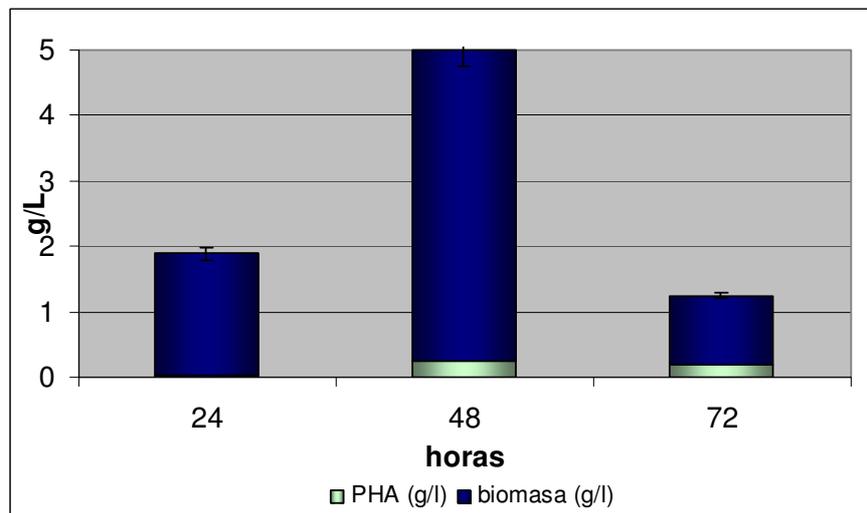


Figura 4.7. *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837. Producción de PHAs en medio Burk's

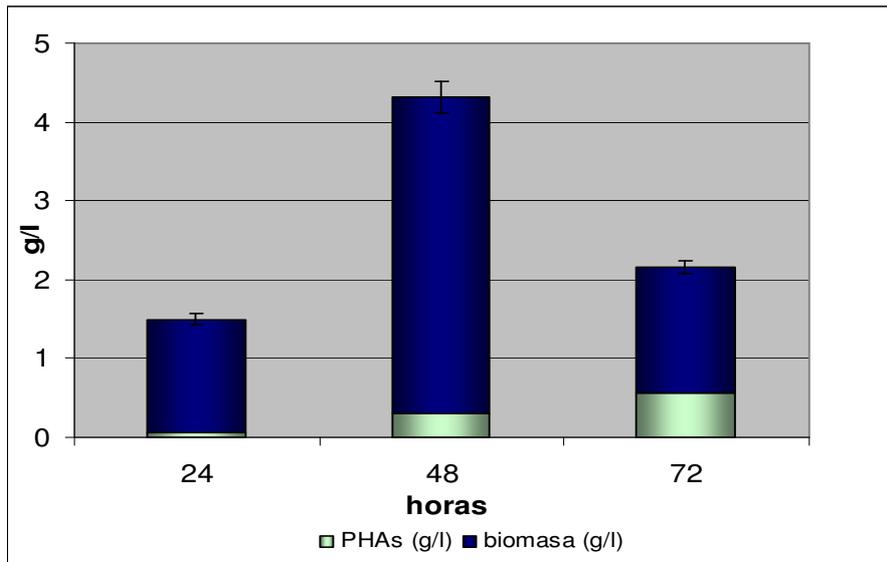


Figura 4.8. *Azotobacter chroococcum* H23. Producción de PHAs en medio Burk's

4.5 Producción de PHAs por parte de cepas de *Azotobacter* sp en medios químicamente definidos adicionado de fuente de nitrógeno.

Considerando que la adición de una fuente de N determinara un mejor y eficiente empleo de la energía metabólica por parte de las cepas de *Azotobacter* sp, se realizó otro ensayo en el cual se añadió a los medios de cultivo, una fuente nitrogenada fácilmente asimilable por parte de las células: NH_4Cl al 0,12%. Los resultados demostraron que ya sea en términos de producción porcentual ó en términos de valor absoluto, la producción de PHAs incrementó significativamente alcanzando un valor máximo de 2,3 g/L de PHAs por parte de la cepa *A. vinelandii* UWD (67% del peso seco de la biomasa) tras 72h de incubación, correspondiendo estos valores a un incremento de la producción entorno al 300% (Figuras 4.9-4.11)

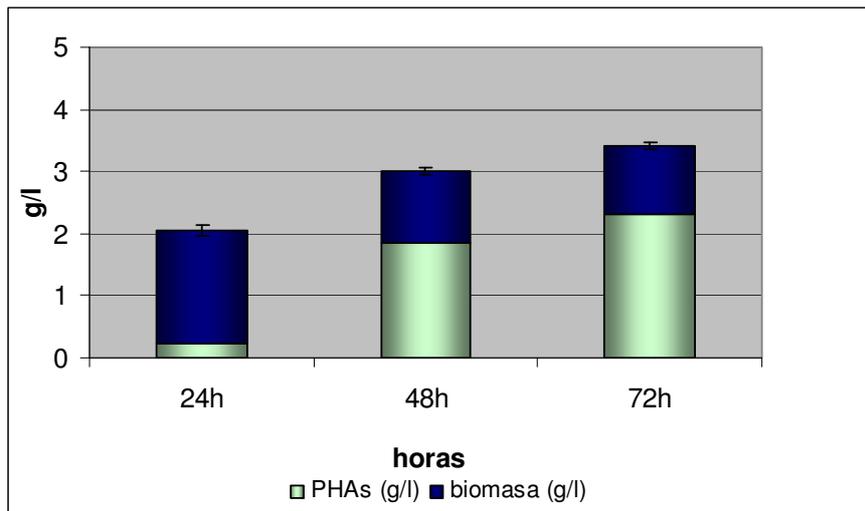


Figura 4.9. *Azotobacter vinelandii* UWD. Producción de bioplástico en medio Burk's adicionado de N

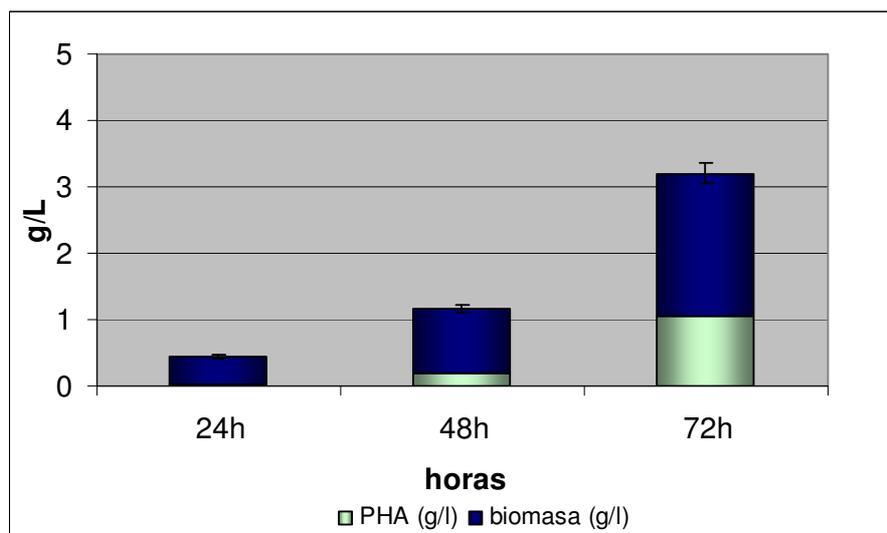


Figura 4.10. *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837. Producción de bioplástico en medio Burk's adicionado de N

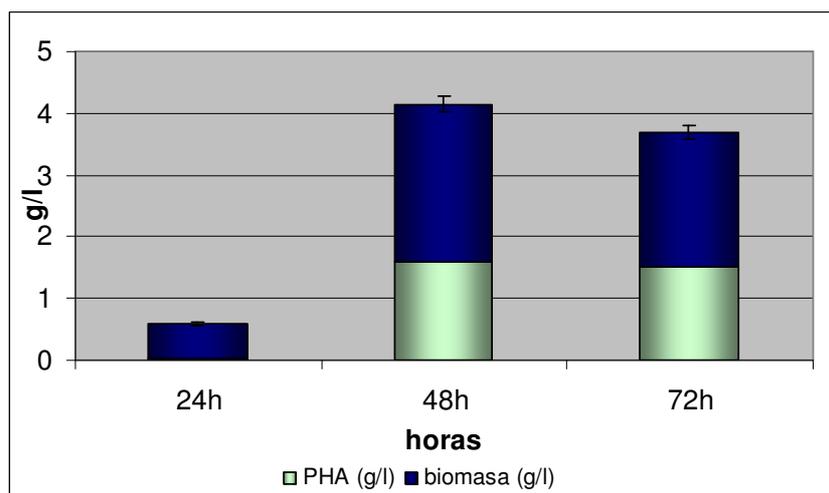


Figura 4.11. *Azotobacter chroococcum* H23. Producción de bioplástico en medio de Burk's adicionado de N

4.6 Crecimiento de cepas de *Azotobacter* sp en presencia de diferentes ácidos grasos volátiles de cadena corta (VFAs)

Al objeto de evaluar el crecimiento de las diferentes cepas de *Azotobacter* utilizadas en esta investigación (*A. chroococcum* H23, *A. vinelandii* UWD, *A. vinelandii* ACTT 12837), en medios adicionados de ácidos grasos de cadena corta (VFAs), se inocularon estas cepas en medios de cultivo adicionados de crecientes concentraciones de VFAs hasta una concentración ($X = 4,8$ g/L) que correspondería a la concentración de ácidos grasos volátiles de cadena corta esperada en un proceso de producción de VFAs mediante digestión anaeróbica del residuo alpeorujo (Koutrouli et al., 2009).

Los VFAs adicionados fueron ácido acético (A), ácido propiónico (P) y ácido butírico (B), correspondiendo las concentraciones ensayadas a $X/4$, $X/2$, $3/4X$ y X .

Las diferentes cepas mostraron diferente adaptación pero *Azotobacter vinelandii* UWD y *Azotobacter chroococcum* H23 fueron las cepas bacterianas que mostraron el mejor crecimiento (como densidad óptica, DO) ante la máxima concentración de VFAs ensayada. (Figuras 4.12-4.14)

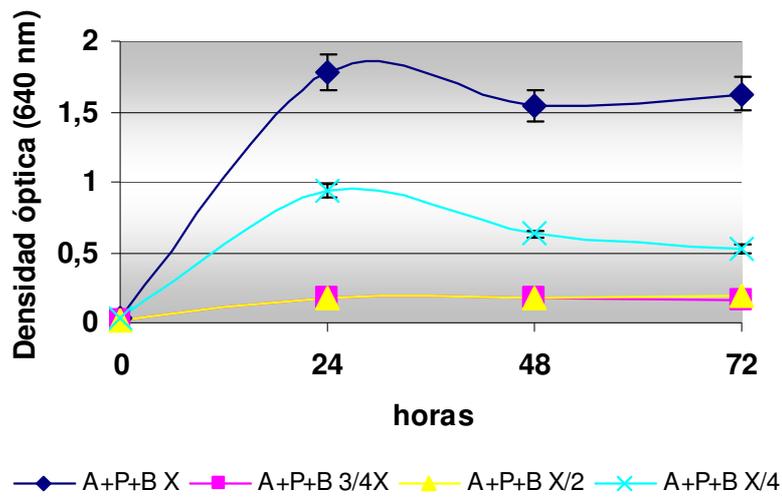


Figura 4.12. Curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* UWD con diferentes concentraciones de VFAs . (X = 4,8 g/L)

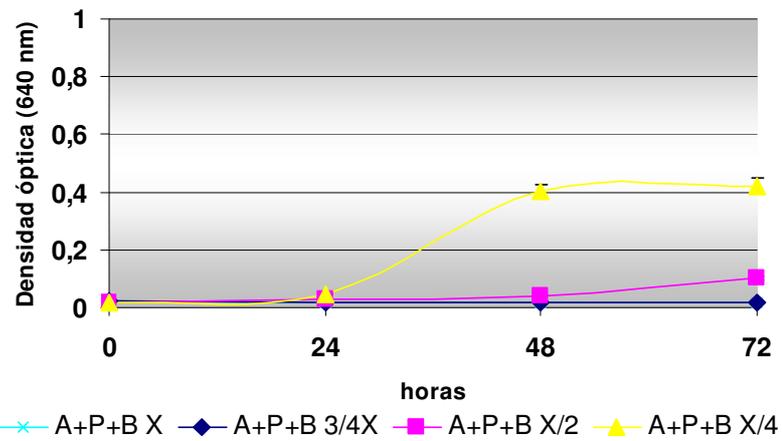


Figura 4.13. Curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* 12387 con diferentes concentraciones de VFAs (X=4,8 g/L)

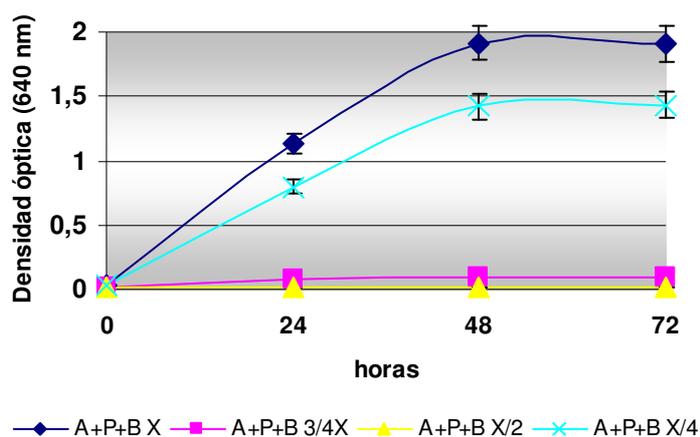


Figura 4.14. Curvas de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* H23 con diferentes concentraciones de VFAs (X=4,8 g/L)

4.7 Crecimiento y producción de PHAs en medio químicamente definido (simulación de alpeorujó)

Según la bibliografía consultada, los dos azúcares hidrosolubles más representativos en la composición del alpeorujó son glucosa y manitol, por lo que se diseñó y realizó un ensayo en el que se intentó reproducir la composición química de un hipotético residuo de alpeorujó sometido a digestión anaeróbica. En éste existirían VFAs (producto de la acidogénesis) y determinadas cantidades de azúcares hidrosolubles. Este sustrato sería la base para ensayar la producción de PHAs mediante las diferentes cepas. Posteriormente se estudió también el efecto de la limitación de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de PHAs por parte de estos microorganismos.

Las Figuras 4.15-4.16 muestran el crecimiento de las cepas bacterianas ante distintas condiciones nutricionales y de oxigenación, mientras que la producción de PHAs se muestra en las Figuras 4.17-4.18.

Las condiciones que más favorecieron el crecimiento de las cepas fueron las condiciones en las cuales la cantidad total de glucosa y manitol estaba alrededor del 2%, mientras que una leve limitación del oxígeno incrementó rápidamente el crecimiento principalmente en el caso de la cepa *Azotobacter vinelandii* UWD. La producción de PHAs se vió incrementada en términos absolutos en el caso de *Azotobacter vinelandii* 12387 (2,0 g/L) cuando la cepa fue inoculada en un medio de cultivo con una concentración de glucosa+manitol del 1%, correspondiendo también a esta condición nutricional los mayores valores de acumulación porcentual por ambas cepas. Las diferencias entre oxigenación fuerte y leve se refiere

respectivamente, a una cantidad de 200 y de 500 ml de medio de cultivo, siendo por lo tanto el espacio de cabeza presente en el matr az, el único responsable del aporte de oxígeno al medio, a paridad de agitación.

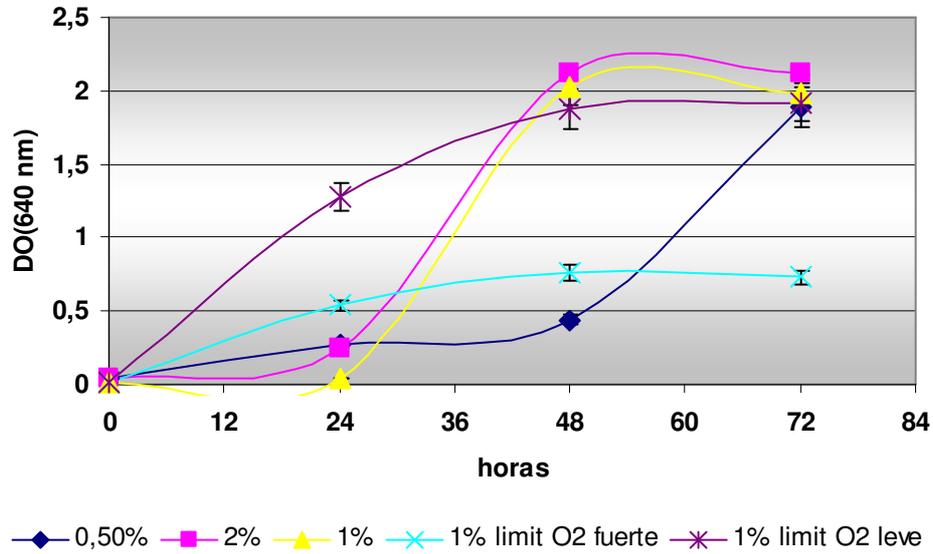


Figura 4.15. Curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* UWD en medios adicionados de VFAs al 0,5% y diferentes concentraciones de glucosa+manitol

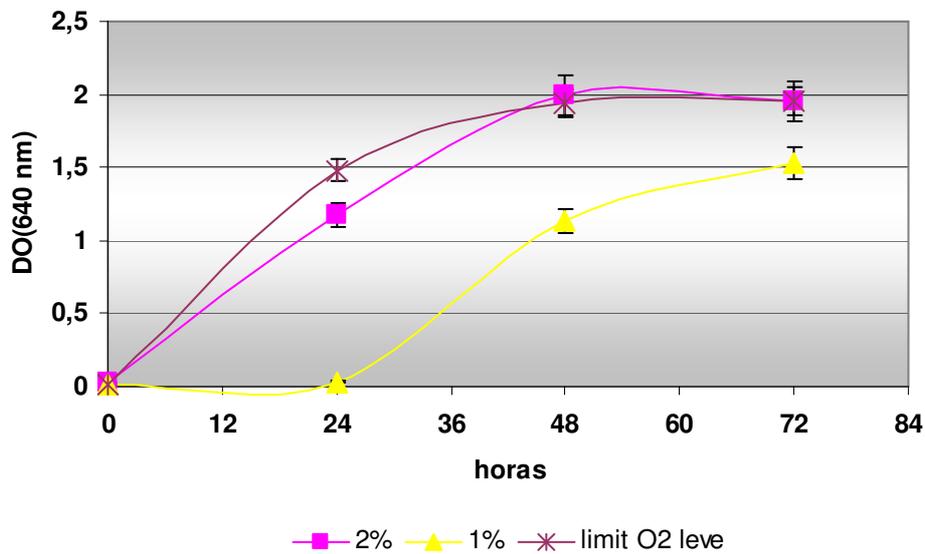


Figura 4.16. Curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* 13827 UWD en medios adicionados de VFAs al 0,5% y diferentes concentraciones de glucosa+manitol

