



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, MODALIDAD**  
**PRESENCIAL.**

**TEMA:**

“BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) MEDIANTE BIOLOGÍA COMPUTACIONAL”

Informe de trabajo de titulación para obtener el título de ingeniera en biotecnología

**LINEA DE INVESTIGACIÓN:**

BIOTECNOLOGÍA, ENERGÍAS Y RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**AUTOR:**

JOHANNA VANESSA RUIZ CORONEL

**DIRECTOR:**

ING. SANTIAGO ZARATE BACA MSC.

**IBARRA – 2023**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

“BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS BACTERIANOS PRODUCTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) MEDIANTE BIOLOGÍA COMPUTACIONAL”

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor; por lo cual, se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADA:

Ing. Santiago Zarate MSc.

**DIRECTOR**

Ing. Andrea Chilingua MSc.

**ASESOR**

Ing. Pedro Barba MSc.

**ASESOR**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	100409488-2		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	RUIZ CORONEL JOHANNA VANESSA		
<b>DIRECCIÓN:</b>	JUANA ATABALIPA 5-30 Y AV. TEODORO GÓMEZ		
<b>EMAIL:</b>	jvruizc@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>		<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0960283905

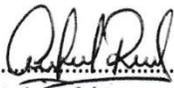
DATOS DE LA OBRA	
<b>TÍTULO:</b>	“BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) MEDIANTE BIOLOGÍA COMPUTACIONAL”
<b>AUTOR (ES):</b>	JOHANNA VANESSA RUIZ CORONEL
<b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>	14/06/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TITULO POR EL QUE OPTA:</b>	“BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) MEDIANTE BIOLOGÍA COMPUTACIONAL”
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Ing. Santiago Zarate Baca MSc.

## 2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de esta y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 20 días del mes de junio del 2023

### EL AUTOR:

(Firma).....

Nombre: Johanna Ruiz

**CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Ibarra, 14 de junio del 2023

Ing. Santiago Zarate Baca

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte, en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Santiago Zarate Baca', is written over a horizontal dotted line.

Ing. Santiago Zarate Baca MsC.

C.C: 171897484-1

## APROBACIÓN COMITÉ CALIFICADOR

Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular “Bioprospección de microorganismos bacterianos productores de polihidroxicanoatos (PHAS) mediante biología computacional” elaborado por Johanna Vanessa Ruiz Coronel, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte.



.....  
Ing. Santiago Zarate Baca MsC.

C.C: 171897484-1



.....  
Ing. Andrea Chiquinga MsC.

C.C: 172006419-3



.....  
Ing. Pedro Barba MsC.

C.C: 171675118-3

## **DEDICATORIA**

*Dedico el resultado de este trabajo a toda mi familia. Principalmente, a mis padres que me apoyaron y contuvieron los momentos malos y en los menos malos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades y no desfallecer en el intento. A mis hermanos quienes con su aliento de “si se puede”, y con la visión de ser un ejemplo para ellos me permitió esforzarme día tras día sin desfallecer. Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi empeño. Todo esto con una enorme dosis de amor, esfuerzo propio y sin pedir nada a cambio.*

*También, quiero dedicarle este trabajo a mi hijo Liam. Su nacimiento, ya sea por casualidad o causalidad, ha coincidido con el inicio de esta tesis. Sin duda él es lo mejor que me ha pasado, y ha llegado en el momento justo para darme el último empujón que me faltaba para terminar mi carrera profesional y permitirme continuar luchando, llenando nuestras de vidas de éxitos y cosechando más triunfos juntos. Debo pedirle perdón porque ha sufrido el impacto directo de las consecuencias del trabajo realizado. Realmente, él me ayuda a alcanzar el equilibrio que me permite dar todo mi potencial. Nunca dejaré de estar agradecido por esto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por regalarme salud y poder alcanzar este título profesional.

Agradezco a la Universidad Técnica del Norte, mi casona universitaria que me permitió formarme como profesional. A la Facultad de Ingeniería en Ciencias Ambientales y Agropecuarias que me formo en las aulas con conocimientos y virtudes que hoy en día son parte de mi persona. También agradecer a mi querida carrera de Ingeniería en Biotecnología y a todos mis docentes por el desarrollo de mi vida estudiantil, por las oportunidades de crecer en conocimientos y como persona, abriéndome las puertas de lograr grandes cosas dentro y fuera del país.

Ing. Santiago Zarate MSc. Sin usted y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento, cuando más las necesite. Gracias por sus orientaciones y empatía.

Ing. Pedro Barba MSc. Un motor muy importante durante toda la carrera, los consejos ya sean personales o académicos y oportunidades de lograr cosas grandes se las debo a usted; por su visión de que con constancia y perseverancia se puede alcanzar el éxito.

También agradecer a mis amigas que pude conocer en las aulas, mis divinas que, con su carisma, empatía, y dedicación pudimos culminar con éxito esta etapa de nuestras vidas.

Finalmente agradecer mi familia; mis padres César Ruiz y Piedad Coronel quienes fueron el motor fundamental, a mis hermanos Mikaela y Sebastián agradezco infinitamente por sobrellevar conmigo esta lucha de convertirme en profesional, a mi hijo Liam porque es su ser es el que me llevo alcanzar este logro.

## RESUMEN

La producción industrial de plásticos convencionales ha contaminado el medio ambiente por varios siglos generando daños irreversibles. En la actualidad, la biotecnología presenta alternativas ecoamigables usando microorganismos productores de biopolímeros para reducir los contaminantes ambientales ocasionados por los plásticos convencionales. Sin embargo, todavía requiere de investigación más profunda para lograr su escalamiento industrial. Para reducir el tiempo experimental, se ha desarrollado metodologías computacionales que detectan comportamientos entre los datos con la finalidad de reducir experimentos innecesarios. En esta investigación se analizó el proceso de producción de PHAs mediante herramientas informáticas en un ambiente computacional. Para ello, inicialmente se seleccionó la cepa bacteriana de mayor producción y aplicación biotecnológica usando referencias científicas. Posteriormente se analizaron los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs. Finalmente, se describió un escenario teórico para la producción de estos compuestos a una escala de laboratorio. En esta investigación se determinó que *C. necator* H16 y DSM 545 son las cepas que presentan más información y aplicación productiva de polihidroxicanoatos, sus rendimientos superan el 80% g PHAs/g biomasa. Además, se obtuvo que los principales genes involucrados en la biosíntesis de PHAs son *phaA* (acetil-CoA acetiltransferasa), *phaB* (acetoacetil-CoA reductasa) y *phaC* (ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa), estos genes tienen la capacidad de sintetizar enzimas que transforman a las moléculas de Acetil-CoA en P3HB. Sin embargo, existen otros genes también involucrados en las rutas metabólicas de los polihidroxicanoatos que se relacionan con la degradación o isomerización de ciertas moléculas. Finalmente, usando la información científica se desarrolló un escenario teórico para la producción de PHB usando *C. necator* H16 bajo los siguientes parámetros: pH 7, temperatura de incubación a 30 °C por 72 horas y 200 rpm para la agitación, en 100 ml de volumen de medio y 5% v/v de concentración de inóculo. Estos parámetros fueron seleccionados bajo criterios frecuenciales usando los datos publicados en los artículos científicos. Se seleccionó a la melaza como fuente de carbono por su interés biotecnológico y disponibilidad en la zona norte del Ecuador. En conclusión, la aplicación de técnicas computacionales y bioinformáticas permitieron el proponer *in silico* la producción de bioplásticos identificando una cepa de mayor eficiencia y rendimiento en la producción biotecnológica de polihidroxicanoatos.

**Palabras clave:** Polihidroxicanoatos, *C. necator*, Data mining, Bioprocesos, Bioplásticos

## ABSTRACT

The industrial production of conventional plastics has polluted the environment for several centuries, generating irreversible damage. Currently, biotechnology presents eco-friendly alternatives using biopolymer-producing microorganisms to reduce environmental pollutants caused by conventional plastics; However, further research is still required to achieve its industrial scaling. To reduce the experimental time, computational methodologies have been developed that detect behaviors among the data to reduce unnecessary experiments. In this research, the production process of PHAs in a computational environment was analyzed using computer tools. For this, initially the bacterial strain with the highest production and biotechnological application was selected using scientific references, then the genes involved in the biosynthesis of PHAs were analyzed, and finally a theoretical scenario for the production of these compounds on a laboratory scale was described using scientific information. In this investigation it was found that *C. necator* H16 and DSM 545 are strains that present the high information and productive application of polyhydroxyalkanoates, their yields exceed 80% g PHAs/g biomass. And the main genes involved in the biosynthesis of PHAs are *phaA* (acetyl-CoA acetyltransferase), *phaB* (acetoacetyl-CoA reductase) and *phaC* (Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase), these genes can synthesize enzymes that transform Acetyl-CoA molecules in P3HB. However, there are other genes also involved in the metabolic pathways of polyhydroxyalkanoates that are related to the degradation or isomerization of certain molecules. Finally, using the scientific information, a theoretical scenario was developed to produce PHB using *C. necator* H16 under the following parameters: pH 7, 30 °C, 72 hours, 200 rpm for agitation, 100 ml volume of medium and 5 % v/v of inoculum concentration. These parameters were selected under frequency criteria using data published in scientific articles. Molasses was selected as a carbon source due to its biotechnological interest and availability in the northern of Ecuador. In conclusion, the application of computational and bioinformatics techniques allowed the *in silico* study for the production of bioplastics, obtaining a strain with greater efficiency and yield in the biotechnological production of polyhydroxyalkanoates.