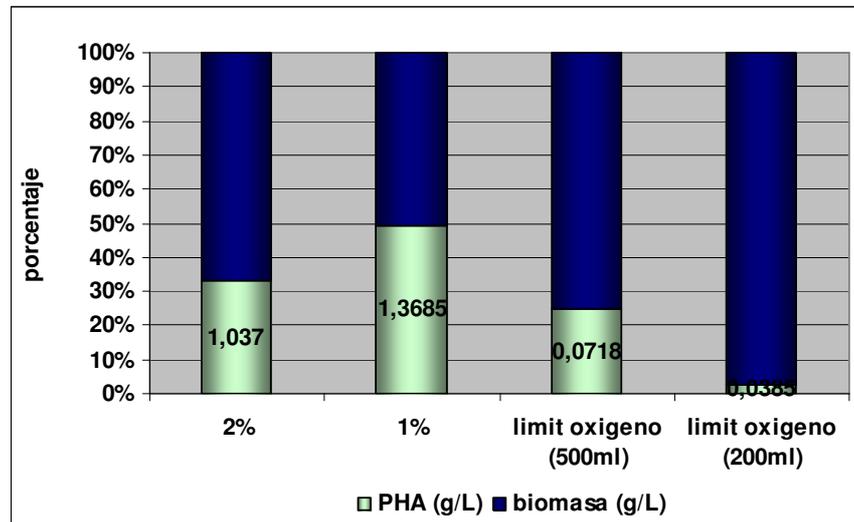


Figura 4.17 Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en medios adicionados de VFAs al 0,5% y diferentes concentraciones de glucosa+manitol

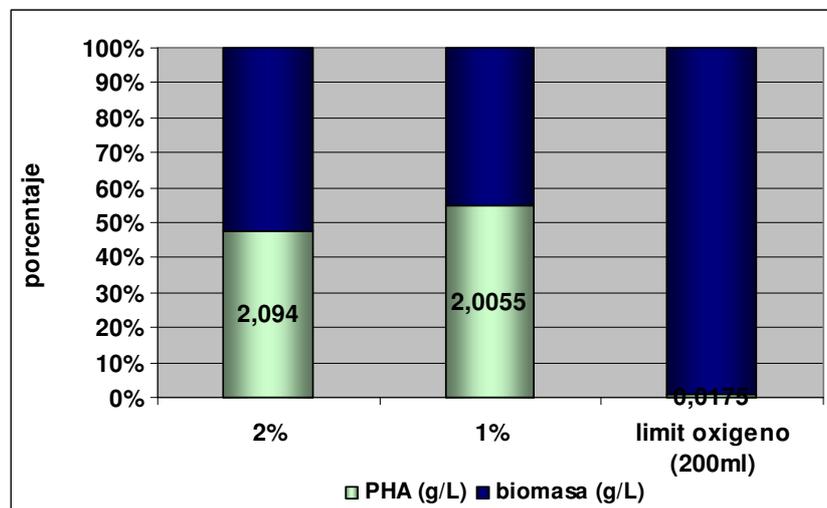


Figura4.18. *Azotobacter vinelandii* 13827 en medios adicionados de VFAs al 0,5% y diferentes concentraciones de glucosa+manitol

4.8 Crecimiento y producción de PHAs por cepas bacterianas del género *Azotobacter* en medios de alpeorujillo fresco diluido.

4.8.1 Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas en muestras de alpeorujillo fresco y diluido.

Las muestras diluidas (20, 40 y 60% v/v) y centrifugadas de alpeorujillo fresco usadas como medio para el crecimiento bacteriano, fueron esterilizadas por filtración utilizando para ello filtros de celulosa (tamaño de poro 0.42 μm), previa inoculación con las cepas seleccionadas. Las muestras inoculadas (matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de alpeorujillo diluido y estéril por filtración) fueron mantenidas en agitación y temperatura controlada (100 rpm y 28°C, respectivamente) durante 72 h. A las 0, 24, 48 y 72h de incubación se procedió a determinar el recuento de microorganismos cultivables (como Log UFC/ml) mediante la técnica de recuento en placa utilizando para las siembras de las alícuotas elegidas, placas de medio Burk sólido.

En las siguientes figuras se muestran las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas incubadas en medios de alpechín fresco diluido y estéril. Las tres cepas mostraron un buen crecimiento en las tres diferentes concentraciones de alpeorujillo fresco ensayadas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas.

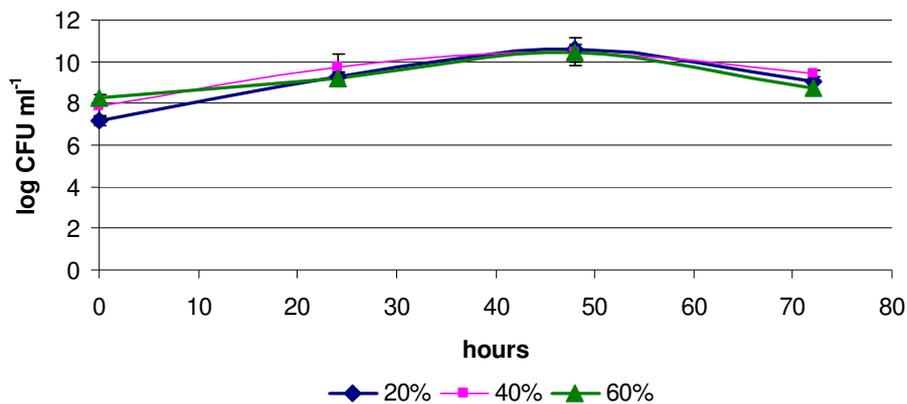


Figura 4.19. Curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujillo fresco a diferentes concentraciones.

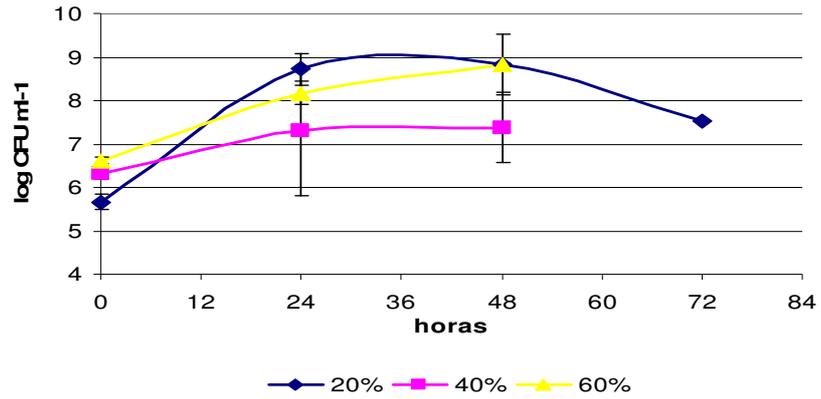


Figura 4.20. Curvas de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorajo fresco a diferentes concentraciones.

4.8.2 Producción bacteriana de bioplástico en medios de alpeorajo fresco y diluido.

En las siguientes figuras se muestra la producción de bioplástico (en g/L), así como el porcentaje (%) referido a biomasa, obtenido tras 72h de incubación de la cepa *Azotobacter vinelandii* UWD inoculada en muestras de alpeorajo fresco y diluido al 20%, 40% y 60% mantenidas bajo agitación y temperatura controlada.

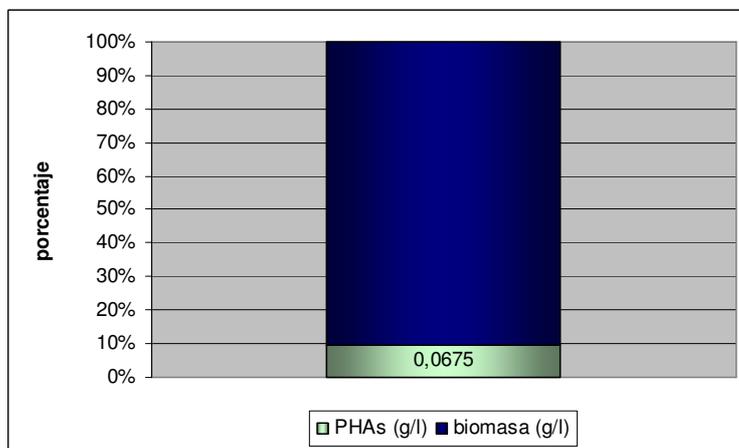


Figura 4.21. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorajo fresco al 20%

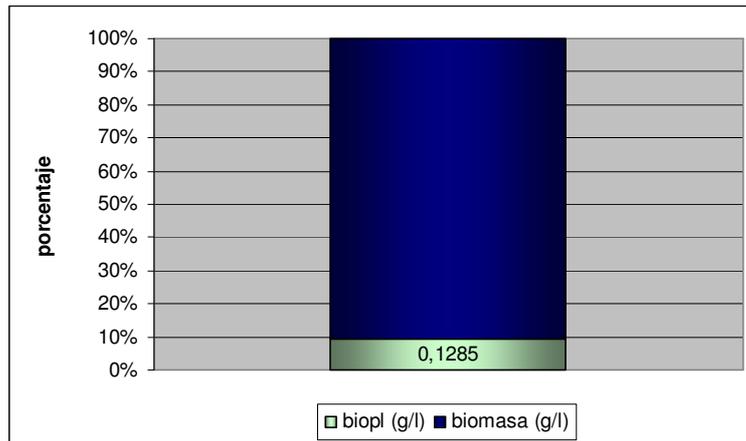


Figura 4.22. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujó fresco al 40%

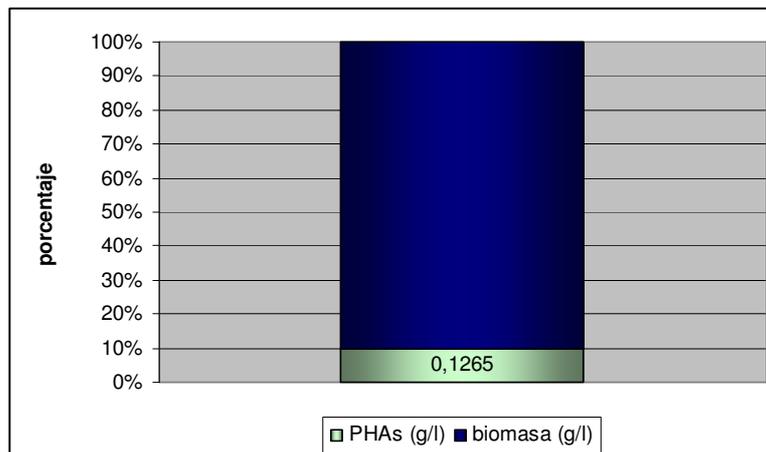


Figura 4.23. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujó fresco al 60%

Como se observa, las producciones fueron relativamente bajas cuando se comparan con las producciones obtenidas en medios químicamente definidos suplementados con nitrógeno (Figuras 4.9 y 4.11). Es importante poner de manifiesto que a pesar de los valores de crecimiento reflejados en las curvas anteriores, el alpeorujó es un subproducto bastante complejo en cuanto a su composición, predominantemente macromoléculas recalcitrantes, y dónde se han caracterizado hasta ocho fracciones fenólicas de alto poder antioxidante y antimicrobiano (De Marco *et al.*, 2006). Por lo tanto, y especialmente a raíz de los escasos resultados de producción de bioplástico obtenido a partir de muestras de alpeorujó fresco, nos planteamos, después de la revisión de la bibliografía existente (Dionisi *et al.*, 2005; Fezzani *et al.*, 2008; Rincon *et al.*, 2008), realizar un pre-tratamiento anaeróbico a las muestras de alpeorujó antes de la fase aeróbica de

síntesis y acumulación de PHAs. Es por ello por lo que se diseñaron y se construyeron reactores anaeróbicos a nivel de laboratorio con una doble finalidad: la producción de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta (VFAs) y la hidrólisis de macromoléculas.

4.9 Crecimiento y producción de PHAs por cepas bacterianas del género *Azotobacter* en medios de alpeorujos diluidos y digeridos anaerobicamente.

La digestión anaeróbica del alpeorujos se realizó usando biorreactores a escala de laboratorio y descritos previamente en el apartado de Material y Métodos. El objetivo de su utilización fue conseguir una óptima producción de VFAs y al mismo tiempo conseguir una hidrólisis macromolecular de la fracción polifenólica presente, sin afectar a la fracción carbohidrática hidrosoluble (principalmente glucosa y manitol). Todo esto se consiguió ensayando diversos tiempos de retención hidráulica.

Los resultados obtenidos determinaron que el óptimo tiempo de retención hidráulica se situaba entre 24 y 30 horas de funcionamiento. En este tiempo se analizaron los sustratos mantenidos en anaerobiosis y se determinó la máxima y variada producción de VFAs, así como la evolución de azúcares hidrosolubles tal y como se muestra en las Figuras 4.24-4.25. Obtenidos estos resultados se diseñó un ensayo preliminar en el cual, con un tiempo de retención hidráulica de 27 horas, se obtuvo un volumen de alpeorujos digeridos que esterilizado por filtración, fuera el sustrato de crecimiento y acumulación de PHAs de un inóculo selectivo de *Azotobacter vinelandii* UWD (como primer productor de PHAs elegido).

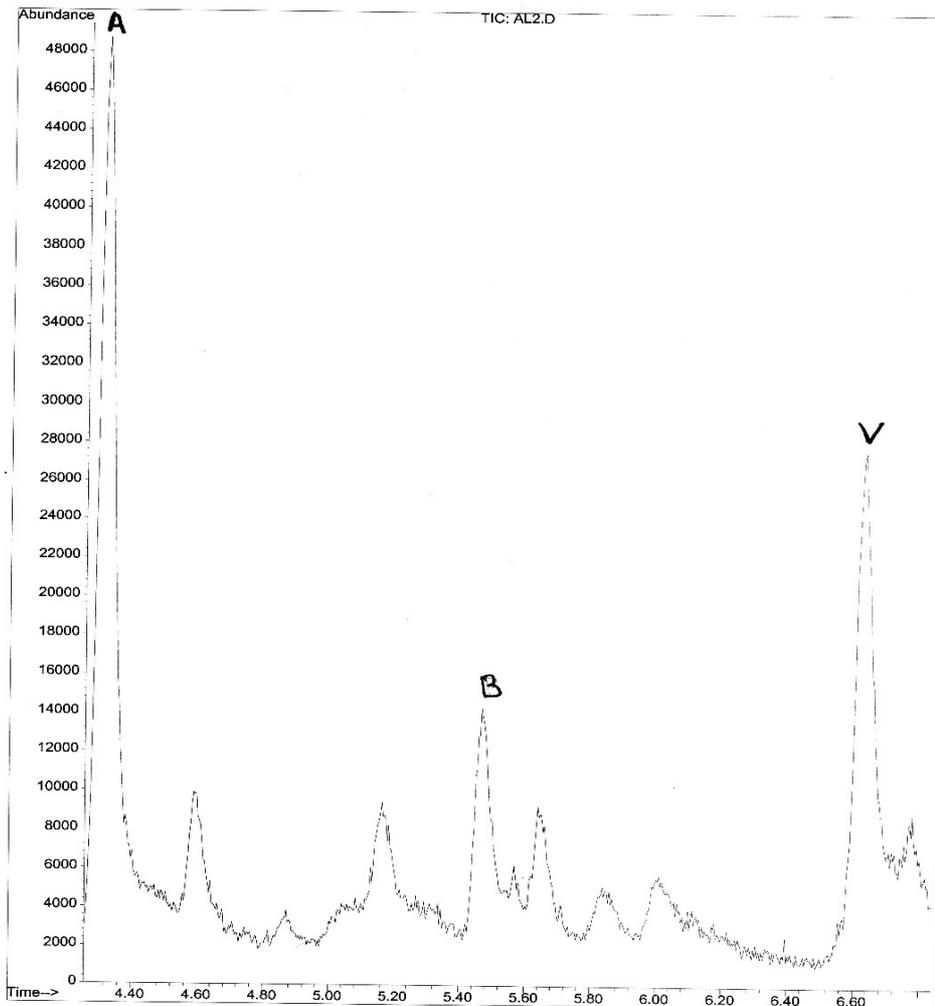


Figura 4.24. Cromatograma (GC-MS) de una muestra de alpeorujó digerido anaerobicamente durante 27h (A: ácido acético; B: ácido butírico; V: ácido valérico)

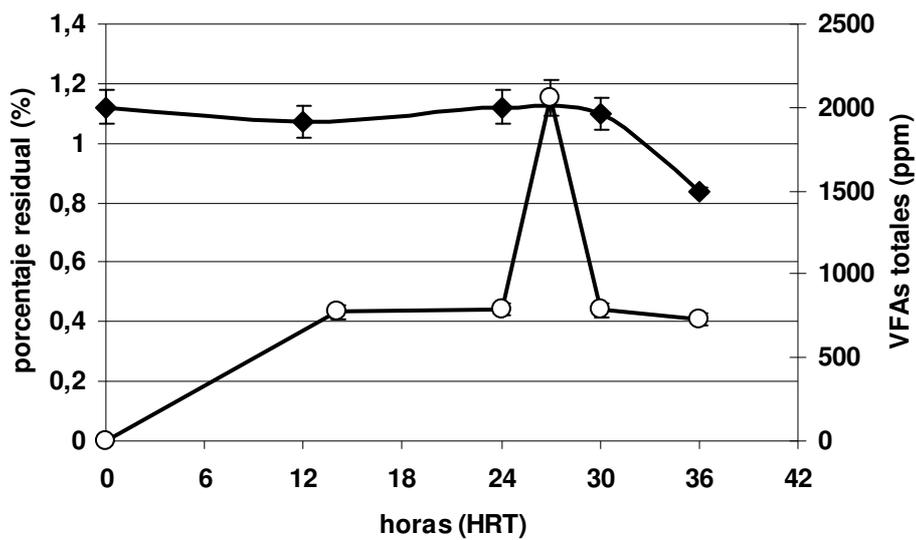


Figura 4.25. Evolución del contenido total de VFAs (o) y porcentaje residual de carbohidratos hidrosolubles durante el ensayo (■).

4.9.1 Resultados preliminares sobre crecimiento bacteriano en muestras de alpeorujo diluido y digerido anaeróticamente.

Las muestras diluidas de alpeorujo (20%, p/v) y sometidas a condiciones de anaerobiosis durante 27 h, fueron inoculadas con la cepa *Azotobacter vinelandii* UWD y mantenidas en aerobiosis (100 rpm, 28°C) durante 72h, al objeto de evaluar la capacidad de almacenamiento de bioplástico por parte de la cepa en un sustrato tan especial. Previo a dicho ensayo, se evaluó el crecimiento de la cepa en medios de alpeorujo diluido y digerido anaeróticamente para confirmar la ausencia de sustancias tóxicas en estos medios, que podrían limitar ó incluso inhibir el crecimiento y por lo tanto la producción de bioplástico.