**Keywords:** Polyhydroxyalkanoates, *C. necator*, Data mining, Bioprocesses, Bioplastic

## ÍNDICE E CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I</b> .....	18
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
1.1. Antecedentes .....	18
1.2. Problema.....	20
1.3. Justificación.....	21
1.4. Marco legal.....	22
1.5. Objetivos .....	24
1.5.1 General.....	24
1.5.2. Específicos.....	24
1.6. Hipótesis de la investigación.....	24
1.7. Pregunta directriz .....	24
<b>CAPÍTULO II</b> .....	25
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	25
2.1. Bioplásticos .....	25
2.1.1. Tipos de bioplásticos .....	26
Bioplásticos a base de almidón.....	26
Bioplásticos a base de celulosa.....	26
Bioplásticos a base de proteínas .....	26
Bioplásticos a base de polietileno de cultivo ecológico .....	27
Bioplásticos a base de poliéster alifático.....	27
2.2. Polihidroxicanoatos .....	27

2.2.1. Biosíntesis de PHAs .....	29
2.2.3. Clasificación de los PHAs .....	31
2.2.4. Bacterias productoras de PHAs .....	32
2.2.5. Sustratos para la producción de PHAs en bacterias .....	33
Melazas .....	33
Suero de leche.....	33
Residuos lignocelulósicos.....	34
Glicerol .....	34
2.2.6. Extracción de los PHAs de bacterias .....	34
2.2.7. Aplicaciones .....	34
Industria de embalajes .....	35
Médica y farmacéutica.....	35
Agricultura.....	35
Otras aplicaciones.....	35
2.2.8. Mercado para la industria de PHAs .....	36
2.3. Bioinformática.....	37
2.3.1. Análisis genéticos .....	37
2.3.2. Búsqueda de secuencias génicas.....	38
2.3.3. Diseño de primers o cebadores .....	38
2.3.4. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) .....	38
2.4. Minería de datos aplicada a la investigación.....	39
2.4.1. Redes sociales artificiales .....	39
Componentes de un grafo .....	40
2.4.2. Clustering basado en Algoritmos de clasificación .....	41

Algoritmo de clasificación k-means .....	42
2.5. Escenario teórico en la biotecnología.....	42
2.5.1. Establecimiento de parámetros .....	43
CAPITULO III.....	44
3. Marco Metodológico.....	44
3.1. Materiales y métodos .....	44
3.2. Selección de artículos científicos .....	45
3.2.1. Tratamiento de datos .....	46
3.3. Selección de la especie bacteriana de mayor productividad de PHAs .....	47
3.3.1. Selección y análisis de los genes involucrados en la producción de PHAs ....	48
3.3.2. Elaboración de un árbol filogenético.....	49
3.3.3. Simulación de reacción de la cadena polimerasa .....	49
3.3.4. Diseño de primers para identificar cepas con <i>phaC</i> .....	50
3.4. Elaboración de un escenario teórico de producción biotecnológica de PHAs.....	50
3.6. Análisis Estadístico .....	51
CAPÍTULO IV.....	52
4. Resultados y discusión.....	52
4.1. Selección de la especie bacteriana de mayor productividad de PHAs .....	52
4.1.1. Selección del género productor de PHAs .....	52
4.1.2. Selección de especies de mayor importancia biotecnológica .....	54
4.1.3. Análisis filogenético entre las especies seleccionadas .....	55
4.1.4. Selección de la cepa por su rendimiento de PHAs .....	56
4.1.5. Descripción genética de la cepa seleccionada .....	60
4.1.6. Selección de moléculas producidas por <i>C. necator</i> .....	60

4.2. Selección del metabolismo involucrado en la producción de PHAs.....	62
4.2.1. Selección de genes.....	63
4.2.2. Enzimas involucradas en la producción de PHAs.....	63
Acetil-CoA acetiltransferasa ( <i>phaA</i> ).....	64
Acetoacetil-CoA reductasa ( <i>phaB</i> ).....	65
Ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa ( <i>phaC</i> ).....	66
4.2.3. Diseño de primers.....	66
4.2.4. Identificación de cepas productoras de PHAs con un par de primers para <i>phaC</i> .....	68
4.3. Escenario teórico para la producción biotecnológica de PHAs.....	70
4.3.1. Proceso Upstream.....	70
Selección y análisis del microorganismo.....	70
Cultivo del microorganismo.....	72
Medio de cultivo para conservación.....	72
Medio de cultivo para crecimiento y fermentación.....	75
Parámetros de cultivo a escala laboratorio.....	76
Tipo de sustrato y concentración.....	78
Tratamiento de la melaza.....	79
Producción de PHAs con melaza.....	80
4.3.2. Proceso de Downstream.....	81
Recuperación y purificación de PHAs.....	81
Purificación de PHAs.....	85
Cuantificación de PHAs.....	85
Caracterización de PHAs.....	88

CAPITULO V.....	89
Conclusiones.....	89
Recomendaciones.....	90
Bibliografía.....	91
ANEXOS.....	110

### Contenido de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Principales bacterias productoras de PHAs .....	32
<b>Tabla 2:</b> Softwares empleados en el proceso experimental del presente proyecto. ....	45
<b>Tabla 3:</b> Parámetros adecuados para la producción de PHAs a escala laboratorio.....	47
<b>Tabla 4:</b> Parámetros de PCR.....	49
<b>Tabla 5:</b> Características genómicas de <i>C. necator</i> H16.....	60
<b>Tabla 6:</b> Descripción de las enzimas de <i>C. necator</i> H16 involucrados en la biosíntesis de PHAs.....	64
<b>Tabla 7:</b> Diseño de primers para identificar la presencia de los genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , <i>phaC</i> en <i>C. necator</i> H16. ....	67
<b>Tabla 8:</b> Diseño de primers en base a las secuencias conservadas de <i>phaC</i> en distintos grupos bacterianos .....	69
<b>Tabla 9:</b> Métodos de tinción para determinar la presencia de PHAs.....	71
<b>Tabla 10:</b> Medio de cultivo y parámetros de pH y temperatura recomendados para la conservación de una cepa productora de PHAs.....	72
<b>Tabla 11:</b> Medios de cultivo propuestos para la biosíntesis de PHAs usando <i>C. necator</i> H16.....	75
<b>Tabla 12:</b> Métodos de extracción de PHAs.....	84

## Contenido de Figuras

<b>Figura 1:</b> Morfología de los gránulos de PHA acumulados por <i>Cupriavidus necator</i> a una concentración de 48% de la masa celular seca (Gahlawat, 2019). .....	28
<b>Figura 2:</b> Conformación proteica de un gránulo de PHA (Koller, 2020) .....	30
<b>Figura 3:</b> Biosíntesis de PHB en bacteria .....	31
<b>Figura 4:</b> Ciclo de la reacción de cadena de la polimerasa.....	39
<b>Figura 5:</b> Selección de artículos por criterios de inclusión y exclusión.....	46
<b>Figura 6:</b> Grafo de selección de géneros y especies de mayor grado. ....	53
<b>Figura 7:</b> Árbol filogenético de las especies de mayor importancia para la producción de PHAs según las referencias analizadas .....	56
<b>Figura 8:</b> Rendimiento en la producción de PHAs por las cepas de <i>C. necator</i> . El color de los marcadores está mediado por el tipo de molécula y el tamaño por el tiempo de estudio siendo 24 horas el tiempo mínimo y 72 horas el tiempo máximo en cultivo.....	57
<b>Figura 9:</b> Clustering para la verificación del rendimiento en la producción de PHAs descritos por los autores mencionados.....	58
<b>Figura 10:</b> Rendimiento de gPHAs/gBiomasa seca. El color de los marcadores representa a la molécula biosintetizada y el tamaño se refiere al tiempo de fermentación.....	59
<b>Figura 11:</b> Análisis de redes sociales artificiales para los PHAs producidos por diferentes cepas de <i>C. necator</i> . .....	61
<b>Figura 12:</b> Biosíntesis de Poli- $\beta$ -hidroxibutirato a partir de Acetil-CoA generado por la intervención de las enzimas traducidas de los genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> , <i>phaC</i> .....	62
<b>Figura 13:</b> Estructura enzimática de Acetil-CoA acetiltransferasa (A). Subunidades del complejo enzimático diferenciadas por diferentes colores $\alpha - \beta$ y $\delta - \gamma$ forman sus dímeros de actividad enzimática entre sí. (B). Intensidad de la actividad enzimática el color azul.....	65
<b>Figura 14:</b> (A). Estructura enzimática de <i>phaB</i> con las subunidades diferenciadas por distintos colores. (B). Intensidad de la actividad enzimática las moléculas de color naranja son las participantes en la reducción de Acetoacetil-CoA.....	65

**Figura 15:** Estructura enzimática de PHA sintasa o Ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa. (A). Dímero con la ubicación de las dos subunidades diferenciadas por colores (B). Intensidad de la actividad enzimática, en el centro los colores cálidos representan la act..... 66

**Figura 16:** Simulación electroforética de los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs. A) Resultado de la PCR para el gen phaA con 876 nucleótidos. B) Resultado de la PCR para el gen phaB con 744 nucleótidos y C) PCR de phaC con 1115 nucleótidos ..... 68

**Figura 17:** Alineamiento múltiple de aminoácidos correspondientes a la secuencia peptídica de la enzima polihidroxialcanoato sintasa cuyo gen se denomina phaC..... 69

**Figura 18:** Frecuencias en el empleo de medios de cultivo para el mantenimiento en las investigaciones analizadas en el presente proyecto. .... 74

**Figura 19:** Frecuencias de los tiempos empleados para la fermentación durante la producción de PHAs en operaciones tipo batch. .... 78

**Figura 20:** Frecuencia de empleo de diferentes fuentes de carbono empleadas en el proceso de producción de PHAs. .... 79

**Figura 21:** Proceso de recuperación y purificación de PHAs a partir de un bioproceso fermentativo. .... 83

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La producción convencional de plásticos derivados del petróleo ha generado incalculables concentraciones de residuos contaminantes como aceites, polímeros, entre otros, esto ha impactado negativamente sobre los ecosistemas acuáticos, terrestres afectando a distintas formas biológicas y microbiológicas e incluso a los seres humanos, además del rápido agotamiento de recursos fósiles no renovables. La búsqueda de una alternativa para producción de materiales sustitutos del plástico convencional se ha vuelto un reto, ya que se pretende cumplir con la misma función polimérica y así lograr reducir el impacto ambiental.

Existen diversos estudios que han abierto la posibilidad de producir plásticos biodegradables a partir de la biosíntesis microbiana. Según (Bengtsson et al., 2017), los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopoliésteres no tóxicos, biodegradables, biocompatibles y presentan propiedades físicas de resistencia y durabilidad que se asemejan a los plásticos convencionales. Investigaciones similares establecen que la producción a gran escala de PHAs tiene limitaciones de producción elevado en comparación con los plásticos convencionales y están limitados principalmente por la fuente de carbono residual que necesita de una hidrolización previa para su uso, generando gastos de operación (Long Huang et al., 2017).

Según Samorì et al., (2015), los PHAs han llamado la atención debido a propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, ausencia de toxicidad y carcinogénesis, además son sintetizados por microorganismos usando sustratos provenientes de desechos industriales y presentan características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno. A pesar de las ventajas ambientales de los PHA frente a los plásticos petroquímicos, el problema fundamental que todavía afronta la producción de este polímero es su costo de producción (Takahashi et al., 2017). Cuando los PHAs se sintetizan, se acumulan en el citoplasma de las células bacterianas en forma de gránulos, que tienen un tamaño entre 0,2 y 0,5  $\mu\text{m}$ . Las bacterias los sintetizan como fuentes de carbono almacenadas en vesículas, probablemente cumplen con otras funciones en la célula bacteriana (C. Kourmentza et al., 2018).