En la siguiente figura se muestra la evolución del crecimiento de *Azotobacter vinelandii* UWD en medios de alpeorujo diluido y digerido anaeróticamente adicionado de la sal A ó de las tres sales (A, B y C) del medio de Burk. El recuento de microorganismos (expresado como Log UFC/ml) en ningún momento declinó, sino todo lo contrario, incrementó en 4 unidades logarítmicas tras 72 h de incubación, confirmando que el alpeorujo digerido anaeróticamente se mostraba como un excelente medio para el crecimiento de la cepa bacteriana.

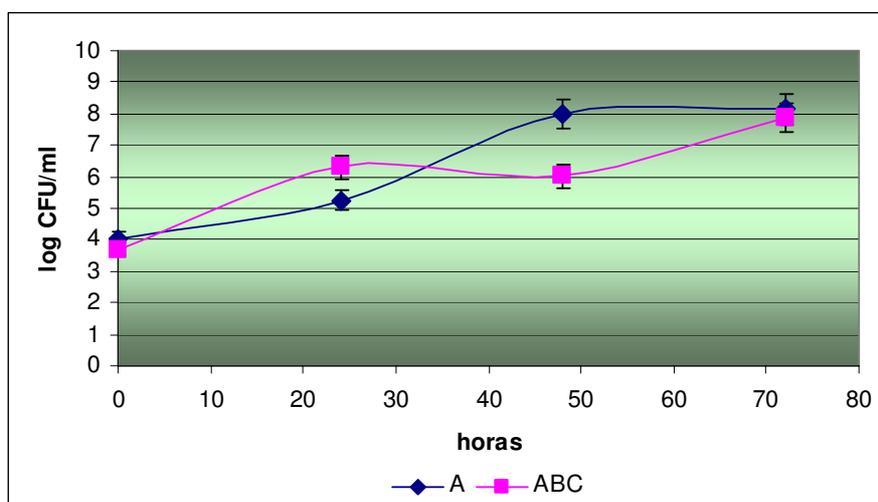


Figura 4.26. Crecimiento de la cepa *Azotobacter vinelandii* UWD en muestras de alpeorujo diluído (20% p/v) digerido anaeróticamente con las tres sales de medio Burk's (ABC) y con una sal (A) del medio Burk's

4.9.2 Producción del bioplástico utilizando como sustrato alpeorujillo diluido en proporción creciente (20-60% w/v) y digerido anaeróbicamente

Tras este primer ensayo, se evaluó la producción de bioplástico por parte de las 3 cepas objeto de nuestro estudio en medio de alpeorujillo digerido anaeróbicamente y diluido a distintas concentraciones.

En las siguientes figuras se muestra la producción de bioplástico obtenido en este medio por las cepas tras 72h de incubación en condiciones aeróbicas utilizando para ello incubadores con temperatura y agitación controlada (28°C y 150 rpm). Tal y como se desprenden de los datos mostrados en la primera figura, la cantidad de bioplástico sintetizado por *Azotobacter vinelandii* UWD es aproximadamente 9 veces mayor (0.06 g/L versus 0.54 g/L) que la obtenida por la misma cepa crecida en muestras de alpeorujillo diluido al 20% pero fresco. Por lo contrario las cantidades de PHAs producidas por *A. chroococcum* H23 y *A. vinelandii* 12387 en estas mismas condiciones fueron muy bajas, prácticamente inapreciables en el caso de *A. vinelandii* 12387 (datos no mostrados).

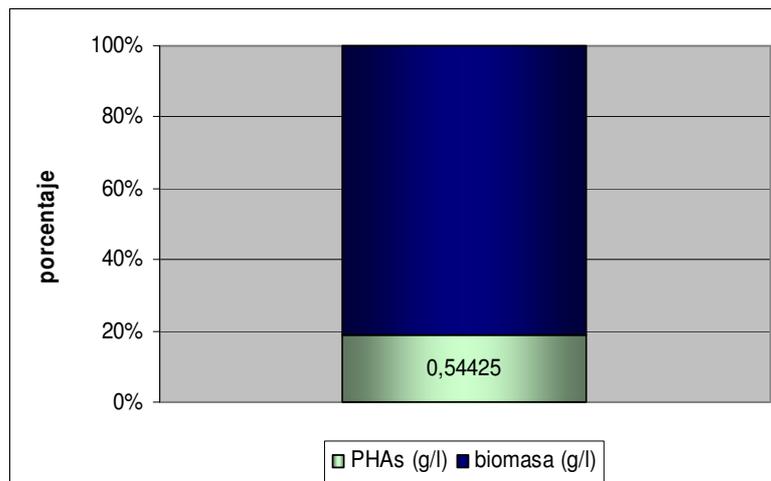


Figura 4.27. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujillo diluido al 20% y digerido anaeróbicamente

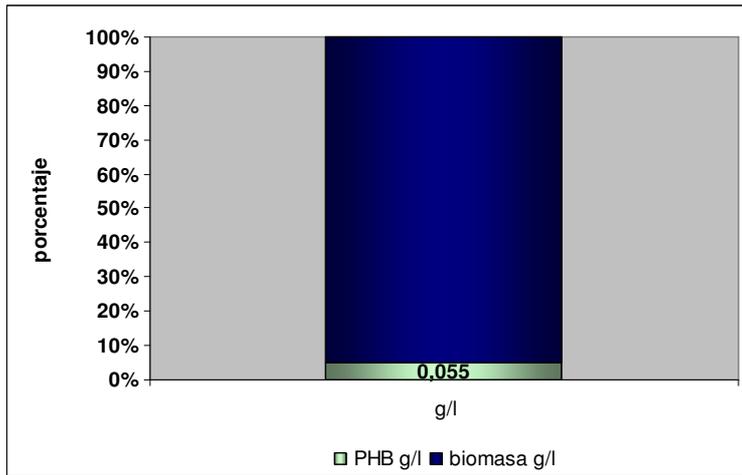


Figura 4.28. Producción de PHAs por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 20% y digerido anaeróticamente

A medida que las concentraciones del medio de alpeorujó digerido se incrementaron (40 y 60%), las producciones de PHAs por parte de las cepas bacterianas variaron, como se desprende de las siguientes Figuras.

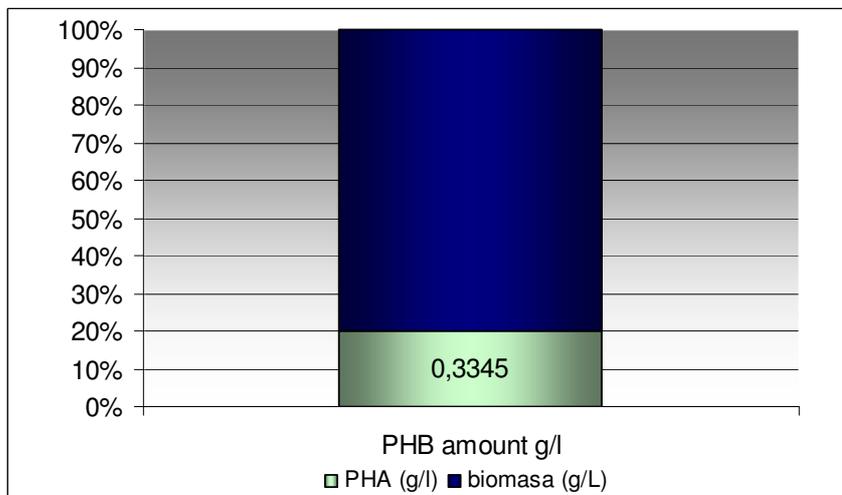


Figura 4.29. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujó diluido al 40% y digerido anaeróticamente

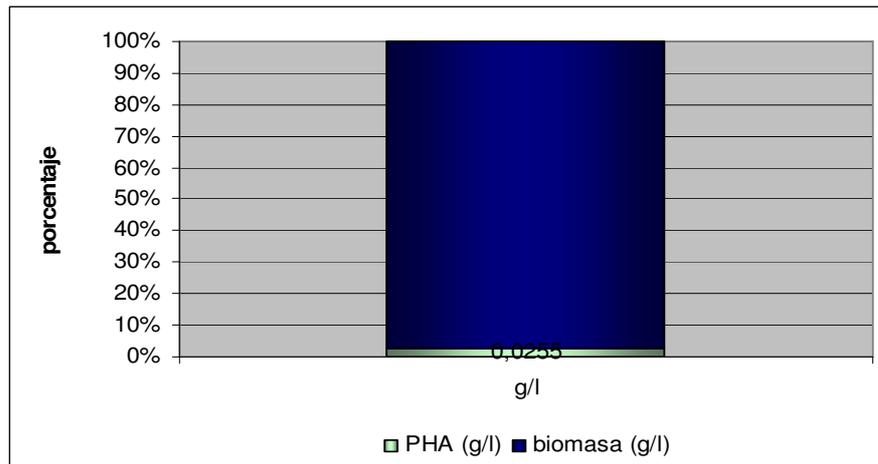


Figura 4.30. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* 12387 en alpeorujó diluido al 40% y digerido anaerómicamente

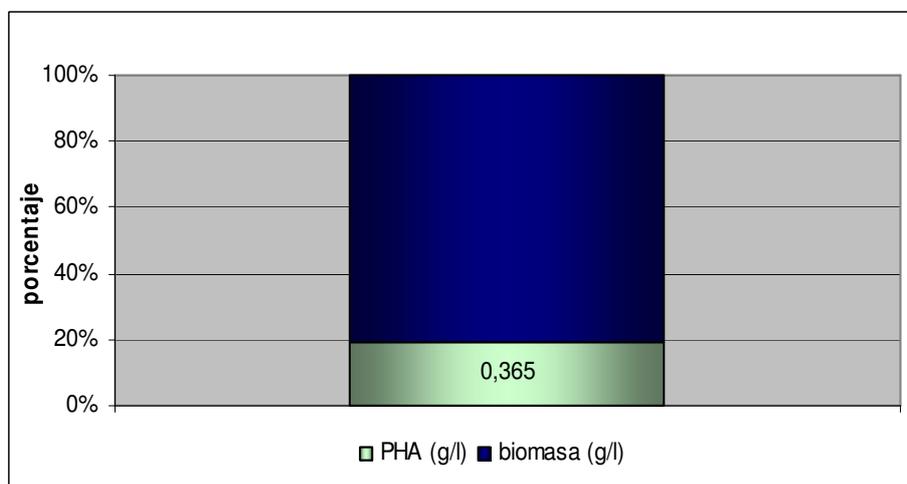


Figura 4.31. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujó diluido al 60% y digerido anaerómicamente

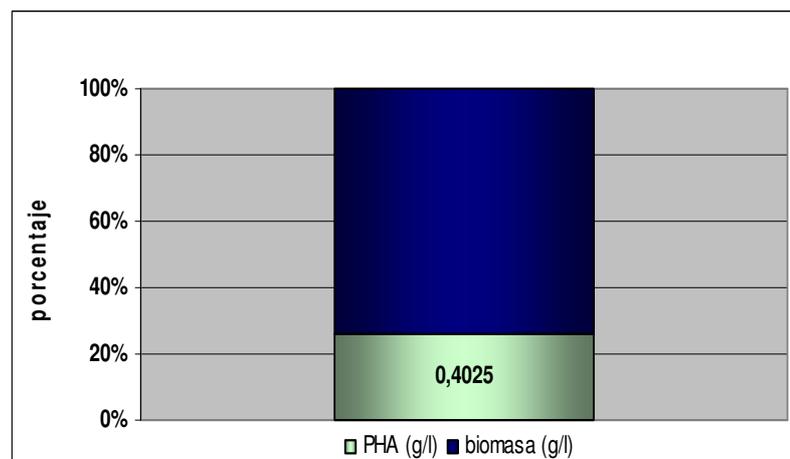


Figura 4.32. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* 12387 en alpeorujó diluido al 60% y digerido anaerómicamente

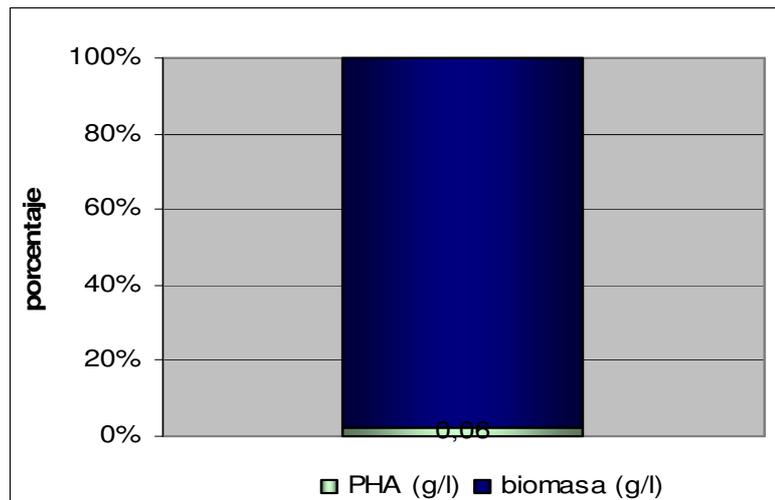


Figura 4.33. Producción de PHAs por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% y digerido anaerómicamente

4.10 Producción de PHAs en alpeorujó diluido y digerido anaerómicamente en presencia de micronutrientes

De manera paralela al estudio del incremento de las cantidades de sustrato sobre la producción de PHAs por parte de las cepas bacterianas, se procedió al estudio del efecto de la adición de micronutrientes (principalmente fuente de S para el centro activo de la tiolasa) (Rehm *et al.*, 2003) al medio de cultivo, sobre la producción de bioplástico.

Las producciones de PHAs por parte de las cepas en cada uno de los ensayos se muestran en las figuras siguientes.

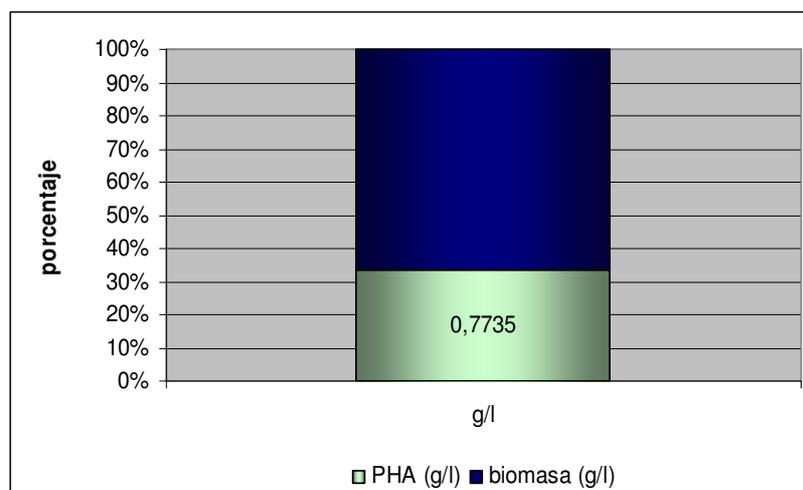


Figura 4.34. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorujó diluido al 40% digerido anaerómicamente con adición de micronutrientes

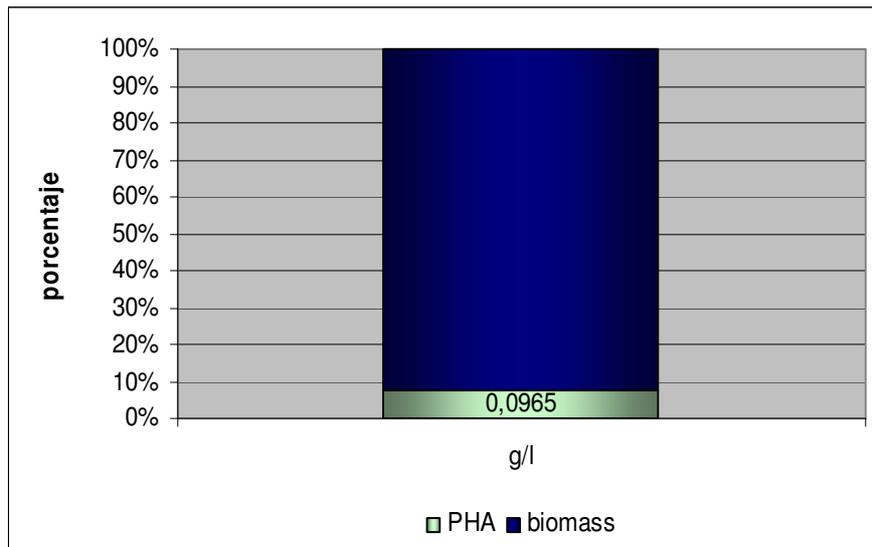


Figura 4.35. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* 12387 en alpeorujo diluido al 40% digerido anaeróbicamente con adicción de micronutrientes

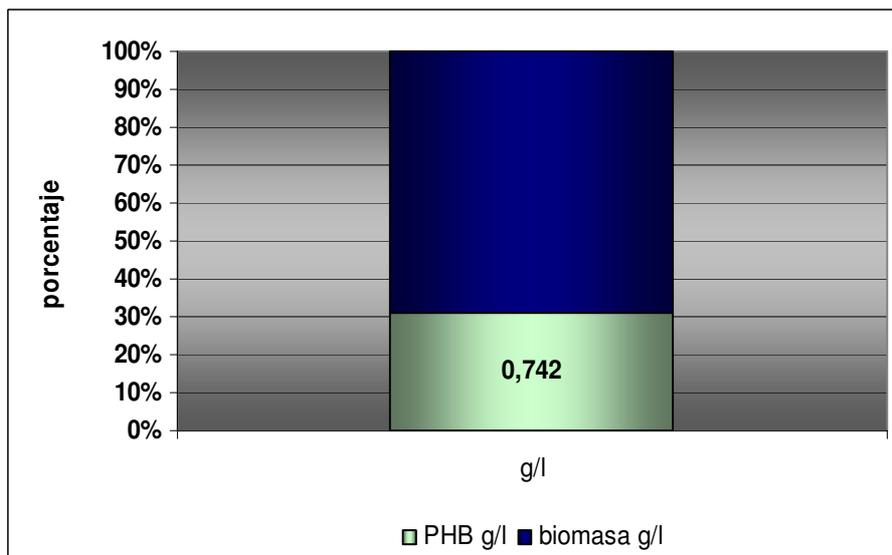


Figura 4.36. Producción de PHAs por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujo diluido al 40% digerido anaeróbicamente con adicción de micronutrientes