Las recientes legislaciones y regulaciones contra el uso de productos plásticos han propiciado la búsqueda de nuevos materiales y sus aplicaciones. Los PHAs son la alternativa microbiana más prometedora y entre estos podemos encontrar una multitud de usos en diversas industrias como alimentaria, cosmética, médica, agrícola, entre otras. Teniendo en cuenta lo expuesto, los PHAs como materiales, tienen cada vez más importancia sobre un amplio rango de disciplinas, lo cual contribuye a acrecentar la necesidad de seguir investigando sobre estos materiales, con el fin de poder reducir y acabar eliminando el consumo de plásticos de fuentes fósiles.

Las Bacterias utilizan los PHAs como reservas de energía y carbono para poder superar condiciones desfavorables, como pueden ser cambios de temperatura, presencia de peróxido de hidrógeno, irradiación ultravioleta, elevada presión osmótica o deficiencia de nutrientes entre otros (Reis et al., 2011).

Hasta la fecha, la mayoría de estas bacterias productoras de PHA se clasifican como gramnegativas, aunque se ha descrito un número limitado de bacterias grampositivas productoras de PHAs correspondientes a los géneros: *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*. A nivel global, las bacterias gramnegativas productoras de PHAs a las que más se recurre se corresponden con las especies: *Aegialites latus*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* recombinante y *Azotobacter vinelandii* (Raza et al., 2018). Actualmente *Cupriavidus necator* es el microorganismo más estudiado para la producción rentable de PHA (Aramvash et al., 2015).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son productoras naturales de PHAs de cadena media, ya que contienen toda la maquinaria para sintetizar estos poliésteres a partir de diferentes fuentes de carbono. Este género bacteriano ha sido elegido por ser metabólicamente versátil y tolerar diferentes fuentes de carbono como una fábrica celular eficiente para la producción de PHAs. Estudios recientes se centran en el diseño de cepas con una capacidad aumentada para acumular PHAs, modificando sus vías biosintéticas y mejorándolas (Davis et al., 2013).

En los últimos años, la implementación de herramientas bioinformáticas en la biosíntesis de PHAs ha sido un eje esencial para el desarrollo de alternativas en la producción de bioplásticos (Montenegro et al., 2017). Un ejemplo es la investigación de herramientas de biología sintética disponibles en *P. putida* KT2440 para la optimización del metabolismo de PHAs. Desde la

publicación y la reciente revisión del genoma de *P. putida* KT2440, se ha invertido mucho esfuerzo en explotar estas capacidades en aplicaciones biotecnológicas (Davis et al., 2013). Algunos de los desafíos de la biología sintética son la eliminación de rasgos no deseables y la mejora de los ventajosos, la inserción de nuevas actividades y comprender la funcionalidad de circuitos genéticos y metabólicos (Špoljarić et al., 2013).

## **1.2. Problema**

Los plásticos sintéticos derivados del petróleo tienen características integrales de resistencia, ligereza y durabilidad, pero no poseen tipologías degradables, por ende, su uso es problemático, afectando directamente al ecosistema y a la salud humana. Como consecuencia, la búsqueda de una alternativa para degradar estos plásticos se orienta hacia el uso de microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos (Raza et al., 2018). Sin embargo, este proceso de biodegradación se torna muy lento, presenta costos elevados de operación y ciertos microorganismos no pueden degradar moléculas específicas que constituyen los plásticos como es el polietileno, el tereftalato los cuales se calculan que en 100 años se degradarían menos del 0,5% (Ching et al., 2016). Lo mencionado incita a prospectar nuevas alternativas como; como es la producción de polímeros de base biológica, denominados bioplásticos.

Los bioplásticos han sido estudiados por varias comunidades científicas provocando un enorme incremento de estudios durante el periodo 2014 y 2016 y han desarrollado procesos como es el uso de materiales lignocelulósicos, biorrefinería de residuos, residuos de producción por pirólisis, entre otros para producir materiales biodegradables como el ácido poliláctico, polihidroxicanoatos a base de almidón y muchos más. Los bioplásticos son producidos por una gran variedad de microorganismos y aunque son ecológicamente amigables con el ambiente, tienen desventajas por sus costos de producción, problemas en el reciclaje, baja disponibilidad de materia prima entre otros (Rodríguez-Perez et al., 2018). Esto conlleva a la búsqueda de alternativas de producción y comercialización industrial con la finalidad de promover la tecnología sostenible.

La producción polihidroxicanoatos (PHA) se consideran una alternativa sustentable ya que son sintetizados por microorganismos a partir de sustratos con bajo o sin valor económico como es la caña de azúcar, bagazo, almidón y en general de recursos renovables (Raza et al., 2018). Estudios preliminares sobre la obtención de PHAs promueven el desarrollo de futuros trabajos de investigación que abarquen problemáticas de transformación y optimización en la producción y

acumulación de estos polímeros. Una de las limitaciones para su industrialización a gran escala, es el alto costo de producción en comparación con los plásticos convencionales (Rodríguez-Perez et al., 2018). Por otro lado, investigaciones que han logrado obtener PHAs por bacterias se cuestionan sobre la importancia y actividad de los genes que intervienen en la producción de PHAs. Por lo que, la búsqueda de géneros microbianos que produzcan PHAs y el análisis genético en este proceso, son un campo de importancia investigativa que ayudarán en el desarrollo de nuevas alternativas para la producción de bioplásticos.

### **1.3. Justificación**

La producción de polihidroxicanoatos es considerada como una alternativa sustentable en remplazo de los plásticos convencionales, ya que su interés radica en el bajo impacto ambiental de producción a partir de microorganismos como bacterias en ciertas condiciones de cultivo; pH, temperatura, tipo de sustrato, etc. Se estima que existen alrededor de 300 especies microbianas (*Bacillus*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*) capaces de sintetizar poliésteres naturales pertenecientes a los PHAs (Raza et al., 2018).

Para que la producción de PHAs de origen bacteriano sea rentable, se deben considerar algunos factores críticos como: la bioprospección y selección de cepas bacterianas potenciales, rutas biosintéticas, herramientas bioinformáticas y tecnologías avanzadas con el objetivo de prever información fiable y no fracasar en el desarrollo in vivo, obteniendo también la fuente de carbono y nitrógeno, y procesos rentables de purificación, ya que, hasta la actualidad el desafío sigue siendo desarrollar un bioproceso con alta eficiencia de conversión de fuentes de carbono en PHAs al más bajo costo de producción (Rodríguez et al., 2018). Los rendimientos finales y el costo de PHAs dependen de la capacidad de acumulación de PHAs en las bacterias. Por lo tanto, los procesos de producción están estrechamente relacionados con la biodisponibilidad de la fuente de carbono y las condiciones ambientales como la temperatura, pH, entre otras que sean adecuadas para el efecto.

La producción de PHAs es más sostenible que la producción de los polímeros sintéticos considerando el consumo de energía y las emisiones de gases de efecto invernadero. Existen industrias que le apuestan a la economía circular, esta ha ganado importancia como una extensión de la sostenibilidad implementando productos que sean amigables con el ambiente y proporcionen

aplicaciones comerciales útiles. Por lo cual, se sigue invirtiendo en investigaciones que aporten nuevas alternativas de producción de bioplásticos (De Donno Novelli et al., 2021).

La biosíntesis de PHAs requiere de más estudios que corroboren datos y resultados que se pueda aplicar en el futuro. El desarrollo de nuevas estrategias de búsqueda y aprovechamiento de microorganismos nativos para evitar el uso de microorganismos modificados debido a que la mayoría son patentados y de difícil adquisición ya que son clave para sostener esta alternativa de producción de polímeros. El uso de la biología computacional permite potenciar la búsqueda de microorganismos ideales para la producción de PHAs, economizando gastos experimentales y obteniendo datos necesarios para implementar el bioproceso en un escenario *in vivo* (Oliveira-Filho et al., 2021).

Existen investigaciones que han logrado obtener PHAs a partir de bacterias, como es el caso de (Favaro et al., 2019) que requirieron de un análisis genético involucrado en la biosíntesis de PHA, haciendo uso de aplicaciones bioinformáticas para la búsqueda de géneros microbianos que produzcan polihidroxialcanoatos junto con el análisis de genes que intervienen en este proceso, los cuales permitirá diseñar posibles alternativas de producción de bioplásticos. Por esta razón, se planteó el objetivo de evaluar la producción biotecnológica de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en bacterias mediante biología computacional.

#### **1.4. Marco legal**

La Constitución de la Republica del Ecuador, vigente desde (2008), Ley Orgánica de Soberanía Alimentaria, (2018) y Código Orgánico del Ambiente, (2017) mencionan artículos relevantes para el desarrollo de este trabajo de investigación, relacionados con el desarrollo de alternativas en la producción de bioplásticos que se vinculan de forma directa con el cuidado del agua, suelos, biodiversidad y salud.

Tomando en cuenta la alta contaminación global con desechos de materiales plásticos obtenidos por combustibles fósiles, es necesario generar nuevas alternativas para remplazarlos y cumplir con las normativas vigentes en el Constitución de la Republica del Ecuador, (2008). El uso de la biotecnología industrial es una alternativa para remplazar a los plásticos convencionales mediante la producción de biopolímeros por microorganismos nativos de la nación. Sin embargo,

existen limitaciones para su obtención, al ser sintetizados por microorganismos a partir de sustratos que generalmente son recursos renovables.

Estas posibles alteraciones desvinculan del marco legal ecuatoriano a los procedimientos biotecnológicos. Sus consecuencias también se pueden respaldar en convenios, reglamentos, tratados o protocolos internacionales como: Convenio sobre Diversidad Biológica, (1992), Protocolo de Cartagena (2018) y Protocolo de Nagoya (2017), el cual ratifica el acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad (2011). Por esta razón es importante realizar estudios e investigaciones previas sobre los efectos del uso de microorganismos y recursos renovables para evitar contaminaciones secundarias.

De acuerdo con lo mencionado, el art. 385 de la Constitución de la República del Ecuador expresa que la difusión de conocimientos científicos y tecnológicos mejoran la calidad de vida, es por esta razón que la búsqueda de especies bacterianas productoras de polihidroxicanoatos para la obtención de bioplásticos aportará con nuevos conocimientos para la aplicación de esta nueva alternativa. Por lo tanto, se interpreta en el art. 350 que el sistema de educación superior apoya la investigación científica y tecnológica; la innovación, promoción, desarrollo y difusión de los saberes y las culturas; la construcción de soluciones para los problemas del país, en relación con los objetivos del régimen de desarrollo (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

El Acuerdo Ministerial N°034 emite “los lineamientos para el fomento de los bioemprendimientos como estrategia de conservación del patrimonio natural, mediante el uso sostenible de la biodiversidad (Art. 1). Dichos lineamientos serán aplicables a las “iniciativas público, privadas, academia y asociaciones comunitarias comprometidas con iniciativas de reducción de la deforestación sobre las cuales se fomentará el desarrollo de los bioemprendimientos, orientados hacia una bioeconomía sostenible como una estrategia de conservación del patrimonio natural, mediante el uso sostenible de la biodiversidad nativa en todo el territorio nacional, conforme a la normativa ambiental vigente”. Tomando en cuenta este acuerdo el actual gobierno lo emite como estrategia de conservación del patrimonio natural, para poder hacer uso adecuado de la biodiversidad. Dichos lineamientos fomentará el desarrollo de los bioemprendimientos orientados hacia una bioeconomía sostenible, (Ministerio del Ambiente, 2019)

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1 General**

- Evaluar la producción biotecnológica de Polihidroxicanoatos (PHAs) en bacterias mediante biología computacional.

### **1.5.2. Específicos**

- Seleccionar las especies bacterianas de mayor productividad de PHAs mediante análisis de redes sociales artificiales (ASN).
- Analizar los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs utilizando aplicaciones bioinformáticas.
- Elaborar un escenario teórico para la producción biotecnológica de PHAs a escala laboratorio.

## **1.6. Hipótesis de la investigación**

La producción biotecnológica de PHAs a partir de microorganismos bacterianos se puede evaluar mediante biología computacional

## **1.7. Pregunta directriz**

¿Es posible estudiar la producción de PHAs de forma biotecnológica a partir de microorganismos bacterianos usando biología computacional?

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Bioplásticos

Los bioplásticos son materiales biodegradables derivados de organismos biológicos que se pueden utilizar para reducir el problema de la contaminación ambiental generada por la industria de los plásticos derivados del petróleo. Los bioplásticos son biopolímeros maleables elaborados a partir de compuestos químicos inducidos o sintetizados por organismos como bacterias, hongos o plantas modificadas genéticamente. A diferencia de los plásticos tradicionales a base de hidrocarburos, los bioplásticos están sintetizados de recursos renovables y son biodegradables (Reis et al., 2011).

El primer bioplástico conocido fue el polihidroxiбутирато (PHB), descubierto en 1926 por Maurice Lemoigne utilizando la bacteria *Bacillus megaterium*. La importancia del descubrimiento de Lemoigne se mantuvo sin importancia por mucho tiempo. Esto se debe principalmente a la abundancia y bajos costos del petróleo en esa época. La crisis del petróleo de mediados de la década de 1970 activó el interés por encontrar alternativas a los productos derivados del petróleo. Desde entonces, inició el auge de la genética molecular y la tecnología del ADN recombinante basándose en los principios investigativos de Lemoigne para producir biopolímeros. A principios del siglo XXI, se habían establecido la estructura, proceso de fabricación y el uso de varios tipos de bioplásticos (Gahlawat, 2019).

Los bioplásticos utilizados o estudiados incluyen derivados de polihidroxiácido alcanoato (PHAs), sintetizados por microorganismos especializados. Estos se han convertido en el mejor material para fabricar botellas y películas de embalaje biodegradable, ya que los enlaces químicos entre los monómeros de estos plásticos son rotos por microorganismos. Los polímeros también son de alto interés en aplicaciones médicas, ya que los productos de degradación son metabolitos naturales (Koller, 2020).

Los bioplásticos representan actualmente una pequeña proporción en la producción mundial de plásticos. Los procesos de industrialización tienen bajos rendimientos y sus costos de producción son elevados. Pese a ello, la actualización en la ingeniería genética y metabólica da lugar a cepas microbianas y vegetales que pueden mejorar significativamente los rendimientos al

mismo tiempo que reducen los costos generales. Estos factores presentan un potencial expansivo en el mercado de los bioplásticos en un futuro próximo (Rodríguez-Perez et al., 2018).

### **2.1.1. Tipos de bioplásticos**

Los bioplásticos cubren una amplia gama de polímeros a base de monómeros orgánicos que presentan una variedad de propiedades y aplicaciones. Constantemente se descubren y prueban nuevos biomateriales con dichas características (Gahlawat, 2019). Entre ellos, se mencionan cinco clasificaciones de bioplásticos de mayor importancia:

#### ***Bioplásticos a base de almidón***

Un bioplástico simple se puede fabricar a base de almidón de maíz y a menudo son mezclados con poliéster biodegradable. Por ejemplo, se ha desarrollado con éxito fundas para artículos electrónicos hechas a partir de plástico compostable a usando almidón. Se esperan más posibilidades para bolsas compostables que tendrán aplicaciones en jardines, cocinas, artículos desechables para la industria de la restauración y varios tipos de envases (Brojanigo et al., 2020).

#### ***Bioplásticos a base de celulosa***

Están elaborados a partir de ésteres de celulosa y derivados de la celulosa. Las principales aplicaciones de los plásticos celulósicos son termoplásticos, marcos de anteojos, dispositivos electrónicos, entre otros. Los productos moldeados son un importante segmento de aplicación para los plásticos celulósicos y se espera que esta tendencia continúe evolucionando. En estos plásticos, las emisiones de dióxido de carbono son bajas en comparación con la producción de plásticos a partir de petróleo (Koller, 2020).

#### ***Bioplásticos a base de proteínas***

Se elaboran a partir de fuentes proteicas como el gluten de trigo, la caseína y la leche. Los biopolímeros a base de proteínas se han convertido en una importante alternativa para el envasado de alimentos. Se han logrado avances significativos en la producción de películas y recubrimientos a base de proteínas de origen vegetal (Koller, 2020).

### ***Bioplásticos a base de polietileno de cultivo ecológico***

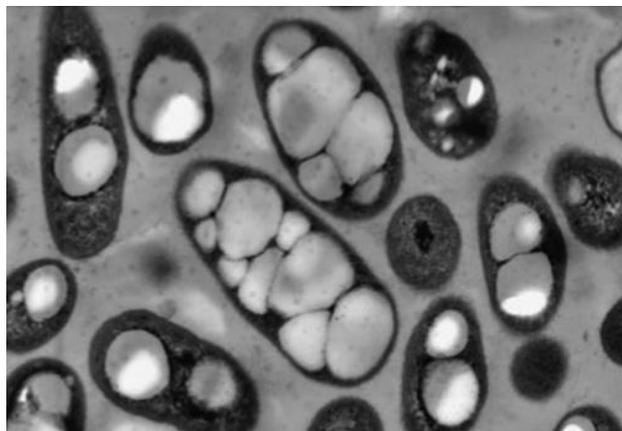
Son creados a partir del polietileno fabricado mediante la fermentación de materias primas agrícolas como la caña de azúcar y el maíz en lugar de combustibles fósiles. El polietileno de alta densidad es usado en una variedad de aplicaciones de empaque, en las que se incluyen: Cajas, bandejas, botellas de leche, tapas de empaques de alimentos, botes, tambores, contenedores industriales, entre otros (Gahlawat, 2019).

### ***Bioplásticos a base de poliéster alifático***

Son sintetizados a partir de una colección de poliésteres de base biológica que incluyen PLA, PHA, PGA y otros. Presentan sensibilidad a la hidrólisis, es decir, es sensible al agua y se puede mezclar con otros compuestos. Los poliésteres de base biológica que se utilizan comercialmente o que se están estudiando actualmente incluyen ácido poliláctico (PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), polihidroxitirato (PHB) y poli(3-hidroxivalerato). Sin embargo, existen pocos representantes en el mercado (Castilho et al., 2009).

## **2.2. Polihidroxicanoatos**

Los polihidroxicanoatos son moléculas orgánicas sintetizadas por ciertas plantas, hongos o bacterias especializadas en la producción de PHA, su peso molecular promedio está entre 4 y 10 Da. Las propiedades materiales de estos biopolímeros son similares a las de los plásticos convencionales tradicionales como es el caso del polipropileno. Los homopolímeros de PHB son altamente cristalinos con propiedades rígidas pero quebradizas, tienen una estructura cristalina en espiral similar a otros copolímeros y cuando se trata de fibras, se comporta como un material elástico duro. Los copolímeros como el P(3HB-co-3HV) y el mcl-PHA son menos rígidos, quebradizos y conservan la mayoría de las propiedades mecánicas del PHB (Gahlawat, 2019).



**Figura 1:** Morfología de los gránulos de PHA acumulados por *Cupriavidus necator* a una concentración de 48% de la masa celular seca (Gahlawat, 2019).

El comportamiento de fusión y cristalización de PHA fue estudiado recientemente y se demuestra que el PHA muestra múltiples picos de fusión olor y fusión–recristalización–refusión. Al procesar biopolímeros, es importante conocer el punto de pirólisis, recientemente se encontró que la descomposición de PHB, comienza a los 246 °C, mientras que la descomposición de PHBV es de 260 °C. Esto indica que la presencia de ácido valérico en la cadena mejora la estabilidad térmica del polímero (Impallomeni et al., 2018).

Además del PHB, hay muchos otros PHA compuestos por ácidos grasos 3-hidroxi, también se conocen ácidos grasos que contienen un grupo hidroxilo en la posición 4, 5 o 6 y grupos laterales que contienen sustituyentes o grupos insaturados. En el metabolismo bacteriano, el sustrato de carbono se convierte en tioésteres y hidroxiacil-CoA, esta molécula crea un enlace éster con los grupos hidroxilo de monómeros adyacentes. La reacción de polimerización es catalizada por la PHA sintasa de la célula, en todos los PHAs caracterizados hasta la actualidad, el átomo de carbono sustituido con hidroxilo tiene una configuración estereoquímica (R) y se aprecian muchas variaciones en la longitud y composición de la cadena lateral (Koller, 2020).

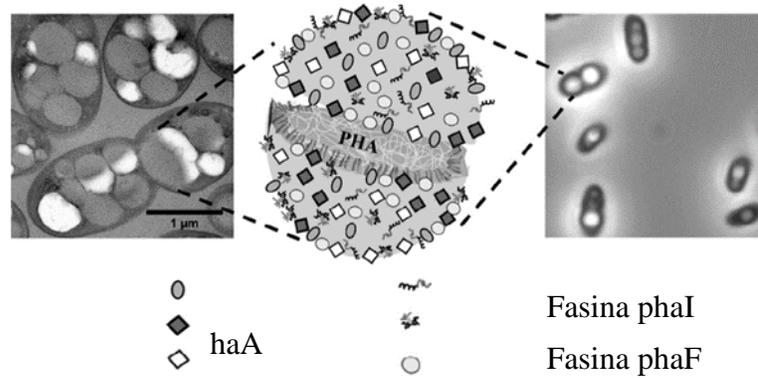
Estas variaciones hacen que la familia de polímeros PHAs sea adecuada para muchas aplicaciones potenciales e industriales. El PHB y el PHV (ácido 3-hidroxivalérico) forman una clase de PHA comúnmente conocida como PHA de cadena corta (scl-PHA). Por el contrario, el PHA de cadena media (mcl-PHA) se compone de ácidos grasos 3-hidroxi de C6 a C16 carbonos. Se ha sugerido que los "homopolímeros" de PHB sintetizados por bacterias siempre contienen menos del 1% en moles de monómero de ácido 3-hidroxivalérico (Kataria et al., 2018).