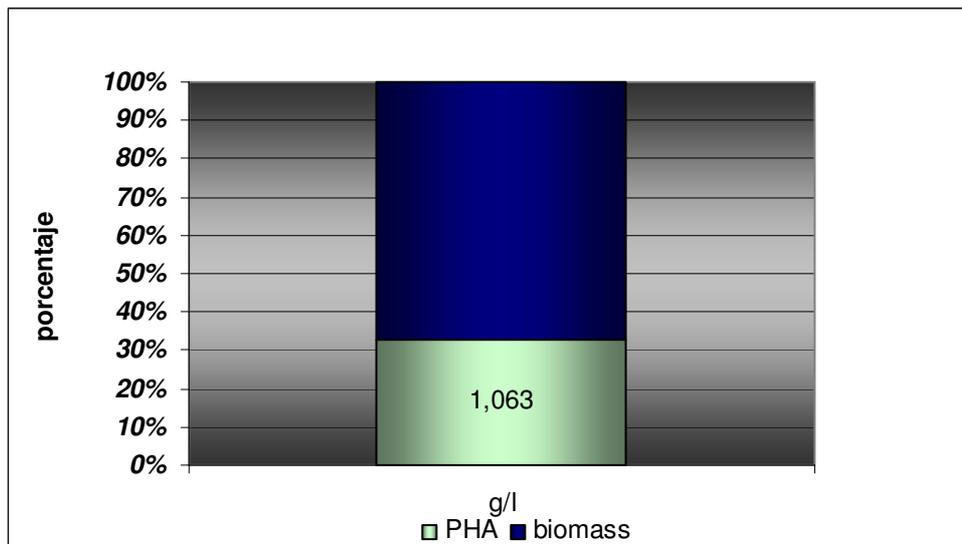


Figura 4.37. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* UWD en alpeorajo diluido al 60% digerido anaerómicamente con adición de micronutrientes

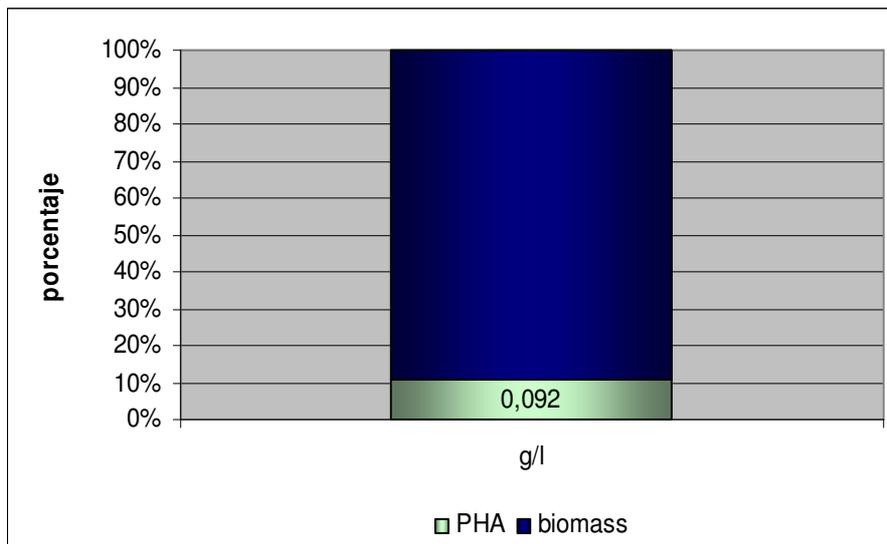


Figura 4.38. Producción de PHAs por *Azotobacter vinelandii* 12387 en alpeorajo diluido al 60% digerido anaerómicamente con adición de micronutrientes

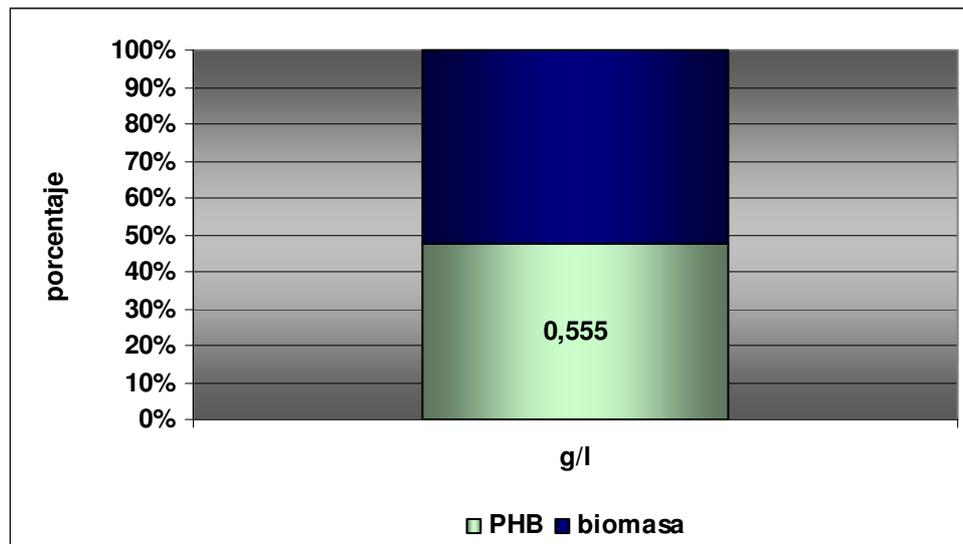


Figura 4.39. Producción de PHAs por *Azotobacter chroococcum H23* en alpeorujos diluidos al 60% digeridos anaeróbicamente con adición de micronutrientes

Tal y como se deduce de las anteriores figuras, es evidente el incremento de la producción de PHAs cuando los medios de cultivo se suplementaron con micronutrientes. El incremento fue del 220, 450 y 900 %, respectivamente cuando las cepas fueron *Azotobacter vinelandii* UWD, *Azotobacter vinelandii* 12387 y *Azotobacter chroococcum* utilizando en todos los casos medios de alpeorujos digeridos anaeróbicamente al 40%.

El valor máximo (1,063 g/L) de producción de PHAs se alcanzó cuando la cepa utilizada fue *A. vinelandii* UWD en muestras de alpeorujos digeridos al 60% tras 72 horas de incubación, lo que supuso un incremento de producción del 300%, y un porcentaje del 33% respecto al peso seco de la biomasa. Además cabe destacar que aunque la producción de PHAs por *A. chroococcum* H23 en alpeorujos digeridos al 60% con adiciones de micronutrientes fuera de 0,555 g/L, su porcentaje respecto al peso seco de la biomasa fue del 48%, siendo éste el máximo valor porcentual obtenido.

4.11 Producción de PHAs por parte de las cepas de *Azotobacter* en muestras de alpeorujos digeridos anaeróbicamente usando biorreactores

En base a los resultados obtenidos en los ensayos en *batch*, se plantearon nuevos ensayos utilizando para ello un biorreactor a escala de laboratorio. El objetivo principal de estos ensayos fue optimizar los resultados obtenidos y

replicarlos a mayor escala, bien como etapa necesaria para un mayor escalado, ó como elemento necesario para poder modificar los parámetros involucrados en la acumulación de PHAs.

Los resultados obtenidos usando como sustrato alpeorujo digerido anaerobicamente, esterilizado por filtración (Figura 4.40) e inoculado con un cultivo de *Azotobacter chroococcum* H23 (Figura 4.41), se muestran a continuación.

Las estrategias llevadas a cabo en los distintos ensayos estuvieron dirigidas por una parte al estudio del efecto del incremento del número de revoluciones por minuto (RPM) sobre la producción de PHAs y en contrapartida el efecto del incremento del volumen de trabajo sobre la oxigenación y en definitiva sobre el incremento en la producción de PHAs. Por último, se intentó aplicar la estrategia *famine and feast* en la cual y mediante la opción de *feed-batch* se renovara el sustrato después de haber mantenido condiciones de estrés metabólico, al objeto de seleccionar una subpoblación con supuesta mayor capacidad acumuladora en respuesta al déficit nutricional.



Figura 4.40. Esterilización por filtración del sustrato de alpeorujo digerido anaerobicamente



Figura 4.41. Biorreactor con inóculo selectivo de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% digerido anaerómicamente (300RPM)

4.11.1 Efecto de la aireación (como incremento de las revoluciones por minuto, RPM) sobre la producción de PHAs usando como sustrato alpeorujó digerido anaerómicamente y diluido al 60%

Tal y como se ha comentado anteriormente, el primer factor que se consideró fue la variación en la aireación (como incremento de las RPM) para garantizar una óptima difusión del oxígeno. Los primeros ensayos se realizaron con una agitación de 300 RPM y un volumen de trabajo de 2L. El valor absoluto de la producción de PHAs por parte de la cepa *A. chroococcum* H23 bajo estas condiciones de cultivo correspondió a 1,32 g/L (Figura 4.42).

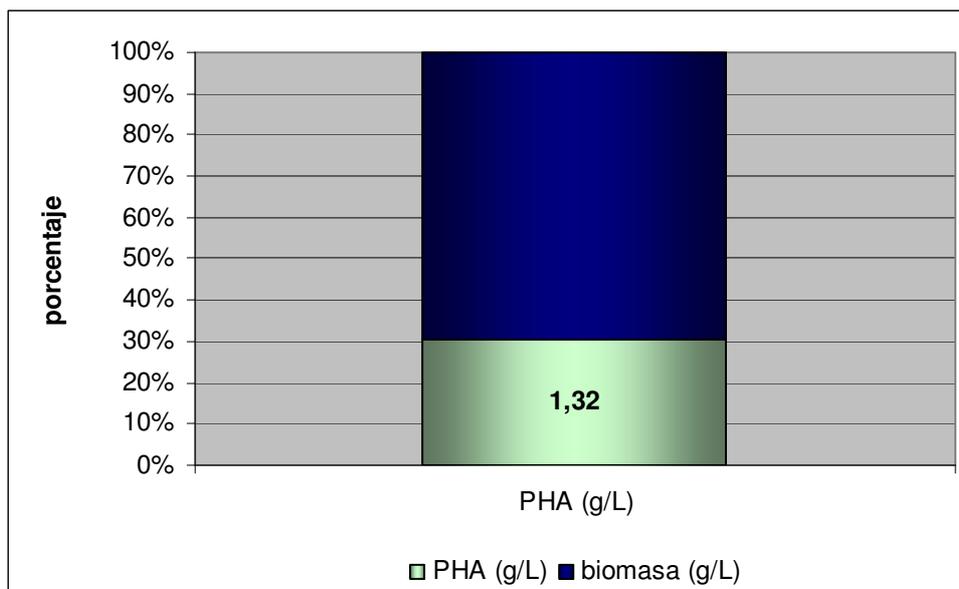


Figura 4.42. Producción de PHAs en biorreactor por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% digerido anaeróticamente (aireación: 300RPM)

En un segundo ensayo, se incrementó la aireación (500 RPM) y se disminuyó el volumen de trabajo hasta 1,5 L. La cantidad de PHAs obtenida bajo estas condiciones (Figura 4.43), fue la mitad de la producción obtenida en el ensayo anterior (300 RPM y 2 L).

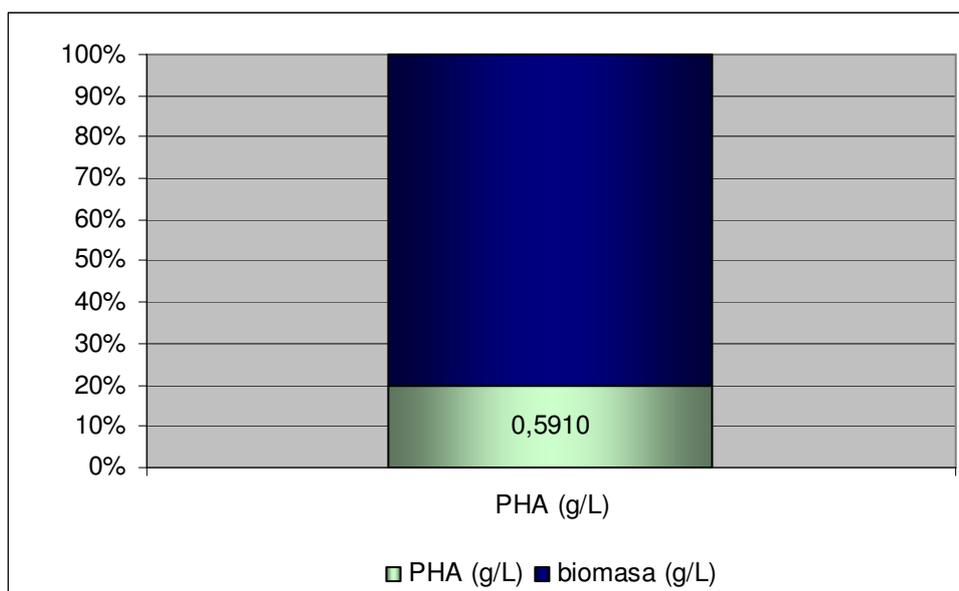


Figura 4.43. Producción de PHAs en biorreactor por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% digerido anaeróticamente (aireación: 500RPM)

La cantidad de PHAs producida por la cepa *A. chroococcum* H23 con 500 RPM y 2L de volumen total fue despreciable (datos no mostrados).

La siguiente figura muestra la evolución de los parámetros pH y oxigenación obtenidos en el ensayo de producción de PHAs por parte de *A. chroococcum* H23, sobre muestras de alpeorajo digeridas anaerobicamente y diluidas al 60% sometidas a una agitación de 300 RPM, siendo el volumen total de trabajo de 2L. Los datos reportados hacen referencia a las últimas 48 horas de ensayo.

Las curvas mostradas muestran gráficamente lo ocurrido en el interior del biorreactor debido al metabolismo de la cepa en crecimiento; se observa la disminución de la difusión del oxígeno debido al incremento de la biomasa en crecimiento y al mismo tiempo se observa una ligera alcalinización del medio que es paralela a la curva del oxígeno; ese último parámetro vuelve a bajar ligeramente en la fase final del ensayo correspondiendo a la fase estacionaria de la biomasa.

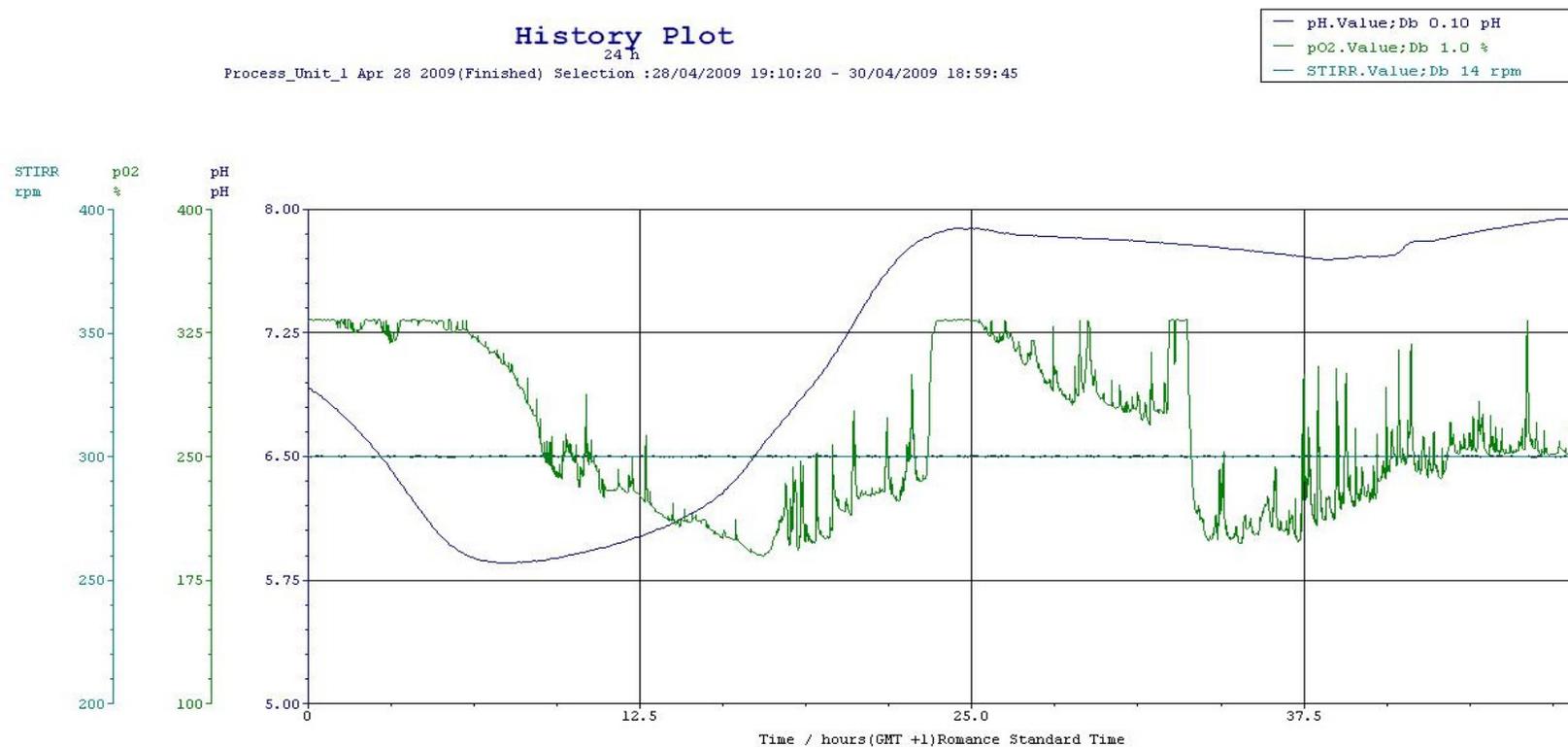


Figura 4.44. Ultimas 48 horas de las curvas de los diferentes parametros en biorreactor con alpeorujos al 60% digerido anaerobicamente (300 RPM y 2L de volumen de trabajo) inoculado con *Azotobacter chroococcum*

4.11.2 Efecto de la estrategia de "famine and feast" en la producción de PHAs usando como sustrato alpeorujó digerido anaerobicamente y diluido al 60%

Al objeto de incrementar la producción de PHAs por parte de *A. chroococcum* H23 en muestras de alpeorujó digerido anaerobicamente y diluido al 60% y mantenidas en condiciones de aireación correspondientes a 300 RPM y volumen total de trabajo de 2L, se evaluó la estrategia denominada *famine and feast* en la que se alternaron distintas condiciones: fase de exceso de fuente de carbono, como sustrato fresco (*feast*) (Figura 4.45) seguida de una fase de limitación nutricional (*famine*) en la que la biomasa se mantuvo en un medio con una concentración del 10% de la concentración inicial de sustrato durante 12 horas, tras la cual seguiría una nueva adición de sustrato fresco (alpeorujó digerido anaerobicamente y diluido al 60%) (Figura 4.46).