Los copolímeros formados de PHB se forman utilizando sustratos mixtos, como una mezcla de glucosa y ácido valérico. Los microorganismos convierten el sustrato en scl-PHA como poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) o poli (3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato) (PHB4B). Además, se han reportado copolímeros de PHBHx que contienen unidades de 3-hidroxi-hexanoato y otras mcl-PHA. Si se utiliza una capa mixta, el polímero resultante se copolimerizará aleatoriamente (Vega et al., 2016).

### **2.2.1. Biosíntesis de PHAs**

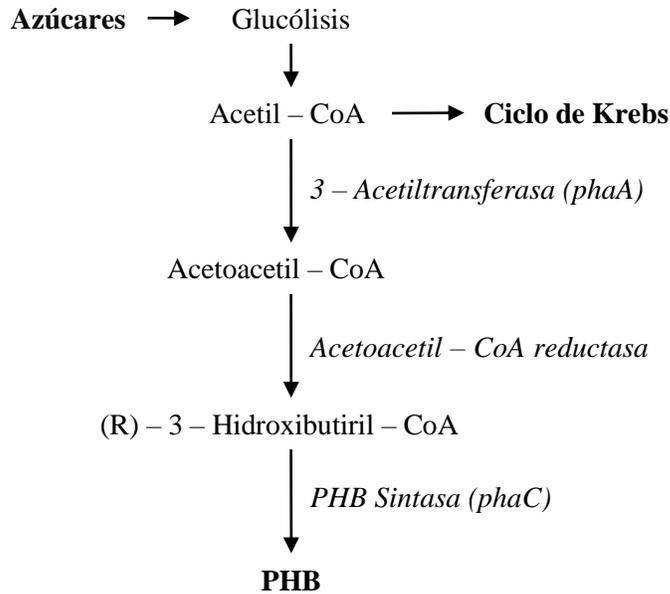
El PHA es sintetizado por muchos organismos. los principales candidatos para la producción a gran escala de PHA son las plantas y las bacterias. Las células vegetales solo pueden hacer frente a rendimientos de producción de PHA inferiores al 10% w/w de peso seco. La alta producción de PHA en las plantas de aproximadamente 10 – 40 % w/w de peso seco, afecta negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas. Esto contrasta con las bacterias en las que el PHA acumula hasta el 90 % w/w de la masa celular seca (Gahlawat, 2019).

La acumulación de PHA es una forma natural para que las bacterias almacenen carbono y energía cuando el suministro de nutrientes está desequilibrado. La restricción más común es el nitrógeno, pero para algunas bacterias, la restricción más efectiva está relacionada con el oxígeno o fósforo. Debido a que los PHAs son insolubles en agua, el polímero se acumula en gránulos intracelulares, esto es beneficioso para que las bacterias almacenen el exceso de nutrientes dentro de las células, especialmente si la compatibilidad fisiológica general no se ve comprometida. Al polimerizar el intermedio soluble en partículas insolubles, las células no están sujetas a cambios en el estado osmótico. Por lo tanto, evita que estos valiosos compuestos se liberen al ambiente extracelular. La superficie de los gránulos de PHA está cubierta con una capa de fosfolípidos y una proteína llamada fasin, esta es clase predominante de proteínas en la interfase de los gránulos afecta al número y tamaño de los gránulos de PHA. la expresión del gen fasin sirve para cerrar los gránulos empaquetados en la célula bacteriana (Koller, 2020).



**Figura 2:** Conformación proteica de un gránulo de PHA (Koller, 2020)

Las bacterias producen acetil-coenzima A (acetil-CoA) en el metabolismo, que se convierte en PHB mediante tres enzimas biosintéticas. En el primer paso, la 3-cetotilasa (*phaA*) se une a dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. La acetoacetil-CoA reductasa (*phaB*) permite que el NADH reduzca la acetoacetil-CoA a 3-hidroxi-butiril CoA. Y finalmente, la PHB sintasa (*phaC*) polimeriza la 3-hidroxi-butiril-CoA en PHB y libera coenzima-A. Solo los isómeros (R) se aceptan como sustratos para la polimerización de enzimas. Durante el crecimiento bacteriano normal, la coenzima A libre puede inhibir a la enzima 3-cetotilasa. Sin embargo, si se restringe la entrada de acetil-CoA en el ciclo de Krebs durante la restricción de nutrientes sin carbono y el exceso de acetil-CoA se envía a la biosíntesis de PHB (Koller, 2020).



**Figura 3:** Biosíntesis de PHB en bacteria

### 2.2.3. Clasificación de los PHAs

Los PHAs se clasifican según la estructura de sus monómeros, en el caso de que el polímero esté compuesto por un solo tipo de moléculas monoméricas se denomina homopolímero, si está compuesto por dos monómeros correspondientes, se denomina copolímero y si está formado por varios monómeros se trata de heteropolímeros. En función de lo mencionado, se conocen tres tipos de PHAs según la longitud de cadena que son: scl-PHA (short chain length), mcl-PHA (medium chain length) y lcl-PHA (long chain length) entre estas variaciones, la cadena alquílica varía entre 1 y 14 carbonos (Gahlawat, 2019).

Las características principales de los scl-PHA es que son frágiles y rígidos, por otro lado, los mcl-PHA son más flexibles y dotados de resistencia. El tamaño de la cadena de los PHA depende de la enzima sintasa debido a su especificidad hacia los sustratos y puede interferir en la unión de monómeros con distintos números de carbonos. En consecuencia, la composición molecular depende del sustrato y la afinidad de la enzima sintasa, así como también de la ruta biosintética. El PHB posee características muy similares al propileno que es un plástico común derivado del petróleo (Castilho et al., 2009).

#### 2.2.4. Bacterias productoras de PHAs

Según Lee, SY, Lee, Y. y Wang, F. (1999), existen más de 300 microorganismos que se utilizan para sintetizar PHAs, entre los más importantes están: *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinlandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Ralstonia eutropha* conocida también como *Cupriavidus necator* o *Alcaligenes eutrophus*, entre otras (Tabla 1). También se pueden producir mediante cepas modificadas genéticamente como *E. coli* y bacterias metilótrofas (Koller, 2020).

**Tabla 1:** Principales bacterias productoras de PHAs

Bacteria	PHA	Fuente de carbono	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	% PHA	Rendimiento (g/L.h)
<i>C. necator</i>	P(3HB)	Glucosa	164	121	76	2.42
<i>C. necator</i>	P(3HB)	CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>	91.3	61.9	67.8	1.55
<i>C. necator</i>	P(3HB)	Tapioca hidrolizada	106	61.9	57.5	1.03
<i>C. necator</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucosa	158	117	74	2.55
<i>A. latus</i>	P(3HB)	Sacarosa	143	71.4	50	3.97
<i>A. latus</i>	P(3HB)	Sacarosa	-	16.2	50	2.6
<i>A. vinlandii</i>	P(3HB)	Glucosa	40.1	32	79.8	0.68
<i>M. organophilum</i>	P(3HB)	Metanol	250	130	52	1.86
<i>C. violaceum</i>	P(3HB)	Ácido valérico	39.5	24.5	62	-
<i>P. extorquens</i>	P(3HB)	Metanol	233	149	64	0.88
<i>P. oleovorans</i>	P(3HHX-co-3HO)	n-octano	11.6	2.9	25	0.58

<i>P. oleovorans</i>	P(3HHX-co-3HO)	n-octano	37.1	12.1	33	0.32
<i>E. coli</i> recombinante	P(3HB)	Glucosa	101.4	81.2	80.1	-
<i>K. aerogenes</i> recombinante	P(3HB)	Almidón	37	24	65	-

### 2.2.5. Sustratos para la producción de PHAs en bacterias

La biosíntesis de la mayor parte de microorganismos productores de PHAs está relacionada con la reducción de la fuente de nitrógeno y alta concentración de fuente de carbono que generalmente son, ácidos grasos o azúcares (mono o disacáridos). En los últimos años, la biotecnología se ha enfocado en la producción de PHAs a partir de desechos orgánicos provenientes de la industria agraria, agroindustrial o pecuaria (Reis et al., 2011).

#### *Melazas*

Es una mezcla líquida derivada de la producción del azúcar de mesa sea de caña de azúcar o remolacha azucarera. La producción de PHAs a partir de melazas se ha estudiado usando *Cupriavidus necator* en donde se obtuvo que la elevada producción de PHB se genera en concentraciones aproximadas de 0.3 g/L., al elevar la concentración de melazas superando los 0.5 g/L, se observó un efecto inhibitorio. Sin embargo, los rendimientos varían con la variación en la concentración de la fuente de nitrógeno (Zakaria, 2014).

#### *Suero de leche*

Este subproducto es rico en lactosa y se puede emplear en la biosíntesis de PHAs usándola como fuente de carbono. Pero, solo pocas bacterias pueden asimilar la lactosa de forma directa para convertirla en biopolímeros. Por ende, se requiere de un pretratamiento para convertir la lactosa en PHAs, como puede ser hidrólisis o conversiones aeróbicas (Colombo et al., 2016).

### ***Residuos lignocelulósicos***

El bajo costo para la obtención de esta fuente de carbono hace que estos residuos sean de importancia biotecnológica ya que se pueden obtener de residuos de madera, pastos, entre otros. Y teniendo en cuenta que la celulosa es una cadena compleja formada a partir de la glucosa, necesariamente se requiere de un pretratamiento de hidrólisis utilizando ácido sulfúrico con la finalidad de liberar los monómeros de glucosa (M. Li y Wilkins, 2020).

### ***Glicerol***

El glicerol crudo obtenido en la producción de biodiesel después de la transesterificación de grasas con un alcohol es un subproducto que se encuentra en una proporción de 1/10 (glicerol/biodiesel) en el proceso catalítico. El rápido crecimiento en la producción de biodiesel ha generado una sobreproducción de glicerol que consecuentemente reduce el precio de este en el mercado y también abre la posibilidad de producir PHAs a partir de este compuesto (Moita et al., 2014).

#### **2.2.6. Extracción de los PHAs de bacterias**

Luego de finalizar el proceso de fermentación, las células que contienen PHAs en su interior se someten a una centrifugación para concentrar el contenido de biomasa. A esta masa de células bacterianas se le aplica tratamientos químicos a base hidróxido de sodio, cloroformo, hipoclorito de sodio, surfactantes o acetona con la finalidad de romper las matrices celulares. Otros tratamientos menos convencionales son las disrupción mecánica y disrupción enzimática. Finalmente, se extrae el polímero precipitando el contenido con metanol o etanol a una temperatura de 4 °C (Samorì, Abbondanzi, et al., 2015).

#### **2.2.7. Aplicaciones**

En la actualidad, los PHAs son considerados como biomoléculas de alto interés industrial en distintas áreas debido a su biodegradación y biocompatibilidad. Sin embargo, el plástico biodegradable tiene mayor interés en aplicaciones específicas en donde la pureza y biodegradabilidad son necesarias, entre las áreas de mayor importancia se tienen (Pakalapati et al., 2018):

### ***Industria de embalajes***

Los biopolímeros P(3HB) y P(3HB-co-3HV) son considerados como moléculas potenciales para sustituir a los plásticos convencionales provenientes de los hidrocarburos que se utilizan para los embalajes. Sin embargo, usando estos biopolímeros también se puede sintetizar cubiertas bioplásticas para el embalaje de comida ya que los PHAs son materiales que brindan protección al cartón o papel frente a los daños que se ocasionan por el alimento o condición ambiental como la temperatura o humedad necesaria para conservar los alimentos (Kalia, 2019).

### ***Médica y farmacéutica***

Al hidrolizar el P(3HB) se obtienen cuerpos cetónicos que son los intermediarios en el proceso de oxidación de ácidos grasos y por esta razón no son tóxicos para los animales incluyendo al ser humano, como efecto se ha diseñado un sinnúmero de aplicaciones médicas entre ellas se puede mencionar a ciertas cirugías secundarias o la liberación a largo plazo de los fármacos, suturas quirúrgicas o para algunas prótesis que se requieran absorber con el tiempo. Otra de las aplicaciones es la hidrólisis de los polímeros hasta obtener 3HB que se puede usar como sustituto de la glucosa para aplicarse por vía intravenosa durante la cirugía (Ching et al., 2016).

### ***Agricultura***

En esta área se ha diseñado un amplio rango de aplicaciones como para fabricar caños de sistemas de aspersión, materiales para controlar la liberación de pesticidas, herbicidas o fertilizantes, entre otras aplicaciones. En esta área no se requiere de una alta pureza del material por lo que presenta mayor rentabilidad (Reis et al., 2011).

### ***Otras aplicaciones***

Aparte de las aplicaciones mencionadas, se están estudiando aplicaciones en la industria del tabaco, industria alimenticia, tratamiento de aguas, xerografía, horticultura, entre otras. La empresa Biopol ha diseñado un sistema de redes de pesca que, de ser perdidas en el océano, se sumergen y se biodegradan con la finalidad de minimizar el impacto ambiental en los nichos marinos (Koller, 2020).

### **2.2.8. Mercado para la industria de PHAs**

El positivo crecimiento en la producción de los PHAs está estrechamente relacionado con la concientización sobre la protección ambiental. Para el 2018 se reportó una producción mundial de las 34000 toneladas de bioplásticos, siendo Europa el principal consumidor con un 46.68% mientras que Estados Unidos y China se ubican como los mayores productores debido a su alta tasa de inversión y disponibilidad de materia prima. Las principales aplicaciones en el mercado fueron para: embalajes (31.8%), servicios para alimentos (29.20%) y en las aplicaciones médicas con el (20.67%), su impulso para el consumo y producción está basado en la oferta y demanda regulada por los gobiernos con políticas protectoras del medio ambiente (Koller, 2020).

La diversidad de los plásticos biodegradables reside en la variación de las rutas de biodegradación. Su característica biodegradativa mediada por microorganismos permite una gestión alternativa al final de su vida útil, como el compostaje a escala industrial y doméstica, o la digestión anaerobia, facilitando el desarrollo de la economía circular. Aunque los bioplásticos siguen representando solamente el 1% de la producción total de plástico, se prevé un despliegue más amplio, esperándose que el mercado mundial de plásticos biodegradables alcance los 6,73 mil millones de dólares para 2025, siendo los principales impulsores India, Brasil y China, debido a la demanda en las economías emergentes de estos países (Wei et al., 2020). Mientras que el aumento del uso de bioplásticos en todos los sectores de mercado se ve impulsado por la demanda de productos sostenibles, debido a la concientización de la sociedad de reducir el impacto ambiental y la dependencia de los recursos no renovables.

La economía circular ha ganado importancia como una extensión de la sostenibilidad al abordar la implementación ambiental y proporcionar aplicaciones comerciales útiles. En este sentido, la producción de bioplásticos se la reconoce como una innovación de “productos verdes” (productos ecológicos, no contaminantes y reciclables); además, estos “biomateriales” están pensados para reducir el impacto ambiental y controlar la productividad sostenible, fomentando el desarrollo de productos ecológicos y mejorando así la imagen de las empresas que los suministran (Kachrimanidou et al., 2021).

De manera innovadora los bioplásticos se plantean como propuesta ecológica debido a sus características ya mencionadas y por ser una potente alternativa de los plásticos fósiles (Kumar et al., 2014). Es por ello que, la utilización de estos bioplásticos son una realidad creciente en nuestra

sociedad que se está desarrollando de forma ascendente y pretende desbancar el uso de los plásticos convencionales para así lograr una mejor gestión de los recursos no renovables empleando la biotecnología industrial, que permite un reemplazo de las tecnologías contaminantes por otras más sostenibles basadas en el uso de microorganismos y los productos obtenidos a partir de estos (Reis et al., 2011).

La Asociación Europea de Bioplásticos clasifica a los bioplásticos como: 1) Plásticos sintetizados a partir de fuentes renovables y 2) Biopolímeros degradables que cumplen con todos los criterios de las normas científicas reconocidas de biodegradabilidad y compostaje de plásticos como lo son los PHAs (Pittmann y Steinmetz, 2016).

### **2.3. Bioinformática**

La bioinformática es una ciencia que estudia los procesos biológicos en un ambiente computacional con fundamentos algorítmicos usando la información biológica previamente obtenida (Ranganathan et al., 2019). La bioinformática es un apartado de la biología computacional que usa la información genética, proteica o metabólica para el comportamiento de los sistemas biológicos (Sindi, 2007). Esta tiene distintas subáreas especializadas, entre las más importantes están: la anotación de secuencias en bases de datos biológicas, análisis de secuencias individuales o en grupos, clasificaciones filogenéticas o biología evolutiva, análisis de expresión génica, análisis de expresión y estructuración de proteínas, genómica comparativa, interacciones biomoleculares, actividades metabólicas, medición de biodiversidad, entre otras (Xiong, 2006).

#### **2.3.1. Análisis genéticos**

Los análisis genéticos son estudios del comportamiento de uno o varios genes involucrados en un proceso metabólico, este estudio considera los análisis *in vitro* y bioinformático (Xiong, 2006). En el análisis genético también se involucran las actividades enzimáticas ocasionadas por la alguna alteración en la secuencia nucleotídica como pueden ser: inserciones, deleciones, duplicaciones, entre otros. Estos cambios o alteraciones afectan a la estructura enzimática y puede cambiar la velocidad de reacción, afinidad enzimática o incluso inactivar a la proteína (Smolke, 2009).

### **2.3.2. Búsqueda de secuencias génicas**

La búsqueda de secuencias genéticas es una técnica bioinformática usada para localizar un patrón de nucleótidos responsables de la traducción de una proteína específica, este patrón puede ser total o parcial según el interés investigativo. También sirve para localizar segmentos de ADN conservativo que permitan analizar la filogenia de los organismos como es el caso de las secuencias ITS o 16S rRNA. Para realizar la búsqueda en una base de datos biológicos o dentro de una secuencia genómica total o parcial, se requiere de una plantilla o conjunto de nucleótidos. La búsqueda de secuencias es generalmente aplicada en la determinación de presencia o ausencia del segmentos genéticos de interés y se realiza mediante un algoritmo de búsqueda, el principal es conocido como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que es un programa de alineamiento de secuencias locales sea de ADN, ARN o proteínas (Christensen, 2019).

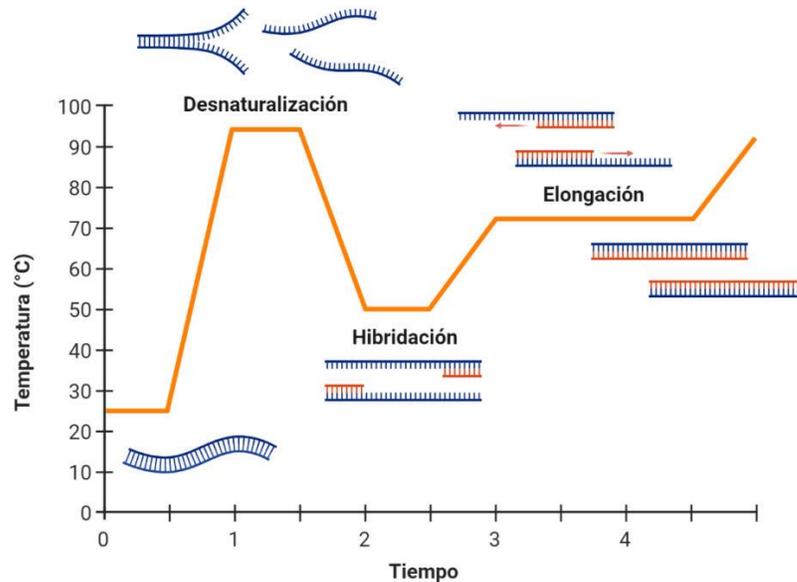
### **2.3.3. Diseño de primers o cebadores**

Es una técnica que consiste en el diseño de un par de secuencias conformadas por un grupo de nucleótidos que presenten características específicas como temperatura de unión entre nucleótidos complementarios, concentración de los nucleótidos CG, tamaño recomendado entre 20 y 30 nucleótidos y que tengan sentido 5' – 3' (Bolívar et al., 2014). Los primers o cebadores son un par de pequeñas secuencias, el uno está diseñado para que se una en sentido 5' – 3' de la cadena principal del ADN y el otro se diseña para que se una en sentido 5' – 3' de la cadena complementaria, esto tiene como finalidad el corte de un segmento de ADN de la muestra estudiada (Solano et al., 2007). El diseño de los primers aporta a un tipo de búsqueda de secuencias genéticas que, a diferencia de la búsqueda bioinformática con BLAST, se da por la aplicación de la PCR (Reacción de Cadena de la Polimerasa) (Sindi, 2007).

### **2.3.4. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que permite la multiplicación rápida de un segmento específico de ADN para estudiar en mayor detalle el segmento génico (Espinosa, 2007). La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, denominados primers o cebadores, nucleótidos (dNTPs), magnesio y enzima polimerasa de ADN. En un ambiente de laboratorio, la PCR debe realizarse usando un termociclador que permita generar ciclos térmicos para que el ADN se desnaturalice y se separen las doble hélices,

posteriormente se una a los cebadores y finalmente se extienda uniendo nucleótidos libres para sintetizar el segmento específico (Bolivar et al., 2014).