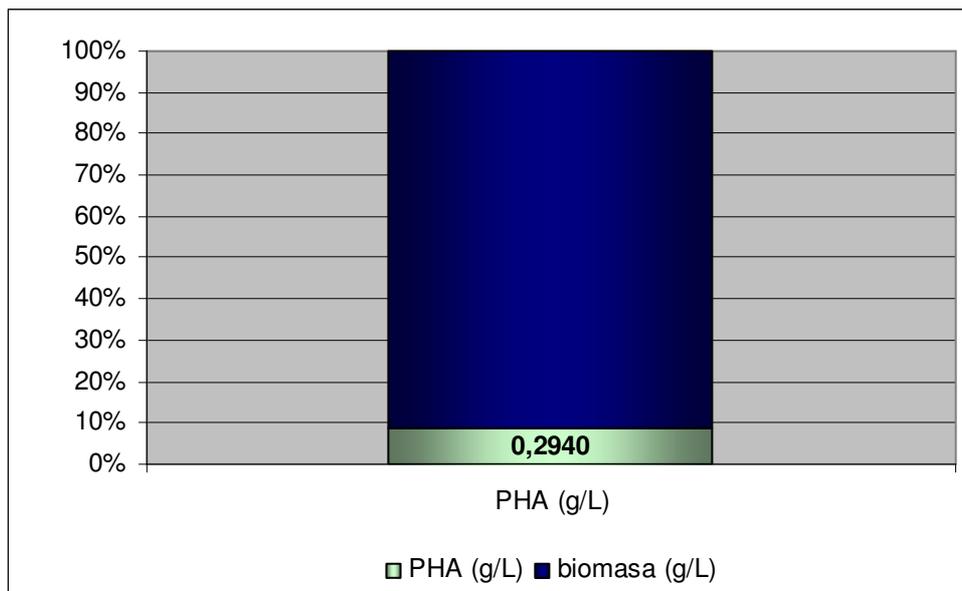


Figura 4.45. Producción de PHAs en biorreactor por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% digerido anaeróticamente. 300RPM y 2L de volumen total (I fase: feast)

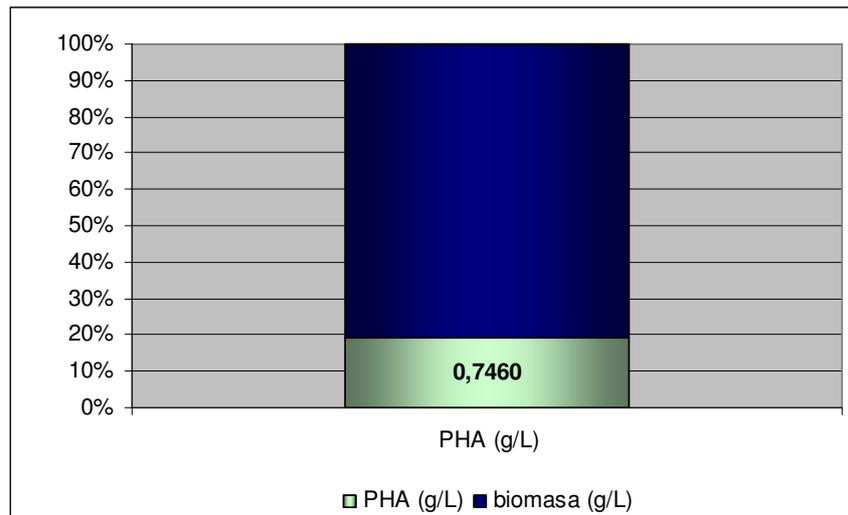


Figura 4.46. Producción de PHAs en biorreactor por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% digerido anaerómicamente. 300RPM y 2L volumen total (II fase: *feast after famine*)

La producción de PHAs se duplicó en la segunda fase del ensayo, esto es, bajo unas condiciones de adición de sustrato fresco a una biomasa desarrollada y adaptada a un medio de alpeorujó digerido al 60%.

En la siguiente figura se muestran las producciones de PHAs obtenidas en el biorreactor Biostat® Plus por parte de la cepa *A. chroococcum* H23 inoculada en medios de alpeorujó diluido al 60% bajo distintas condiciones de agitación, volumen y condiciones nutricionales. Como se observa, la mayor producción fue obtenida cuando la cepa se mantuvo en medios de alpeorujó (2L) con una agitación de 300 RPM.

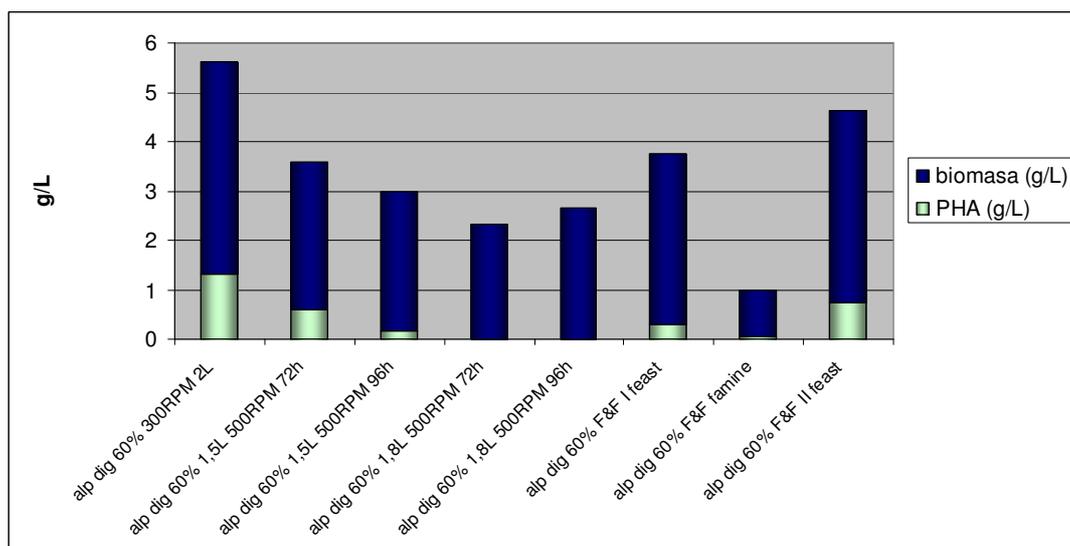


Figura 4.47. Producción de PHAs en biorreactor por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpeorujó diluido al 60% digerido anaerómicamente (diferentes condiciones)

4.12 Producción de PHAs en planta piloto. Estrategias de escalado

En el desarrollo de la presente investigación, el doctorando realizó una estancia de 3 meses de duración en el Laboratorio de Investigación Industrial-*LABOR srl* bajo la supervisión del Prof A. Chianese, catedrático del Departamento de Ingeniería Química Materiales y Medio Ambiente de la Universidad de Roma-*La Sapienza* en el que se iniciaron los experimentos para el escalado del proceso a una planta piloto con reactor de 30 L de capacidad y cuyos resultados se exponen a continuación.

Hay que resaltar el hecho de que en Italia, el sistema de extracción del aceite de oliva sigue siendo en su mayoría, un proceso de tres fases con adición de agua y generación de un residuo líquido conocido como *alpechín* ó OOMWW (*olive oil mill wastewater*), por lo que los estudios sobre las estrategias de escalado fueron llevadas a cabo con este residuo.

4.12.1 Adaptación de las cepas al sustrato en el proceso de escalado

El primer paso en el proceso de escalado consistió en obtener un inóculo adaptado a las condiciones especiales del residuo. Este hecho se alcanzó sustituyendo el medio químicamente definido (medio Burk's) por medios adicionados con alpechín fresco. Los experimentos fueron desarrollados utilizando la cepa bacteriana *A. chroococcum* H23 cuyo crecimiento y producción de PHAs en medios de alpechín ya fue probada por diversos autores (Martínez-Toledo *et al.*, 1995, González-López *et al.*, 1996, Pozo *et al.*, 2002).

La figura 4.48 muestra el crecimiento de la cepa elegida en medio Burk y en medio adicionado de alpechín al 60% sin esterilizar, en reactores de 2,5 L de volumen total. Las sucesivas adaptaciones a un incremento creciente de sustrato fresco de alpechín al 60% se vieron reflejadas por crecientes valores de biomasa, hasta alcanzar una producción de inóculo en cantidad satisfactoria para poderlo utilizar en la fase sucesiva de escalado.

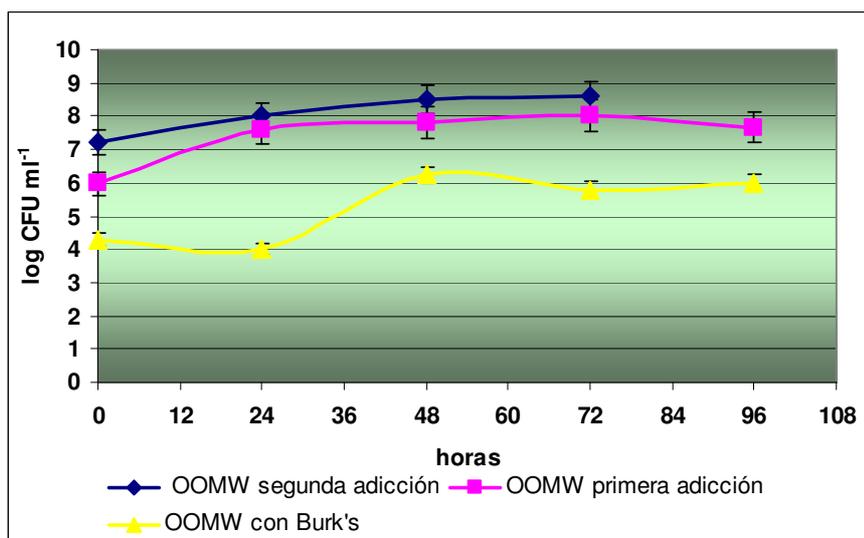


Figura 4.48 Adaptación de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v sin esterilizar (PREINÓCULO)

La siguiente etapa consistió en inocular y monitorizar el crecimiento de la cepa en planta piloto; primera en un volumen inicial de 10 L, seguida de un volumen final de 30 L mediante la adición *feed-batch*. Las siguientes figuras muestran el crecimiento de la cepa (Log UFC/mL) tanto en el reactor de 10 L como en el de 30 L de capacidad.

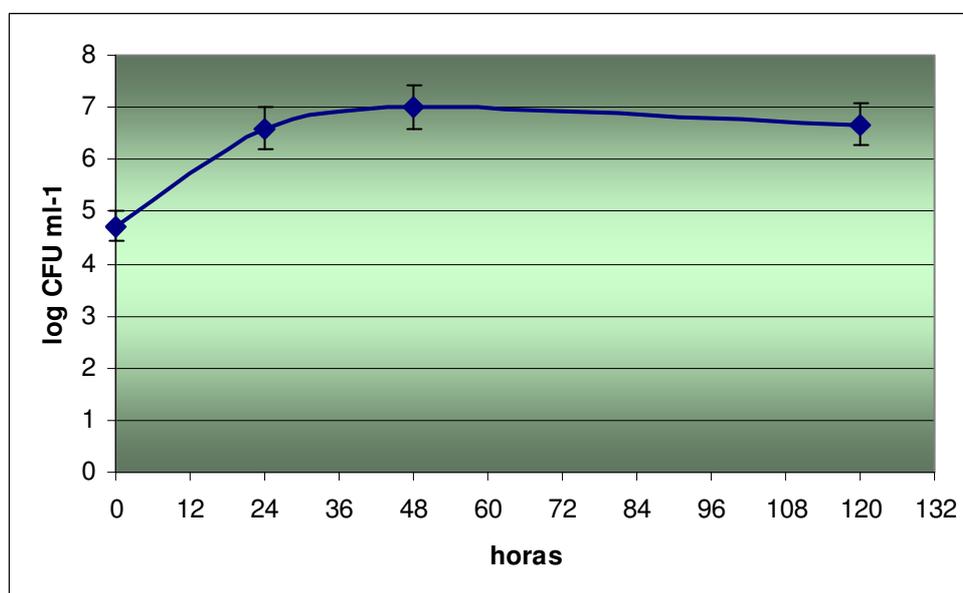


Figura 4.49 Crecimiento (Log UFC/mL) de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v sin esterilizar (PLANTA PILOTO 10L)

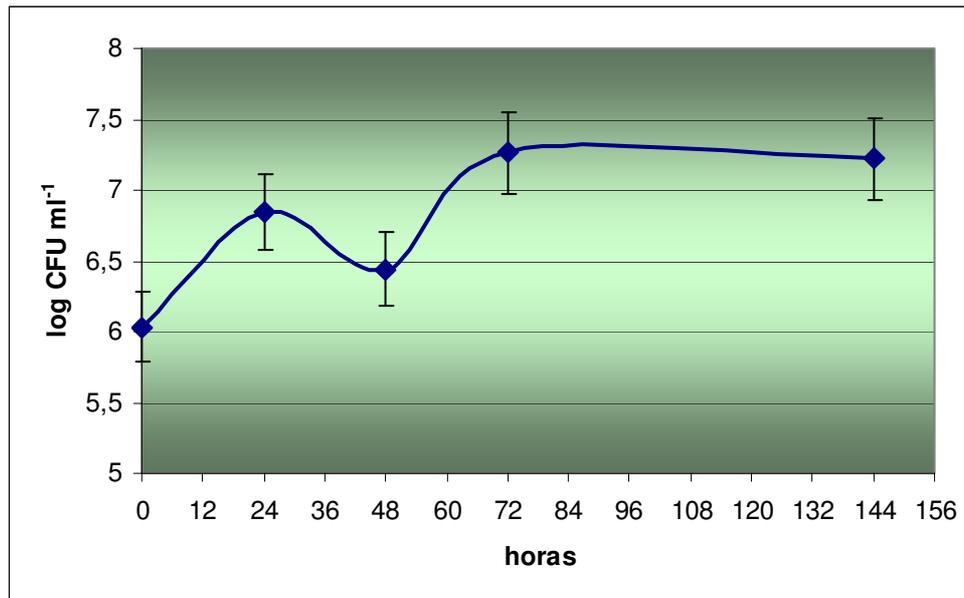


Figura 4.50 Crecimiento (Log UFC/mL) de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v sin esterilizar (PLANTA PILOTO 30L)

En la siguiente Figura se muestran las curvas de crecimiento de la cepa *A. chroococcum* H23 en el proceso del inicio del escalado.

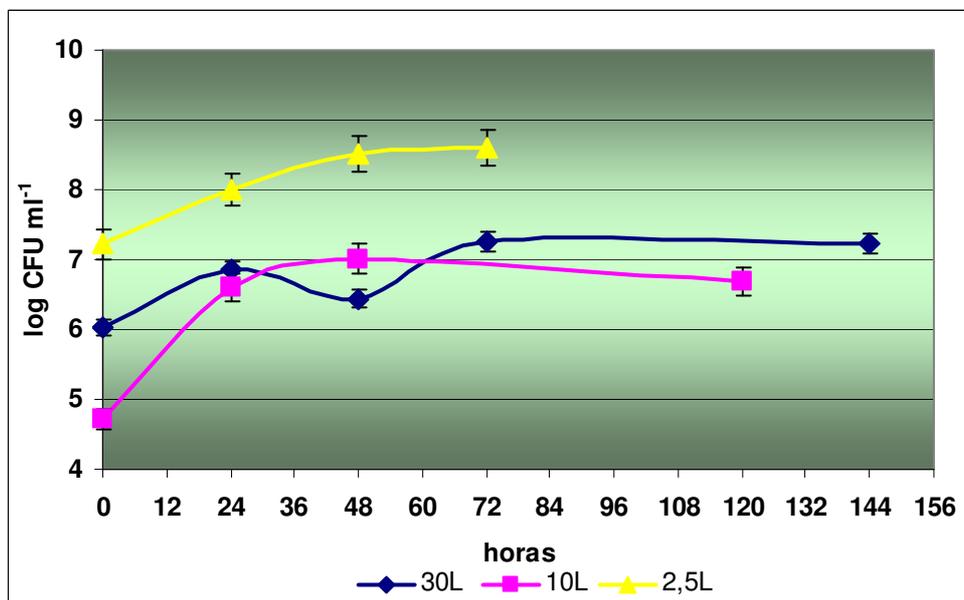


Figura 4.51. Crecimiento (Log UFC/mL) de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v sin esterilizar (de 2,5 hasta 30L)

Como se observa en la Figura 4.51 los máximos valores de biomasa se obtuvieron en la fase inicial de crecimiento del inóculo en un volumen de trabajo de 2,5L.

Los recuentos en placa (medio Burk sólido) realizados (Figura 4.52) evidenciaron que durante esta primera fase (volumen de trabajo de 2,5L), el inóculo utilizado se mantuvo con un cierto grado de pureza al menos durante las primeras 72h de incubación. Tras esta fase, el inóculo fue transferido a mayores volúmenes (10 y 30L) observándose la presencia de otras poblaciones microbianas en mayor proporción (Figura 4.53)

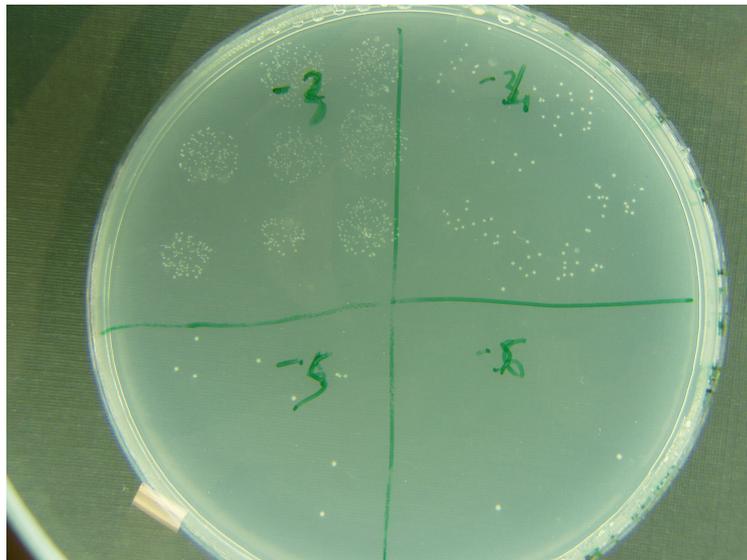


Figura 4.52. Recuentos de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v – población sencilla (2,5 L)

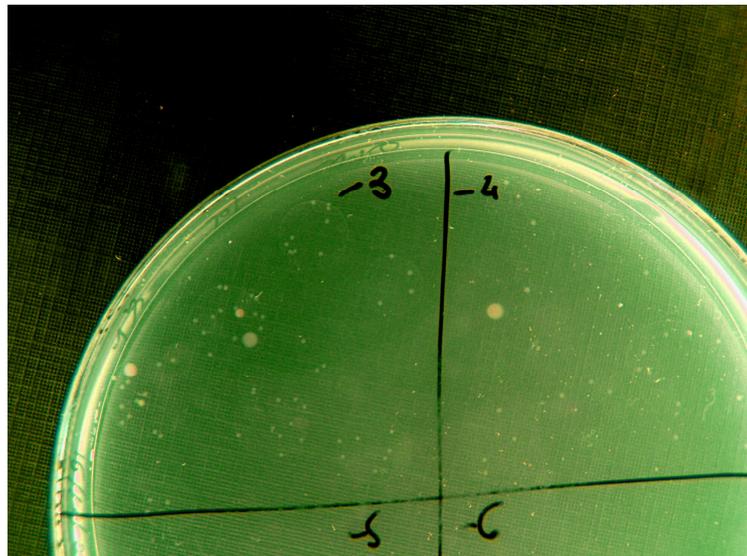


Figura 4.53. Recuentos de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v – población contaminada (30L)

4.12.2 Optimización del sustrato para la producción de PHAs en planta piloto

La siguiente figura muestra la producción de PHAs por parte de la cepa *A. chroococcum* H23 en el proceso de escalado. El sustrato utilizado para la producción de PHAs fue alpechín al 60% v/v, y la cantidad producida s por parte de la cepa llegó a alcanzar un valor de 0,613 g/L en un volumen de trabajo de 30L, máximo volumen permitido para la planta piloto diseñada y construida.