*Figura 4: Ciclo de la reacción de cadena de la polimerasa*

## 2.4. Minería de datos aplicada a la investigación

La minería de datos o data mining es un conjunto de técnicas empleadas para identificar y extraer patrones de importancia estadística a partir de un conjunto de datos almacenados en una base de datos (Zadissa y Apweiler, 2022). La minería de datos es usada para estudiar el comportamiento de la información que difícilmente se puede estudiar mediante la estadística convencional y directa. Por ende, se aplican transformaciones o agrupamiento de información que puedan expresarse en términos cuantitativos y así obtener los patrones que se someterán a análisis estadísticos convencionales (Persidis, 2000). Una de las técnicas de mayor aplicación son las redes sociales artificiales y redes neuronales artificiales (Velázquez y Aguilar, 2005).

### 2.4.1. Redes sociales artificiales

Las redes sociales artificiales o ASN (Artificial social network) es una interacción entre la información contenida en un conjunto de datos complejos que no pueden ser analizados con facilidad, la información se agrupa en nodos o vértices en función de su importancia, mientras que

el vínculo entre esta información se denominan aristas o grados (Bello, 2018). Los datos de las ASN se pueden analizar por distintas técnicas que se relacionan con los componentes del grafo.

### *Componentes de un grafo*

Los grafos empleados en un análisis de redes contienen componentes que se emplean como un tratamiento de la información implícita, estos componentes se presentan como un resultado numérico externo al grafo. Existen componentes observables como el caso de los nodos, aristas, aristas con pesos, centralidades de los nodos, entre otros, que se describen a continuación (Gutiérrez et al., 2010).

**Nodos o vértices:** Son los centros de convergencia de la información contenida en un grafo, se los conoce como los autores determinantes del comportamiento de la información (Cordón, 2013).

**Aristas o arcos:** Las aristas conectan a los nodos según su relación y se pueden presentar de dos maneras: conexión unidireccional entre dos nodos sea de salida o entrada y bidireccional entre dos nodos que comparten características (Cordón, 2013).

**Grados:** Es el número de aristas salientes o entrantes de un nodo y permite evaluar la medida de importancia, se clasifica en: Grados de salida que son el número de aristas que conectan a un nodo con el o los nodos que reciben su información (salida de información), grados de entrada es el número de aristas que conectan la información de uno o varios nodos con el nodo a receptor (entrada de información), grado medio, es el promedio entre los grados de entrada y los grados de salida pertenecientes a un nodo, grados con pesos, es el número de repeticiones que se presentan entre dos nodos unidos por una misma arista (Velázquez y Aguilar, 2005).

**Coefficiente de agrupamiento:** Es la medida de cohesión e integración de los actores mediante el agrupamiento de nodos o la reducción de rutas entre nodos (Velázquez y Aguilar, 2005).

**Camino o ruta:** Permite evaluar la separación entre nodos y mide como de alejados están dos nodos mediados por distintas rutas. Determina el efecto inverso del coeficiente de

agrupamiento y evalúa la relación que presentan los nodos en un grafo (Velázquez y Aguilar, 2005).

**Densidad:** Mide la cantidad de aristas que contiene un nodo, se incluyen los grados de entrada o salida y se dice que un grafo es denso cuando presenta una gran cantidad de aristas en función de su información global y que es disperso cuando presenta pocas aristas (Velázquez y Aguilar, 2005).

**Diámetro:** Mide la distancia entre pares de nodos y permite comparar dos o más grafos usando los valores de lejanía y cercanía entre dos nodos (Cordón, 2013).

**Centralidad:** Permite establecer y jerarquizar los nodos más influyentes del grafo o de un conjunto de nodos dentro del grafo mediante la evaluación de la cantidad de relaciones distribuidas entre los nodos (Cordón, 2013).

**Comunidades:** Es un componente que puede analizar la relación existente entre nodos o conjuntos de nodos que agrupados en función de sus características o patrones similares forman una comunidad (Cordón, 2013).

**Modularidad:** Permite medir la estructura de un grafo separándolo por módulos, grupos o comunidades mediante la evaluación de la fuerza que los divide. Cuando un grafo presenta alta modularidad se interpreta como la solidez entre nodos dentro de la comunidad (Cordón, 2013).

#### **2.4.2. Clustering basado en Algoritmos de clasificación**

El clustering es un apartado de la minería de datos usado en la representación de patrones de información agrupada que se realiza mediante la división de un conjunto de vectores en grupos o clústeres basados en criterios de clasificación o principios del algoritmo empleado. Estos clústeres contienen datos similares y en la minería de datos se los considera como aprendizaje no supervisado ya que no presentan etiquetas y se dividen por sus características internas. Los algoritmos de clasificación pueden basarse en la densidad, distribución, centroides o jerarquías de datos. El algoritmo más usado para agrupar datos aleatorios no supervisados es K-means (Caballero et al., 2019).

### *Algoritmo de clasificación k-means*

El algoritmo k-means permite iterar un conjunto de datos hasta dividirlo en k grupos independientes, el número de grupos tiene que ser asignado por el analizador. K-means realiza una división inicial de los datos en k grupos y los reclasifica hasta que sus grupos muestren un cambio en la agrupación (Bhattacharjee, 2020). Cada iteración permite evaluar el centroide de la población mediante la media de cada conjunto de elementos. Después de completar las iteraciones, se obtienen los k centroides finales, expresados como una coordenada en el plano que comprende los datos. Finalmente, los datos se distribuyen y se colocan en su conjunto correspondiente (Iqbal y Sheetlani, 2017).

### **2.5. Escenario teórico en la biotecnología**

Un escenario teórico es una explicación escrita sobre el proceso de producción de una planta industrial de cualquier índole. En el presente estudio, se considera un escenario teórico al proceso biotecnológico empleado o propuesto para la producción de PHAs a escala laboratorio, mismo que tiene la capacidad de escalabilidad hacia un ambiente industrial (Coats et al., 2016). Los escenarios biotecnológicos tienen distintas subdivisiones como son el caso del Upstream, Midstream y Downstream, cada uno tiene una serie de descripciones teóricas y en el caso práctico también tienen sus especificidades (Gahlawat, 2019).

En la descripción teórica del Upstream se toman en cuenta todas las operaciones que ocurren durante el montaje de los biorreactores, preparación de medios de cultivo, acondicionamiento de inóculos, parámetros fisicoquímicos del bioproceso, inducción metabólica (fermentación) entre otros (Du et al., 2012). El Upstream contempla las operaciones de producción de metabolitos por las células, en ciertos casos la siguiente operación está contemplada directamente en el Downstream esto dependerá de la configuración del biorreactor y arquitectura de la planta biotecnológica, caso contrario continuará con un proceso poco descrito conocido como Midstream (Gahlawat, 2019).

El escenario del Midstream abarca las operaciones de transporte y almacenamiento del producto generado por el Upstream que sería la fermentación. El término Midstream es más usado en la industria petrolera debido a que el transporte se genera en tuberías o vehículos específicos como trenes, buques, entre otros. En la industria biotecnológica, el midstream ocurre cuando se

requiere trasladar el fermentado a otra planta de extracción y purificación del metabolito para luego pasar al escenario final conocido como Downstream (Sanhueza, 2015).

El Downstream es el proceso final de una industria de refinación o purificación de un producto ya que extrae la molécula de interés industrial (Kunasundari et al., 2013). Sin embargo, en esta etapa se pueden involucrar varias plantas industriales ya que el metabolito o molécula de interés industrial puede ser parte de la materia prima de un producto comercial y para ello, la materia prima mencionada debe ser transportada lo que involucraría una etapa intermedia adicional (Bengtsson et al., 2017).

Cada una de las etapas o escenarios requieren de parámetros preestablecidos sea para fermentar el cultivo, transportar el fermento o almacenarlo, de igual forma para extraerlo o purificarlo. los parámetros requeridos en su mayoría son fisicoquímicos o energéticos (Argiz et al., 2021; Fradinho et al., 2019).

### **2.5.1. Establecimiento de parámetros**

Como se mencionó en el apartado anterior, entre los parámetros más usados están los fisicoquímicos que se refieren a las condiciones de temperatura, pH, conductividad, alcalinidad, entre otros relacionados al medio de cultivo, fermento o producto (Pohlmann et al., 2006; Reis et al., 2011). También están los parámetros energéticos que se refieren a la energía eléctrica, cinética u otra involucrada en la fermentación, transporte o almacenaje del medio de cultivo, fermento o producto (Wen et al., 2012). Estos parámetros son preestablecidos en base a un diseño de bioproceso previo y una evaluación de aplicabilidad en el proceso en ejecución o descripción teórica.

En el establecimiento de los parámetros también está involucrado el establecimiento del bioproceso ya que toda operación funciona con una arquitectura funcional y paramétrica. El establecimiento del bioproceso se relaciona con el tiempo, presión, agitación, volumen de medio lisis celular y extracción de los compuestos de interés (Danis et al., 2015; Van Thuoc et al., 2019). Este término es más usado en el Upstream ya que está relacionado con el crecimiento y actividad metabólica o enzimática del bioproceso (Coats et al., 2016).

## CAPITULO III

### 3. Marco Metodológico

#### 3.1. Materiales y métodos

El presente proyecto se realizó de forma computacional en la ciudad de Ibarra, tomando en cuenta el valor agregado que se le puede dar a los residuos de la industria azucarera para cultivar microorganismos bacterianos de gran interés biotecnológico. Esta aplicación depende de la selección de los microorganismos que en este caso se ejecutó mediante la minería de datos o *data mining* usando especies bacterianas con mayor adaptación y productividad de PHAs que fueron obtenidas de una revisión bibliográfica de artículos científicos afines.

Posteriormente se estudiaron los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs con la finalidad de proponer un método de detección de especies productoras y clasificarlos filogenéticamente. Para ello, se diseñaron primers para aplicarlos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consecutivamente se aplicó una PCR convencional *in silico* presentando sus resultados en una simulación de electroforesis permitiendo identificar la ubicación y el comportamiento de los segmentos génicos.

Finalmente, se elaboró un escenario teórico de producción biotecnológica de PHAs a escala laboratorio usando nuevamente el microorganismo, fuente de carbono y condiciones fisicoquímicas y nutricionales de producción presentadas en los artículos científicos que permitieron la selección de estos. Para este estudio se consideró una operación del reactor tipo batch a escala laboratorio empleando nutrientes propuestos en las investigaciones revisadas y como fuente de carbono se propone el uso de melazas residuales de la industria azucarera.