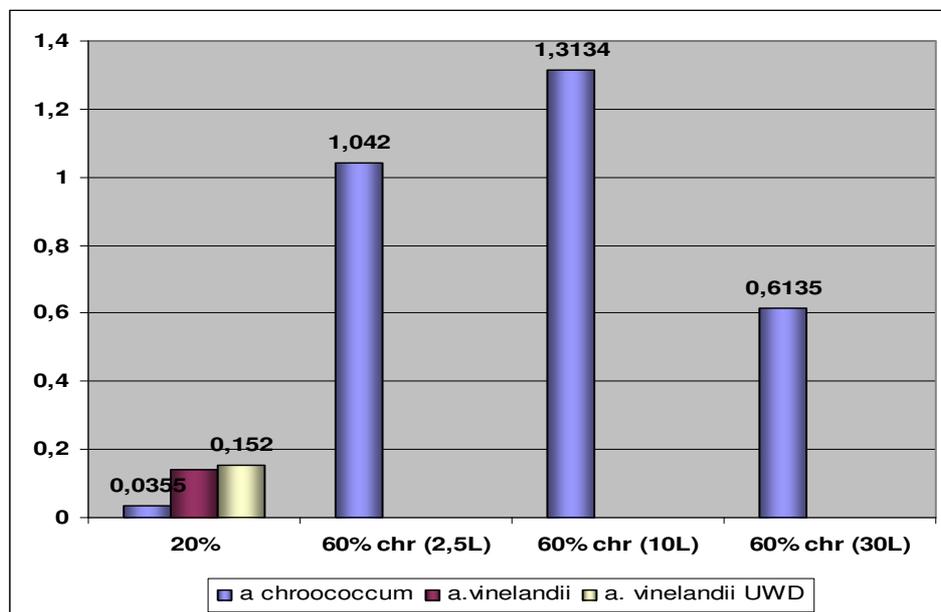


Figura 4.54. Producción de PHAs por *Azotobacter* sp en medios de alpechín sin esterilizar al 60%, durante el proceso de escalado hasta planta piloto

Considerando las bajas producciones obtenidas con estas condiciones de cultivo, se planteó usar como sustrato para la producción de PHAs, alpechín diluido al 30%. El crecimiento de la cepa (Log UFC/mL) en este nuevo medio se muestra en la Figura 4.55. La producción de PHAs por parte de la cepa creciendo en el biorreactor de 30 L tras 72 horas en ese sustrato de incubación fue ligeramente mayor (0,650 g/L) que la obtenida en medios de alpechín diluido al 60%.

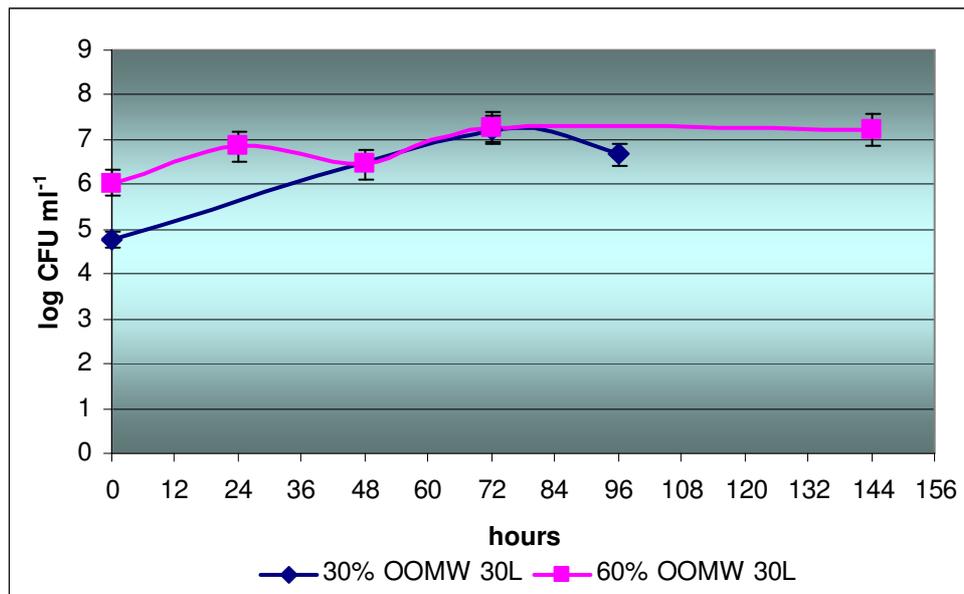


Figura 4.55. Curvas de crecimiento de *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechín fresco 60% v/v y alpechín fresco 30% (30L)

4.13 Caracterización de los diferentes biopolímeros obtenidos.

Los diferentes biopolímeros se caracterizaron a través de Resonancia Magnética Nuclear, (¹H-NMR) y demostraron ser PHB (poli-β-hidroxibutirato) en todos los ensayos realizados, tanto a nivel de laboratorio (*batch* y biorreactor) como a nivel de planta piloto. Las Figuras 4.56-4.59 muestran los espectros obtenidos tanto del producto puro suministrado por Sigma[®] como de las muestras de bioplástico sintetizadas por las cepas bacterianas objeto de nuestro estudio.

Las menores concentraciones de VFAs respecto a los azúcares hidrosolubles presentes en las muestras de alpeorujó digerido, consideradas como sustratos para la síntesis de PHAs, no garantizaron la incorporación en el proceso de polimerización de los precursores necesarios para la síntesis de heteropolímeros.

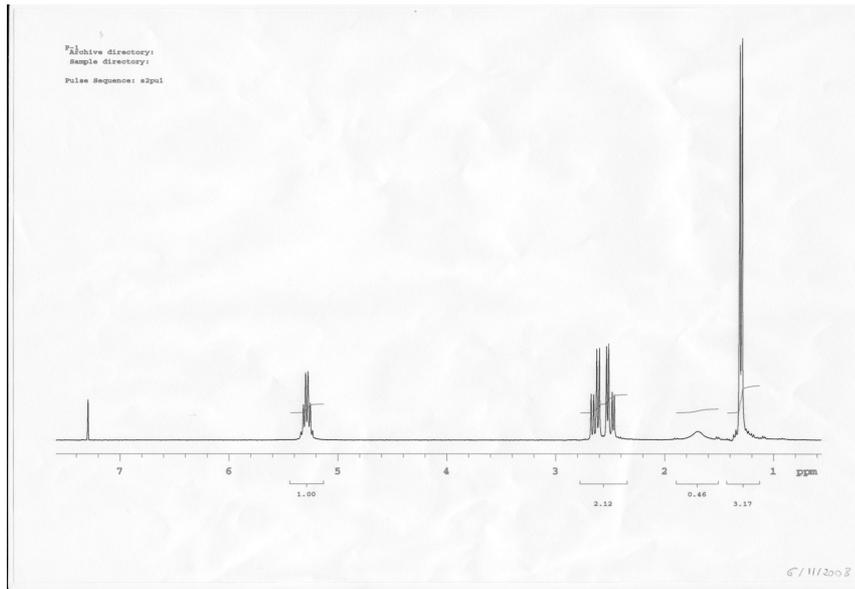


Figura 4.56. Espectro de RMN del biopolímero (PHB grado: producto comercial)

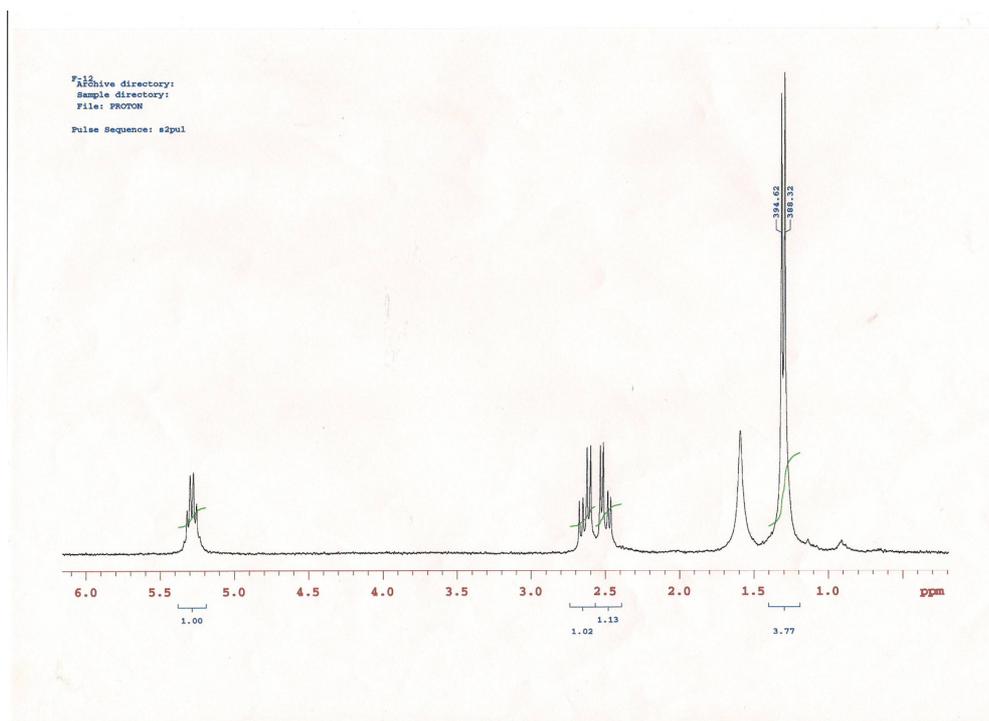


Figura 4.57. Espectro de RMN del biopolímero (PHB) obtenido en alpeorujó digerido 60% por *Azotobacter vinelandii* UWD.

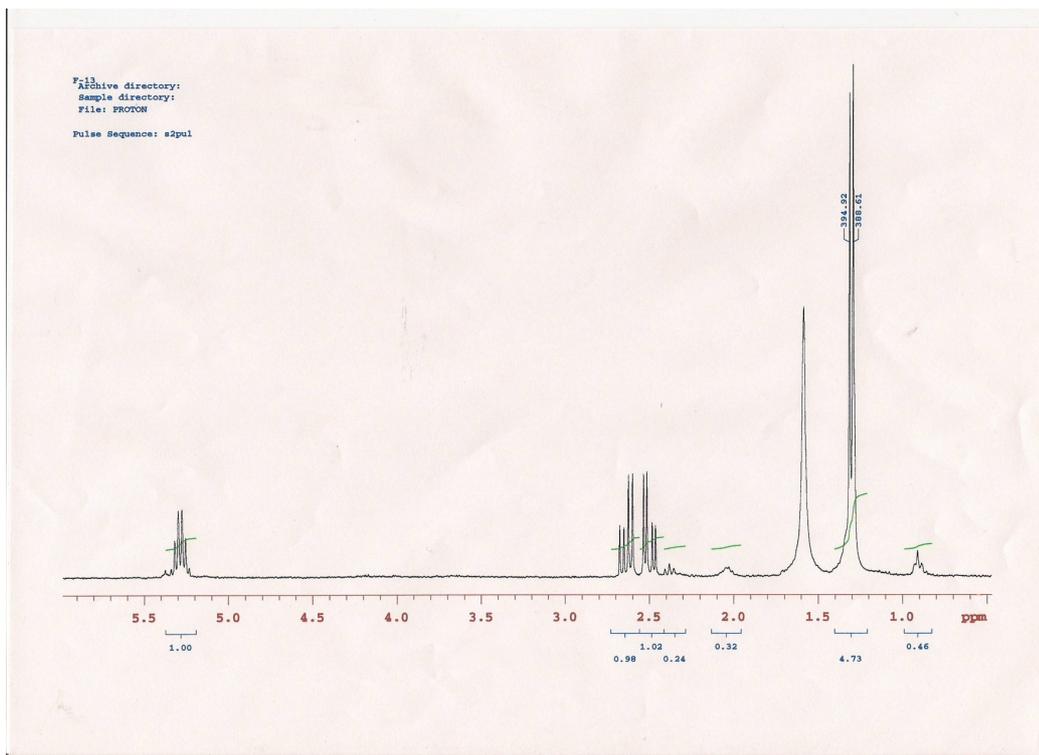


Figura 4.58. Espectro de RMN del biopolímero (PHB) obtenido en alpeorujó digerido 60% por *Azotobacter vinelandii* 12387.

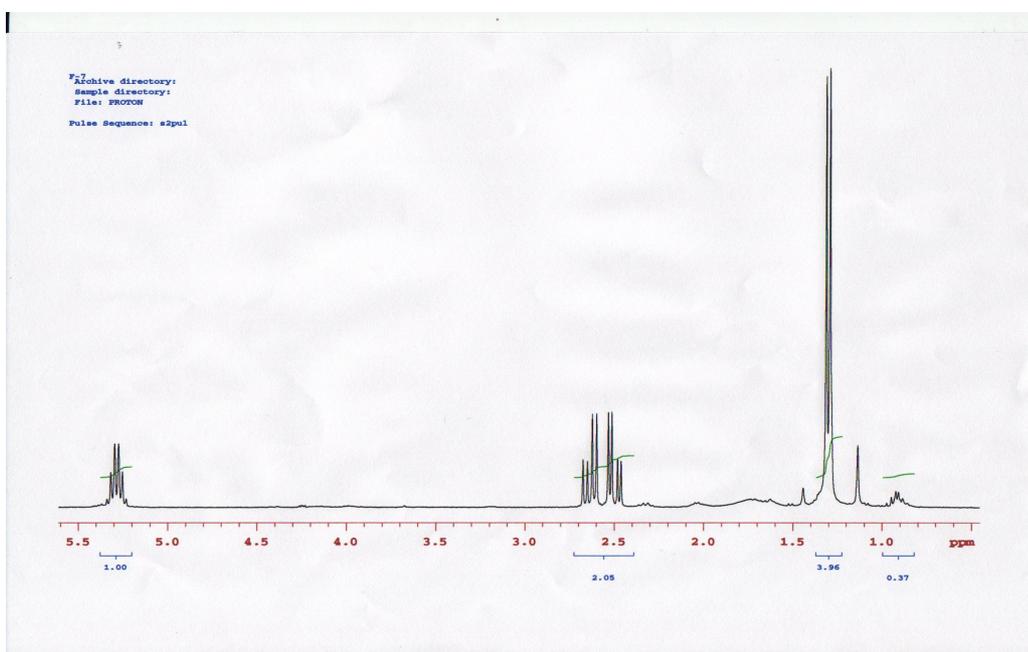


Figura 4.59. Espectro de RMN del biopolímero (PHB) obtenido en alpeorujó digerido 60% por *Azotobacter chroococcum* H23.

4.14 Bioensayo de toxicidad (MICROTOX®)

El sistema Microtox® es un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC₅₀) (Onorati *et al.*, 2004).

La Tabla 4.2 resume los resultados obtenidos tras la aplicación de este bioensayo a muestras de alpeorujos sometidas a distintos tratamientos. Al objeto de comparar los resultados, se incluyeron en las determinaciones, muestras de alpeorujos fresco y digerido anaerobicamente sin inocular con las cepas bacterianas productoras de PHAs.

En el caso del análisis de muestras de alpeorujos fresco, la inoculación de éstas con la cepa *A. vinelandii* UWD, mostró una patente reducción en las unidades de toxicidad, pasando éstas de 110,1 a 25,86 (75% de reducción).

Similares valores de reducción en las unidades de toxicidad fueron registrados en los ensayos en *batch* en los que la cepa bacteriana (*Azotobacter vinelandii* UWD) creció en medios de alpeorujos digerido al 60% durante 72h, siendo las producciones de PHAs en estas condiciones las máximas registradas (Figura 4.37).

Los datos de toxicidad (como EC₅₀) obtenidos de las muestras de alpeorujos digerido anaerobicamente, inoculadas con *A. chroococcum* H23 y dispuestas en biorreactores bajo distintas condiciones (RPM y volumen total de trabajo), no permitieron determinar con exactitud el efecto de la aireación y concentración de sustrato sobre la toxicidad de las muestras. La cepa más acumuladora de PHAs es por lo tanto la responsable de la mayor reducción de toxicidad en el residuo.

Tratamientos	EC ₅₀ (%)	Unidades de Toxicidad
Alpeorujos fresco 60% sin inocular	0,91	110,1
Alp fresco 60% (<i>A. chroococcum</i> H23)	1,67	59,74
Alp fresco 60% (<i>A. vinelandii</i> UWD)	3,86	25,86
Alpeorujos digeridos 60%		
Alpeorujos dig 60% 300 RPM 2L (Biorreactor)	1,19	83,65
Alp dig 60% 500 RPM 1,5L (72 h)	1,97	50,76
Alp dig 60% 500 RPM 1,5L (96 h)	2,34	42,73
Alp dig 60% 500 RPM 1,8L (72 h)	2,49	40,15
Alp dig 60% 500 RPM 1,8L (96 h)	1,49	66,69
Alp dig 60% 500 RPM 1,8L (Famine and Feast)	1,11	89,88

Alpeorujó digerido 60% (Batch)	1,01	99
Alp digerido 60% (A. vinelandii UWD 72 h)	3,58	27,86
Alp digerido 60% (A. vinelandii UWD 96 h)	3,31	30,19
Alp digerido 60% (A. vinelandii 12387 72 h)	1,02	98,17
Alp digerido 60% (A. vinelandii 12387 96 h)	2,20	45,42

Tabla 4.2. Resultados del ensayo Microtox (EC_{50} y unidades de toxicidad) aplicado a distintas muestras de alpeorujó objeto de esta investigación.

5 Discussion

The two phase olive oil mills wastewaters (TPOMW) represents a compound of concern, limited especially in a three-monthly period in the year (october-december). The importance of the pollution come from its volume values (5 million of Tonns yearly). Many possibilities of treatment have raised in the last years, especially to prevent a habitual practise: the soil discharge.

The easier way of treatment is keeping the waste in controlled ponds, for sun-driven photo-oxidation. This should be avoided, principally for bad smelling effects.

Two viable systems useful as treatments, actually, are: to burn into a cogeneration plant or utilize it for generating compost. Both of them are limited in their effects. The combustion is hardly to maintain and need very high temperatures for eliminate the high humidity content; The composting is slowly obtained and contributing to increase the greenhouse emissions, especially for the maturation process (Sanchez-Monedero *et al.*, 2010); in addition these great volumes need wide facilities for let maturing the substrate. A different solution for obtaining a efficient treatment of the TPOMW is therefore needed. This solution could be suggested by a green chemistry approach.

An oriented green chemistry that find viable solutions, needs in particular, to base its success, in taking advantage of zero cost substrates. This is strictly related to pass between eco-sustainable steps along the total process. In this framework the needing of using waste substrate as a resource is decisive and treating it eco-efficiently, in order to achieve a bio-product of interest as an added value, is determinant.

Our substrate of study is very complex, especially in its composition, that make it a hardly biodegradable substance.

The wide phytotoxicity of the TPOMW is due to the polyphenolic fraction (Wang *et al.*, 2002), especially for the reduction of the roots extension. So a way to treat this waste necessarily passes between a step that could mineralize, or at least hydrolyse this more recalcitrant fraction. A key factor of the bioprocess is the fact that such treated substrate should be employed as the starting source for obtain the bio-product of interest; in our case: biopolymers (in form of polyhydroxyalkanoates). These biopolymers had raised interest since they could represent an alternative to thermoplastics. Especially their first strategic value is inside their way of production. In facts they are produced with a fermentation strategy, with a bacterial population, and not compete with land use, as the bioplastics crops do.

Two main factors are important when sustainable and competitive PHAs production is considered, and they are: efficient separation technology (Huang *et al.*, 2008) and organic and integrated scheme of biorefinery approach for evaluating every added value of the global biotechnological process. The first one is a merely technical factor, but determinant; the second is an organic and LCA driven approach that could really make the difference between considering sustainable or unsustainable a bioprocess (Harding *et al.*, 2007); the result coming from this difference would be, therefore, the potential of selling it into the market. The market is obviously the main guideline for an efficient PHAs achievement. Its potential was in terms of 1 million of tonn/year for the 2010. Even if the gross production of this biopolymers were due to crops driven biopolymers. This last sector has entered very quickly in a vicious circle, where a major production of a sustainable bio-product lead to an intrinsic paradoxical unsustainability of this product for the market extension, similar to the case explained by (Ericsson *et al.*, 2006) for biomass as bioenergetic crop potential in the European Community. The main negative issues that an agricultural sector that use part of its land potential in biomass derived biotechnological no-food bio-products could generate, even if with a food-first approach, are mainly two: loss of biodiversity proportional to the healthy of the crops for different purposes than food (de Wit *et al.*, 2010) and the unfair situation that lead to commercialization of GHG emissions and crop bio-products with social disequilibrium. (de Wit *et al.*, 2010). All these factors are excluded in a PHAs production from wastewater substrates and contribute greatly to improve the effective sustainability of this bioplastics model production.

In a LCA complete study (Harding *et al.*, 2007) this is particularly underlined; in facts the PHB biopolymer is effectively competitive against the two main thermoplastics polymer (polyethylene and polypropylene); this is specially the case because of the consideration of all the factor that are included in an effective sustainable production.

Even more complete is the study of (Dangelico *et al.*, 2010) where all the economic sector it is weighted as much as possible for its really green aspect; whom also where already established in the guideline for the research priorities, inside the European Community, already fifteen years ago by (Mangan *et al.*, 1995).

As regards energy requirements the PHB production is seen at least twenty percent value of the PE and PP production needings (Harding *et al.*, 2007). This is again halved if raw materials substrate is utilized (Harding *et al.*, 2007) and in particular if it is a benefit from a zero cost substrate.

Furthermore when referring to market a factor that should be considered is the substitution potential of existing thermoplastics polymer. A complete study made by (Chanprateep *et al.*, 2010) reveals that, the PHB production is cost competitive, (with little improvement) already now. Its substitution potential vary from already available bio-medic devices to agricultural mulching. Moreover if it is considered that already a ten percent of electronic devices have substituted its components with bioplastics and plastics bags/package it is already substitutable with bioplastics polymers, it is easy to have a rapid glance to the bioplastics effectiveness. In parallel with the innovation sector it is also highlighted its automotive and specialized polymers potential, in the nearly future (Pietrini *et al.*, 2007).

For all this reasons it is evident a choice that it is related with a PHAs production from a wastewater substrate, which is the focus of our study. More strictly, our target substrate it is particularly chosen for the suitability in a Mediterranean reality, where also the high drought and the wastewater treatment needing combine to create the exigence of a eco-friendly solution to this environmental concern. So given this substrate, our efforts were oriented in an optimizing bioprocess that could be at the same time, suitable and efficient. This starts from the choice of the best strategy for treats and valorise the resource.

Two main strategies of PHAs accumulating strains selection exist, i.e. search of PHAs accumulating potential strains and use different wastes as a zero cost substrate for known PHAs accumulating strains. We start our research work choosing a mixing of both strategies. In fact we try to find new possible strains adapted to the two-phase olive mill wastewater (TPOMW) with a PHAs potential, but also we choose three strains with documented PHAs storage ability (Yan *et al.*, 2000, Pettinari *et al.*, 2003), belonging to the *Pseudomonadaceae* family. The last strategy direct us to an orientation in using these strains as a selective inocula, for their verified adaptation to the substrate of concern (Juarez *et al.*, 2008).

The first preliminary results with chemically defined media confirm this trend of great PHA production. This was especially the case when a N source was employed. This element was very determinant, as it is hypothesised for their influence in the energetic switch, for the biosynthesis of cellular material by the strains. This energy potential when utilized in aerobic condition for the N fixing metabolism, is merely employed for the respirative protection of their characteristic anaerobically working enzyme: the nitrogenase. This process involves also the biosynthesis of alginate as a surplus protection mechanism, as well documented by (Page *et al.*, 2001, Segura *et al.*, 2003). The two metabolic pathways, i.e.: biosynthesis of alginate and biosynthesis of PHAs are, in fact, inversely correlated,

and maybe there also will be a negative feedback between them, with a cascade signalling mechanism of regulation (Galindo *et al.*, 2007).

The first evidence was documented in our study as the ability of the strains of *Azotobacter* sp to increase until 300 % their PHAs production in the case of adding N source at the medium, in particular with *Azotobacter vinelandii* UWD, maybe because it is a hyper-accumulating microorganism, selected specifically for this purpose by (Page *et al.*, 1992).

The fact that high PHAs content could be achieved if glucose is chosen as C source is widely known (Khanna *et al.*, 2005; Chanprateep *et al.*, 2010). The difficult aspect is obtaining such biopolymers from renewable and complex resources.

In our experimental setting a obliged passage was the verified adaptation of the selected strains to the different VFAs. In fact these compounds, in addition to could be present in the wastewater; are also important for a possible influence in the polymerization metabolism; in fact they are responsible for a better quality biopolymer achievement. (Albuquerque *et al.*, 2010b).

Our result of such adaptation metabolism is verified for all the three strains and in particular, for two of them, to the relative maximum obtainable in such substrate (Koutrouli *et al.*, 2009), this was already verified for these strains. (Cho *et al.*, 2001; Pozo *et al.*, 2002). So it is not surprising that they could metabolize such molecules as the only source of C.

The very issue of the study was, instead, the ability of PHAs production in an optimized way, from a TPOMW (two phases olive mill wastewater, *alpeorujo*) substrate. For this reason, we proceed with two steps: firstly, using a chemically defined media with VFAs plus hydrosoluble carbohydrate source, representative of the TPOMW carbohydrate fraction (i.e. glucose and mannitol) (Dionisi *et al.*, 2005) as a simulated media for the adaptation of the strain at the real waste and secondly, using a fresh TPOMW as a possible raw substrate for selected inocula addition.

In fact the composition of the substrate, even if affected by a high complexity, presents some characteristics that give it properties that aid its biodegradability, first of all for its hydrosoluble sugars content and minor grade of polyphenolic presence. (McNamara *et al.*, 2008; Rouvalis *et al.*, 2010)

Our results in that sense, showed that *Azotobacter vinelandii* UWD and *Azotobacter chroococcum* H23 were very able to grow in a pool of a mixed VFAs presence and in particular, their ability was reflected with the relative maximum of the VFAs source, maybe this fact could be explicable with an adapted mechanism. In fact the VFAs metabolism is documented (Pozo *et al.*, 2002) also in terms of the

possible use of these molecules as precursors of a varied PHA biosynthesis, but it is also documented (Patil *et al.*, 2010) the preference for carbohydrate substrate metabolism, when a source of C, of such type was present predominantly in the media. It seems that when glucose and mannitol was present in abundance in the media, the strains will prefer them for the growth. The PHAs production in such media shows similar results as with chemically defined media employing glucose as C source, circumscribing the positive results through the target substrate, even if in a simulated way.

The adaptation at a fresh and diluted TPOMW medium was also positive but the PHAs production was scarce, probably for the excessive presence of the polyphenolic content in the substrate. For that reason, a preliminary contact with the waste of concern as growth substrate, give us the positive impression that the strains will metabolize it well, as was already proved (Juárez *et al.*, 2008). The hypothesis that an efficient biodegradation would have represented a direct solution for using the substrate in raw form, would have reduced greatly the costs, but in order to find a compromise between the optimization and the internal costs at the bioprocess, we preferred a preliminary step of an anaerobic digestion.

To prevent this possible negative results at major scale and for optimizing the bioprocess we set up a method for an easy and efficient anaerobic digestion of the substrate. This feature become determinant and convert it into the very key factor of the biotechnological process. This process guarantee, with an optimized HRT, an efficient macromolecular hydrolysis and at the same time a VFAs production, of a variety of volatile fatty acids, maybe useful for the aerobic selective inoculated use of the substrate. The optimized HRT was similar to other results (Koutrouli *et al.*, 2009) and represent a compromise between an efficient VFAs production preventing the natural prosecution of the community therein to produce methane.

The PHAs production of the strains was markedly evident when it was employed such anaerobically digested substrate, the first reason of that is because the hydrosoluble sugars content of the TPOMW, was more abundant than in the OMW and the polyphenols fraction was reduced; so both of these factor when it was applied an anaerobic digestion concur for a better substrate achievement for the bioprocess of interest. In fact an optimized acidogenic condition, lead to a reduction of the polyphenolic fraction, more easily than with a OMW substrate where is more abundant that fraction; at the same time a higher content of hydrosoluble sugar it will not be affected by an anaerobic digestion, as much as it would be affected in the case of OMW (Koutrouli *et al.*, 2009). In fact the hydrosoluble sugars fraction remain in such quantity to support the life of the strains, in the subsequent step of

the bioprocess. It was the use of such achieved substrate as a selective media for a adapted and selected inocula able to grow in aerobic conditions.

The guide line of use an anaerobic digested media of TPOMW into aerobic condition make us move into a first option: increase the concentration of the substrate. The results show an evident direct correlation between the abundance of the substrate and the PHAs production. Different is the case for *Azotobacter vinelandii* UWD that shows a greater production at 20% than with more abundant concentrations of TPOMW. It reflects its PHAs hyper-accumulating potential, independently of the conditions, this behaviour was a direct consequence of the deficiency of an enzyme that is present into the respiratory chain (Page *et al.*, 1992), this detail lead it to naturally switch its metabolism through the PHAs storage as a direct consequence of what we says before.

The poor PHAs production by the two other strains of *Azotobacter* was dependant of the fact that the presence of only a diluted and anaerobic digested TPOMW media was too poor to guarantee a PHAs production, in fact the positive result that we found as growth curve with a less implemented media, (i.e. a basic media make by only anaerobic digested TPOMW) make us fall in error in the consideration that such substrate will lead to both positive results as PHAs production and as growth curve. The applied intent of this study also support this preference, in terms of reduction of costs, so no addition of different element to the digested substrate was conducted, at least in the preliminary phase. Such scarce results of PHAs production oblige ourselves in find other possible factors for an effective optimization of the process.

The new key factor was an apparently little improvement of the media, that cause a dramatic rise in terms of PHAs production. It is referred here to the implementation of the medium with microelements (especially metals, such: Fe, Mo) and also a source of sulphur. All this features contribute to a more efficient PHAs production. This characteristics were related with the fact that the thiolase enzyme of the PHAs byosynthesis pathway was dependent by microelement presence, as involved into the active centre of the complex as proved by (Rehm *et al.*, 2003) and (Grage *et al.*, 2009) or by the fact that siderophore activity, useful for the uptake of micronutrients was dependent by the presence of iron as documented by (Cornish *et al.*, 2000) and (Kraepiel *et al.*, 2009). Furthermore a very few studies (Fenske *et al.*, 2005) have hypotized a great importance of the Mo uptake by *Azotobacter* sp for its general metabolism, but the characterization of the inclusion of such ionic elements is very well known only for the nitrogenase (Einsle *et al.*, 2002).

The above depicted simplified method and an optimized extraction make us consider all the process as suitable for the necessary steps, in the process of the scale-up.

In fact this second aspect of the process (i.e.: the extraction method) is not only crucial for the efficient recovery of the biopolymer but also for the overall general logics of the biotechnological protocol; in fact an eco-sustainable and economic consideration of every aspect must be the guide for every step, in a potential application intent that counts on well-thought life cycle assessment (LCA). At a lab scale we find that the quick method for the extraction was the protocol relied on chloroform extraction, but with the ecological method, already described in M&M section the global yield decrease about a 40%, so every result discussed here include this Damocles' sword within.

A first set of experiments in the natural prosecution of a batch scale (i.e. bioreactor scale) confirms the aforementioned positive results, especially in the first of them; this success was attributable to the fact that a lack of antifoaming lead to an reduced interchange headspace with the media, and the relatively reduced RPM, contribute also to this lack of dissolved oxygen in the bioreactor. Both the features cause improvement in the PHAs production. This better result was also confirmed by the sequent experiments where was chosen a higher feeding-batch with a contemporary increasing in the RPM rate. The production decrease and maybe it was imputable to the higher fractionating rate of the air bubbles in the media (D'Annibale *et al.*, 2006), this fact did not permit the strains to remain into reduced aerated condition (microaerofilic); this do not allow them to store a sufficient quantity of biopolymer, because of the necessity to protect the nitrogenase with the increased conditions of dissolved oxygen, especially in the stationary phase.

An efficient strategy to prevent this inhibitory condition was to put the biomass into a *famine* and *feast* condition where the worst factor was a prolonged starvation, (Albuquerque *et al.*, 2010a); this strategy was prized by a duplication of the PHAs production possibly directly dependent for the condition of feed-batch; even if this good result was achieved it was not as good as was the production in the first case, where a reduced diffusion of oxygen was guaranteed. This strictly dependence between optimized PHAs production and limited oxygenation was already reported by other authors (González-López *et al.*, 1996; Page *et al.*, 2001).

The bioreactor scale presents intrinsic difficulties, like for example, the operational conditions that add dynamic variables to the bioprocess, *in primis* the foam formation and dissolved oxygen measurement (strictly dependent to the stirring conditions). All these factors could be obviously the best advantages of such experimental setting but in our case, sometimes they convert themselves in a

disadvantage; especially for the needing to keep the right working volume and prevent the mass transfer for the impossibility of adding an antifoaming, useful for it (matter of costs). In fact we chose to adopt a cheaper physical purge system to prevent this problem.

Even more difficult were the conditions at pilot plant scale; this was basically for a feature: the different substrate in use. The higher polyphenolic content and the lower hydrosoluble sugars content concur to prejudice the good results achieved at laboratory scale.

In fact both of these elements that were responsible for the success of the lab scale results, were present at this scale at the contrary. So the anaerobic digestion process was inapplicable to this substrate, especially as preliminary step for our strains. In this case, in fact, was opportune to skip the anaerobic digestion step, mainly to prevent the total consume of hydrosoluble sugars. The chosen substrate for the aerobic inocula represents the compromise between reduce polyphenolic inhibitory effect and the sufficient sugars presence. In fact we debate if an increasing concentration of the waste could be sufficient to give the positive conditions for the accumulating process, with few inhibitory effects; or if, for the contrary, a halved concentration would be better for making the most of positive conditions with an acceptable reduced inhibitory effect. The results tend to this second option. Moreover, as we experimented, a careful control of the parameters in the media is essential to prevent contamination, especially for the eucaryotic population; (Fountoulakis *et al.*, 2002) this is particularly evident when it is increased the aeration rate. (D'Annibale *et al.*, 2006).

The culture composition is not of secondary importance, especially in a pilot plant scale. In fact in such conditions two kind of possibilities could be chosen: a mixed inocula population of global PHAs accumulating potential (Albuquerque *et al.*, 2010a) or a highly selected inocula, with a strictly unique strain composition of proven ability of PHAs (Povolo *et al.*, 2010) production. We chose the last option because of taking advantage of the fact, that a unique inocula have only a metabolic requirement, instead a more complex and mixed inocula could pass different and contrasting phases that could prejudice the optimization of the PHAs production. (Chua *et al.*, 2003).

With the accurate setting of the scale-up steps and with a positive adaptation of the strains to the media, we reach a good results at pilot plant scale, but with the last step the not-accumulating population become almost the half, in terms of PHAs yield. This was an expected result, complicated by the fact of not using the same substrate of origin, in the process.

Even if with these added problems, the PHAs production could be considered satisfactory, particularly for the directly proportional increase along the scale-up process and shows the good potential of the use of this selected inocula as biotechnological tool of the PHAs production in the field of fermentation technology. A factor of not secondary importance was the added value of a possible PHAs production as also a waste treatment; this was confirmed with a specie-specific correlation between best PHAs producer strain and not reduced bioluminescence into Microtox[®] assay. In fact it could be speculated that with a subsequent filtration, after the fermentation step of PHAs production it could be easily treated a fourth of the total waste, reducing the costs in the overall treatment requirements. This result is slightly better than what obtained by (Rouvalis *et al.*, 2010) in terms of toxicity units, even if on other target organisms. This is inclusive better if we consider that such substrate are two-fold concentrated than the substrates considered in that study.

Definitely all these results, viewed in an applied research consideration sum points in choosing a PHAs driven bacterial fermentation biotechnology; a technology that could overpass the prickly issues inside the actual crops-driven bioplastics market, particularly in terms of land use.

6 Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, así como la revisión bibliográfica llevada a cabo, podemos poner de manifiesto las siguientes conclusiones:

1. Las tres cepas bacterianas incluidas en el género *Azotobacter* y objeto de nuestra investigación (*Azotobacter vinelandii* UWD, *Azotobacter chroococcum* H23 y *Azotobacter vinelandii* ACCT 12387) han mostrado capacidad para sintetizar polihidroxicanoatos (PHAs) en medios químicamente definidos, con composición similar al alpeorujó en cuanto a fuente carbonada y ácidos grasos volátiles de cadena corta.
2. Independientemente de la concentración de alpeorujó y de la existencia o no de micronutrientes en los medios de síntesis de PHAs, la digestión anaeróbica del residuo alpeorujó se mostró como una eficiente estrategia para la síntesis de bioplástico.
3. De las cepas bacterianas utilizadas, *A. chroococcum* H23 ha revelado un importante potencial de síntesis y acumulación de PHAs en medios adicionados de alpeorujó.
4. En todos los ensayos, el polihidroxicanoato sintetizado fue poli- β -hidroxibutirato (PHB), no evidenciándose heteropolimerización ante la presencia de ácidos grasos volátiles de cadena corta.
5. La producción de PHAs por parte de la cepa *A. chroococcum* H23 usando biorreactores a escala de laboratorio se incrementó al reducir la aireación y al incrementar las adiciones de sustrato a una población desarrollada y adaptada a un medio de alpeorujó.
6. La síntesis aeróbica de PHAs por parte de bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre usando medios adicionados de alpeorujó digerido anaeróbicamente se ha revelado como un proceso de detoxificación del residuo, por lo que abre nuevas posibilidades a la valorización de residuos agrícolas con importantes cargas contaminantes.

7 Bibliografía

- ^aAlbuquerque M.G.E., Concas S., Bengtsson S., Reis M.A.M., (2010) **Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: The use of a 2- stage CSTR system for culture selection** *Bioresource Technology*, 101(18), pp 7112-7122
- ^bAlbuquerque M.G.E., Martino V., Pollet E., Averous L., Reis M.A.M., (2010) **Mixed culture polyhydroxyalkanoates (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties** *Journal of Biotechnology*, on press
- Aldor I., Keasling J.D., (2003) **Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates** *Current Opinion in Biotechnology* 14, pp 475-483
- Aquilanti L., Favilli F., Clementi F., (2004) **Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples** *Soil Biology and Biochemistry* 36(9), pp 1475-1483
- Aranda E., Garcia-Romera I., Ocampo J.A., Carbone V., Mari A., Malorni A., Sannino F., De Martino A., Capasso R., (2007) **Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and bioremediated components of dry olive mill residue** *Chemosphere* 69(2), pp 229-239
- Beccari M., Bonemazzi F., Majone M., Riccardi C., (1996) **Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents.** *Water Research* 30, pp 183-189
- Bengtsson S., Werker A., Christensson M., Welander T., (2008) **Production of**

polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology* 99, pp 509–516

Borja R., Rincón B., Raposo F., Alba J., Martín A., (2003) **Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste.** *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), pp 139-145

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. (1990) **Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters- Review.** *Advances in Biochemistry Engineering/Biotechnology*, 41, pp 77-93

Byrom D., (1992), **Production of poly-β-hydroxybutyrate: poly-β-hydroxyvalerate copolymers.** *FEMS Microbiology Reviews*, 103, pp 247–250

Cabrera F., Madejón E., Romero A.S., López R. (2002) **Diagnostico y estudio de alpechines, orujos y alperujos. Jornadas de investigación y transferencia tecnológica al sector oleícola.** Córdoba . España

Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G., (1995) **Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste water.** *Journal. Applied Bacteriology*, 79, pp 393-398

Caputo A., Scacchia F., Pacifico M., Pelagagge (2003) **Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions.** *Applied Thermal Engineering*, 23 (2), pp 197-214

Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Sermanni G.G., Lo Cascio B., (2003) **Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Tricum durum* Desf.) germinaility.** *Chemosphere* 50, pp 959-966

- Chanprateep S., (2010) **Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates-Review** *Journal of Biosciences and Bionegineering* 110(6),pp 621-632
- Cho K., Ryu H.W., Park C., Goodrich P.R., (2001) **Utilization of swine wastewater as a feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD** *Journal of Biosciences and Bionegineering* 19(2), pp 129-133
- Chua A.S.M., Takabatake H., Satoh H., Mino T., (2003) **Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent** *Water Research*, 37(15) pp 3602-3611
- Cornish A.S., Page W.J., (2000) **Role of Molybdate and Other Transition Metals in the Accumulation of Protochelin by *Azotobacter vinelandii*** *Applied and Environmental Microbiology*, 4, pp 1580-1586
- D'Annibale A., Quarantino D., Federici F., Fenice M., (2006) **Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*** *Biochemical Engineering journal* 29(3), pp 243-249
- Dangelico M., Pontrandolfo P., (2010) **From green product definitions and classifications to the Green Option Matrix** *Journal of Cleaner Production* 18, pp 1608-1628
- De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R., (2007) **Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill**

wastewaters. *Food Chemistry - Analytical, Nutritional and Clinical Methods* 104, pp 858–867

De Wit M., Faaij A. (2010) **European biomass resource potential and costs** *Biomass and Bioenergy*, 34, pp 188-202

Din M.F., Ujang Z., van Loosdrecht M.C., Ahmad A., Sairan M.F., (2006) **Optimization of nitrogen and phosphorus limitation for better biodegradable plastic production and organic removal using single fed-batch mixed cultures and renewable resources.** *Water Science Technology* 53(6), pp 15-20

Dionisi D., Carucci G., Papini MP., Riccardi C., Majone M., Carrasco F., (2005) **Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers.** *Water Research* 39(19), pp 2076-2084

Dionisi, D., M. Majone, G. Vallini, S. D. Gregorio and M. Beccari (2007). **Effect of the Length of the Cycle on Biodegradable Polymer Production and Microbial Community Selection In a Sequencing Batch Reactor.** *Biotechnology Progress* 23, pp 1064-1073

Doi Y., (1990) **Microbial Polyesters-Book Review.** New York: VCH Publishers. *Angewandte Chemie International Edition in English* 30(11), pp 1525-1526

Einsle O., F. Tezcan A., Andrade S.L.A., Schmid B., Yoshida M., Howard J.B., Rees D.C., (2002) **Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor** *Science* 297, pp 1696

Ericsson K., Nilsson L.J., (2006) **Assessment of the potential biomass supply in Europe using a resource-focused approach** *Biomass and Bioenergy* 30, pp 1-15

- Fenske D., Gnida M., Schneider K., Meyer-klaucke W., Schemberg J., Henschel V., Meyer A., Knochel A., Muller A., (2005) **A New Type of Metalloprotein: The Mo Storage Protein from *Azotobacter vinelandii* Contains a Polynuclear Molybdenum–Oxide Cluster** *Chemistry and Biochemistry* 6, pp 405 – 413
- Fezzani B., Ben Cheikh R., (2008) **Optimisation of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste in a batch digester** *Desalination* 228, pp 159–167
- M. S. Fountoulakis, S. N. Dokianakis, M. E. Kornaros, G. G. Aggelis, G. Lyberatos (2002) **Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*** *Water Research*, 36(19), pp 4735-4744
- Fries L.L.M., Pacovsky R.S., Safir G. R., Siqueira J.O., (1997) **Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds.** *Journal of chemical ecology* 23, pp 1755-1767
- Galindo E., Peña C., Nuñez C., Segura D., Espín G., (2007) **Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*-Review** *Microbial Cell Factories* 6(7), pp 1-16
- García Lorenzo, M. L. (2004). **Bioensayo de toxicidad por Microtox® en sedimentos mineros estabilizados con CaCO₃.** *Proyecto Fin de Carrera.* Universidad deMurcia.
- González-López, J., Pozo, C., Martínez-Toledo, M.V., Rodelas, B. y Salmerón, V.. (1996) **Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in wastewater from olive oil mills (alpechin).***International Biodeterioration and Biodegradation* 38, pp 271-276

- Grage K., Jahns A.C., Parlane N., Palanisarny R., Rasiah I.A., Atwood J.A., Rehm B.A.H., (2009) **Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications-Reviews** *Biomacromolecules* 10, pp 660–669
- Gross R.A., Kalra B., (2002) **Biodegradable Polymers for the Environment.** *Science* 297, pp 803-807
- Harding K.G. , Dennis, J.S. von Blottnitz, H. Harrison S.T.L. (2007) **Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly-hydroxybutyric acid using life cycle analysis** *Journal of Biotechnology*, 130 (1), pp 57-66
- Hassan A., Shirai N., Kusubayashi N.,Karim M.I.A., Nakanishi K.,Hashimoto K., (1996) **Effect of organic acid profiles during anaerobic treatment of palm oil mill effluent on the production of polyhydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides*.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), pp 151-156
- Haywood, G. W., Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1989) **A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria.** *Biotechnology Letters*, 11, pp 471-476
- Helm J, Wendlandt KD, Jechorek M, Stottmeister U. (2008) **Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly-beta-hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture.** *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), pp 1054-1061

Huang H.J., Ramaswamy S., Tschirner U.W., Ramarao B.V. (2008) **A review of separation technologies in current and future biorefineries** *Separation and Purification Technology* 62, pp 1-21

International Olive Oil Council (2004). Annual report

Johnson K., Kleerebezem R., Van Loosdrecht M.C.M., (2009) **Model-Based Data Evaluation of Polyhydroxybutyrate Producing Mixed Microbial Cultures in Aerobic Sequencing Batch and Fed-Batch Reactors** *Biotechnology and Bioengineering* 104(1), pp 50-67

Juaréz M.J.B., Zafra-Gómez A., Luzón-Toro B. Ballesteros-García O.A. Navalón A., González J., Vílchez J.L, (2008) **Gas chromatographic-mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter Chroococcum***. *Bioresource Technology* 99, pp 2392-2398

Jurado F.,Cano A., Carpio J. (2003) **Modelling of combined cycle power plants using biomass**. *Renewable Energy*, 28(5), pp 743-753

Keenan T. M., Nakas J. P., Tanenbaum S. W., (2006) **Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass-Review**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, pp 616-626

Khanna S., Srivastava A.K., (2005) **Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates** *Process Biochemistry* 40(2), pp 607-619

Korte F., Kvesitadze G., Ugrekhelidze D., Gordeziani M., Khatisashvili G., Buadze O., Zaalishvili G., Coulston F., (2000) **Review Organic Toxicants and Plants** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(1),pp 1-26

- Kostantinou M., Kolassidou K., Pashalidis I., (2009) **Studies on the interaction of olive cake and its hydrophylic extracts with polyvalent metal ions (Cu(II), Eu(III)) in aqueous solutions** *Journal of Hazardous Materials* 166(2-3), pp 1169-1173
- Koutrouli E., Kalfas H., Gavala H., Skiadas I., Stamatelatou K., Lyberatos G., (2009) **Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp** *Bioresource Technology* 100, pp 3718-3723
- Kraepiel A.M.L., Bellenger J.P., Wichard T., Morel F.M.M., (2009) **Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria** *Biometals*, 22, pp 573–581
- Lee S. Y., (1996) **Bacterial Polyhydroxyalkanoates- Review.** *Biotechnology and Bioengineering*, 49, pp. 1-14
- Lee S.H., Ko J.H., Poo K.M., Lee T.H., Woo H.J., Kim C.W., (2006) **Practical approach to parameter estimation for ASM31bio-P module applied to five-stage step-feed EBPR process** *Water Science and Technology* 53(1), pp 139-148
- Liu W., Linning K. D., Nakamura K., Mino T., Matsuo T., Forney L.J., (2000) **Microbial community changes in biological phosphate-removal systems on altering sludge phosphorus content** *Microbiology* 146, pp 1099–1107
- Luengo J.M., Garcia B., Sandovan A., Naharro G., Olivera E.R., (2003) **Bioplastics from microorganisms** *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp 251–260
- Mancini, J.A., Boylan, M., Soly, R., Graham, A.F. and Meighen, E.A., (1988). **Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique *lux* gene organization.** *Journal of Biological Chemistry* 263, pp. 14308–14314

- Mangan C.L., (1995) **Non-food crops and non-food uses in EC research programs** *FEMS Microbiology Reviews* 16, pp 81-88
- Martínez-Toledo M.V., González-López J., de la Rubia T., Ramos-Cormenzana A., (1985) **Isolation and characterization of *Azotobacter chroococcum* from the roots of *Zea mays***. *FEMS Microbiology Ecology* 31, pp. 197–203.
- Martínez-Tolédo, M.V., González-lópez, J.; Rodelas, B.; Pozo, C. Salmerón, V. (1995) **Production of poly-hydroxybutyrate by *Azotobacter chroococcum* H23 in chemically defined medium and alpechin medium**. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, pp. 413-418
- McNamara C.J., Anastasiou C.C., O’Flaherty V., Mitchell R., (2008) **Bioremediation of olive mill wastewater-review** *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), pp 127-134
- Meighen EA., Dunlap P.V., (1993) **Physiological, Biochemical and Genetic Control of Bacterial Bioluminescence** *Advances in Microbial Physiology* 34, pp 1-67
- Mekki A., Dhouib A., Feki F., Sayadi S., (2008) **Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, pp 488–495
- Mellouli H.J., Hartmann R., Gabriels D., Cornelis W.M., (1998) **The use of olive mill effluents (“marginés”) as soil conditioner mulch to reduce evaporation losses** *Soil Tillage Research* 49(1-2), pp 85-91
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino-Agencia para el aceite de oliva- Informe de gestión de la campaña 2005/2006

- Morillo JA, Aguilera M, Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchéz M., (2006) **Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate.** *Current Microbiology* 53, pp 189-193
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R., (2005) **Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53(4), pp 823-837
- Onorati F., Mencozi M., (2004) **Effects of two diluents in the Microtox® toxicity bioassay with marine sediments** *Chemosphere* 54(5), pp 679-687
- Page W.J., Knosp O., (1989) **Hyperproduction of Poly-3-Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD.** *Applied and Environmental Microbiology*, 5(6), pp 1334-1339
- Page W.J., Manchak J., Rudy B. (1992) **Formation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD.** *Applied Environmental Microbiology* 58(9), pp 2866-2873
- Page W.J., Bhanthumnarvim N., Manchak J., Ruman M., (1997) **Production of poly-(beta-hydroxybutyrate-beta-hydroxyvalerate) copolymer from sugars by *Azotobacter salinestris*.** *Applied Microbiology Biotechnology* 48, pp 88-93
- Page W.J., Tindale A., Chandra M., Kwon E., (2001) **Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly-b-hydroxybutyrate** *Microbiology*, 147, pp 483-490
- Paixao SM, Mendonca E, Picado A, Anselmo AM., 1999. **Acute toxicity evaluation of olive mill wastewaters: A comparative study of three aquatic organisms.** *Environmental Toxicology*, 14, pp 263-269
- Patil S.V., Salunkhe R.B., Patil C.D., Patil D.M., Salunke B.K., (2010) **Bioflocculant Exopolysaccharide Production by *Azotobacter indicus* Using Flower**

Extract of *Madhuca latifolia* L. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 162, pp 1095–1108

Pedersen C.T., Safir G. R., Siqueira J. O., Parent S., (1991) **Effect of phenolic compounds on asparagus mycorrhiza.** *Soil Biology and Biochemistry* 23, pp 491-494

Pettinari M.J., Chaneton L., Vazquez G., Steinbuchel A., Méndez B.S., (2003) **Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8** *Plasmid* 50, pp 36–44

Pietrini M., Roes L., Patel M.K., Chiellini E., (2007). **Comparative Life Cycle Studies on Poly(3-hydroxybutyrate)-Based Composites as Potential Replacement for Conventional Petrochemical Plastics** *Biomacromolecules* 8, pp 2210-2218

Poirier Y., Nawrath C., Somerville C., (1995). **Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. Review** *Biotechnology* 13(2), pp142-50

Potter M., Madkour H.M., Mayer F., Steinbuchel A., (2002) **Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16** *Microbiology* 148, pp 2413-2426

Potter M., Steinbuchel A., (2005) **Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation** *Biomacromolecules* 6, pp 552-560

Povolo S., Toffano P., Basaglia M., Casella S. (2010) **Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose** *Bioresource Technology*, 101 (20), pp 7902-7907

- Pozo C., Martínéz-Toledo M.V., Rodelas B., González-López J., (2002) **Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechín (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source.** *Journal of Biotechnology* 97, pp 125-131
- Quagliano J.C., Miyazaki S.S., (1997) **Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly-b-hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B** *Applied Microbiology Biotechnology* 48, pp 662-664
- Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jimenez B., García-Pareja M.P., (1996) **Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater.** *International Biodeterioration and Biodegradation* 38(3-4), pp 283-290
- Rehm B.H.A., (2003) **Polyester synthases: natural catalysts for plastics- REVIEW ARTICLE** *Biochemistry Journal* 376, pp 15-33
- Ribo J.M., Rogers F., (1990). **Toxicity of Mixtures of Aquatic Contaminants using the Luminiscence Bacteria Bioassay.** *Toxicity Assessment: An International Journal*, 5, pp 135-152.
- Rincón B., Borja R., González J.M., Portillo M. C., Saíz-Jiménez C., (2008) **Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue.** *Biochemical Engineering* 40, pp 253-261
- Rouvalis A., Iliopoulou-Georgudaki J. (2010) **Comparative Assessment of Olive Oil Mill Effluents from Three-phase and Two-phase Systems, Treated for Hydrogen Production** *Bulletin Environment Contamination Toxicology*, 85, pp 432-436

- Sánchez-Monedero M., Serramià N., Garcia-Ortiz C., Fernandez-Hernandez A., Roig A., (2010) **Greenhouse gas emissions during composting of two-phase olive mill wastes with different agroindustrial by-products** *Chemosphere* 81(1), pp 18-25
- Segura D., Guzmán J., Espín G., (2003) **Azotobacter vinelandii mutants that overproduce poly-b-hydroxybutyrate or alginate** *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, pp 159–163
- Serafim L.S., Lemos P.C., Oliveira R., Reis M.A.M. (2004) **Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions** *Biotechnology and Bioengineering* 87(2), pp 145-160
- ^aSerafim L.S., Lemos P.C., Torres C., Reis M.A.M., Ramos A., (2008) **The Influence of Process Parameters on the Characteristics of Polyhydroxyalkanoates Produced by Mixed Cultures** *Macromolecular Bioscience* 8, pp 355-366
- ^bSerafim L.S., Lemos P.C., Albuquerque M.G., Reis M.A.M. (2008) **Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials.** *Applied Microbiology Biotechnology* 81(4), pp 615-628
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruañas R., Garau M.A., (2001) **Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal** *The Science of Total Environment* 279(1-2), pp 207-214
- Spandre R., Dellomonaco G., (1996) **Polyphenols pollution by olive mill waste waters, Tuscany-Italy,** *Journal of Environmental Hydrology* 4, pp 1–13
- Steinbüchel A., Valentin H.E., (1995) **Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids,** *FEMS Microbiology Letters* 128, pp 219–228
- Steinbüchel A., (2001) **Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example-Review.** *Macromolecular Bioscience* 1(1), pp 1-24

- Steinbüchel A., (2003) **Production of rubber-like polymers by microorganisms** *Current Opinion in Microbiology* 6(3), pp 261-270
- Tekin A. R., Dalgic C., (2000) **Biogas production from olive pomace.** *Resources, Conservation and Recycling* 30, pp 301–313
- Thakor N., Trivedi U., Patel K.C., (2005) **Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils.** *Bioresource Technology* 96(17), pp1843-1850
- Tsuge T., (2002) **Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(6), pp 579-84
- Wang X., Wang Y., Chungsheng Y., Wang L., Han S., (2002) **Mechanism-based quantitative structure-phytotoxicity relationships comparative inhibition of substituted phenols on root elongation of *Cucumis sativus*.** *Archives Environmental Contamination Toxicology* 42(1), pp 29-35
- Wendlandt K.D., Jechorek M., Helm J., Stottmeister U., (2001) **Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane.** *Journal of Biotechnology* 86(2), pp 127-33
- Witham F. H., Blaydes D. F., Devlin R. M. (1971). **Experiments in plant physiology.** *Van Nostrand Reinhold Company. New York.* pp:16-18.
- Yan Y., Wu Q., Zhang R., (2000) **Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ¹³C NMR.** *FEMS Microbiology Letters* 193, pp 269-273
- Yu J., (2001) **Production of PHA from starchy wastewater via organic Acids** *Journal of Biotechnology* 86, pp 105–112

Yu J., Chen L. X., (2006) **Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass.**
Biotechnology Progress 22, pp 547-553