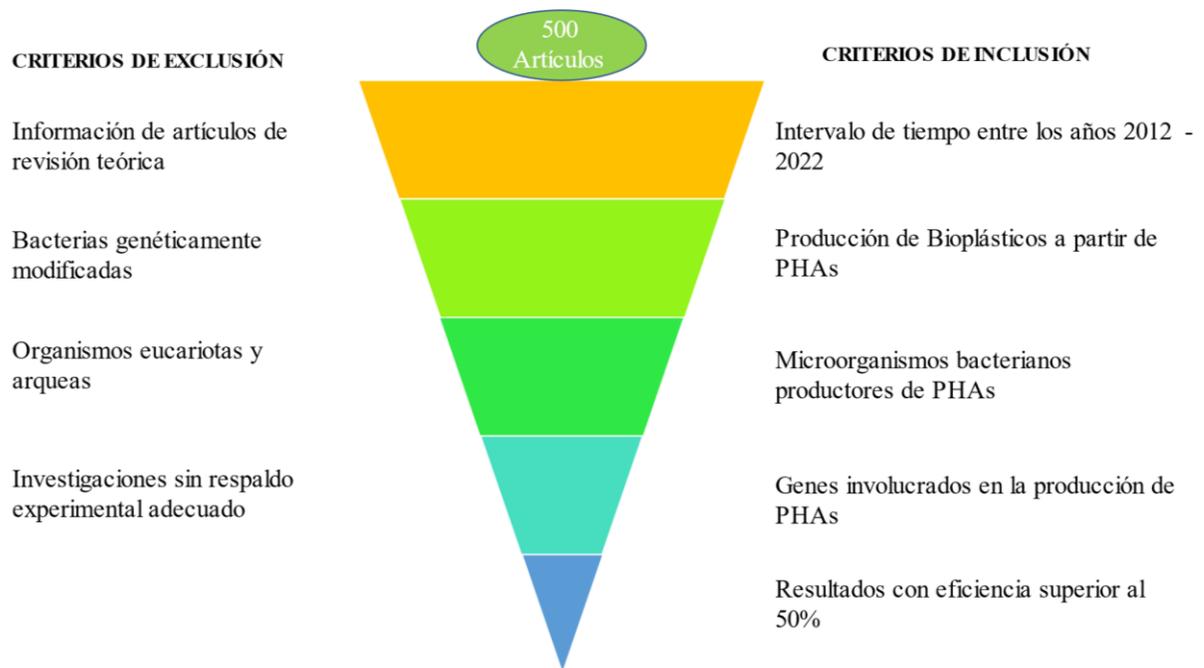
Para realizar los análisis estadísticos y de minería de datos del presente proyecto, se usaron los programas mencionados en la tabla 2. Los programas como: Gephi y Orange permitieron realizar comparaciones de información y generar grafos específicos de las redes sociales artificiales. Por su parte los programas destinados a la bioinformática tales como: CLC, Snap Gene, Mega X, Primer Blast, Serial cloner e *In silico* PCR, permitieron extraer los análisis estadísticos propios de las moléculas y segmentos de información biológica.

*Tabla 2: Softwares empleados en el proceso experimental del presente proyecto.*

<b>Programa</b>	<b>Link</b>
Gephi	<a href="https://gephi.org/">https://gephi.org/</a>
Orange	<a href="https://orangedatamining.com/">https://orangedatamining.com/</a>
CLC Sequence Viewer	<a href="https://clc-sequence-viewer.software.informer.com/8.0/">https://clc-sequence-viewer.software.informer.com/8.0/</a>
Snap Gene	<a href="https://www.snapgene.com/">https://www.snapgene.com/</a>
MEGA X	<a href="https://www.megasoftware.net/">https://www.megasoftware.net/</a>
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Primer-BLAST	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Primer PLUS 3	<a href="https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi">https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi</a>
Serial Cloner	<a href="http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html">http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html</a>
In silico PCR	<a href="http://insilico.ehu.es/PCR/">http://insilico.ehu.es/PCR/</a>
KEEG	<a href="https://www.genome.jp/kegg/">https://www.genome.jp/kegg/</a>
PDB	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
DDBJ	<a href="https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html">https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html</a>
UniProt	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>

### **3.2. Selección de artículos científicos**

La selección de los artículos científicos se realizó mediante un análisis bibliográfico de aproximadamente 500 artículos científicos de alto impacto, a través de una revisión bibliográfica sistemática basada en criterios de exclusión e inclusión que se detallan en la figura 5. Para ello, se utilizaron motores de búsqueda como: Scopus, google scholar, web of science, entre otros.



**Figura 5:** Selección de artículos por criterios de inclusión y exclusión.

La información recolectada fue sometida a una serie de análisis críticos para determinar la importancia de las investigaciones y su evolución en intervalo de tiempo seleccionado.

Posteriormente, esta información se clasificó y almacenó en una base de datos diseñada en Microsoft Excel, posteriormente se aplicaron tratamientos de datos para estandarizar la información.

### 3.2.1. Tratamiento de datos

En este apartado se realizó una estandarización de la información para someter los datos a un análisis estadístico. En el caso de los valores numéricos se estandarizaron las unidades y se transformaron los datos para obtener datos uniformes. El tratamiento de datos fue necesario para reducir los nodos e incrementar la centralidad en los grafos de las redes sociales artificiales. Entre

los tratamientos realizados está la estandarización de unidades de medida como temperatura en °C, tiempo en horas (h), producción de biomasa y PHAs en gramos por litro (g/L), nutrientes y fuentes de carbono en gramos por litro (g/L).

### 3.3. Selección de la especie bacteriana de mayor productividad de PHAs.

Debido a que los datos de microorganismos son cualitativos y tiene vínculos entre los géneros y especies, se aplicó una red social artificial (ASN) usando el Software Gephi para seleccionar las especies de mayor importancia y uso en la producción de PHAs. Posteriormente, se seleccionaron los nodos con las especies de mayor grado de entrada con pesos y se aplicó un análisis estadístico de Chi cuadrado con la finalidad de obtener el vértice de la especie con mayor importancia. El grafo de la red social se generó bajo una distribución de Fruchterman Reingold (Cordón, 2013; Velázquez y Aguilar, 2005). Para describir las especies bacterianas capaces de producir PHAs se tomará en cuenta antecedentes bibliográficos que permitan resumir el proceso de producción de polihidroxialcanoatos (Azoumana, 2013).

Una vez obtenida la especie de mayor importancia biotecnológica, se procedió a extraer las cepas pertenecientes a la especie seleccionada. Para ello, se aplicó análisis de minería de datos para obtener el valor estadísticamente significativo y eficiente en una producción de PHAs a escala laboratorio con enfoque a la producción industrial. En este apartado, se consideró la información que se describe en la tabla 3 en donde se toma como datos de alta importancia al pH, temperatura en la preparación del inóculo y crecimiento de la cepa, rendimientos de biomasa y PHAs, agitación del medio de cultivo y tiempo de producción.

**Tabla 3:** *Parámetros adecuados para la producción de PHAs a escala laboratorio*

Molécula producida	P3HB; P(3HB-co-3HV)
Nombre especie	<i>Cupriavidus necator</i>
pH crecimiento inóculo	6.5 – 7.5
T° crecimiento inóculo	25 – 37
pH de producción PHA	6.5 – 7.5

Temperatura de producción PHA	25 – 37
Tiempo de incubación horas	12h – 72h
Agitación en RPMs	110 – 300
Producción de Biomasa $g \cdot l^{-1}$	>10 g/L
Producción de PHAs $g \cdot l^{-1}$	>5 g/L
Rendimiento $gPHA \cdot gCells^{-1}$ (%)	50 – 100

Finalmente se aplicó el algoritmo de K-means para generar 3 clústeres que fueron usados como parámetros promedio para la selección de la cepa y que a la vez se pueda aplicar en el diseño de un escenario teórico para la producción de PHAs a escala laboratorio. Los resultados de los clústeres fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA), frente a la producción de biomasa, producción de PHAs y tiempo de cultivo. El clúster de mayor importancia se seleccionó por su baja desviación estándar y su alto rendimiento productivo de PHAs.

### 3.3.1. Selección y análisis de los genes involucrados en la producción de PHAs

La selección de los genes se realizó mediante un estudio previo sobre el metabolismo para la biosíntesis de PHAs en bacterias, en este apartado también se analizaron las enzimas involucradas en la producción de PHAs en la especie *Cupriavidus necator* que fue seleccionada en la minería de datos para la selección del microorganismo. La información genética fue analizada y tratada mediante programas de aplicación bioinformática como CLC Sequence Viewer 8.0, 16 SnapGene, MEGA X. Estos programas sirvieron para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y para extraer los segmentos de ADN que contienen a los genes responsables de la traducción de enzimas involucradas en la biosíntesis de PHAs.

La información genética metabólica y proteica fue obtenida de bases de datos científicas como: GenBank, DDBJ (DNA Data Bank of Japan), KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y otros bancos de información biológica secundaria como PDB y UniProt, estos sirvieron como complemento para fortalecer la información obtenida. La información fue

almacenada en archivos de formato FASTA para posteriormente analizarla y utilizarla en el diseño de un árbol filogenético, diseño de primers y simulación de PCR *in silico*.

### 3.3.2. Elaboración de un árbol filogenético

El árbol filogenético fue elaborado con la información genética obtenida de las especies resultantes del análisis de redes sociales. Se elaboró con la finalidad de observar la ubicación filogenética entre las bacterias de mayor importancia investigativa y la relación que comparte los microorganismos productores de PHAs. Para diseñar el árbol filogenético se usó el modelo de Jukes-Cantor 1969 (Jukes, 1969), ya que es un modelo de alineamiento de secuencias que considera que una sustitución es una mutación puntual que realmente ocurrió durante la evolución de una especie, mientras que una falta de coincidencia en una alineación se puede ocasionar por una o más sustituciones (Yang y Rannala, 2012) y el método para graficar fue UPGMA que es un método de agrupación basado en la identificación de parejas similares que usa la media de las distancias entre un par de caracteres para ubicar la distribución de las especies en un árbol. Este apartado se usaron las secuencias genéticas de 16S rRNA y se diseñó en el software CLC Sequence Viewer.

### 3.3.3. Simulación de reacción de la cadena polimerasa

Con la secuencia de los genes bacterianos en formato Fasta se procedió a diseñar primers para la simulación de reacción en cadena polimerasa (PCR) *in silico*. Los primers se diseñaron mediante el software SnapGene viewer 6.0.6, se consideró el uso de SnapGene adaptado a la metodología propuesta por (Rodríguez et al., 2015) para en donde se diseñaron los primers usando el software PrimerPlus 3. Posteriormente, se validaron los primers usando una simulación de PCR *in silico* empleando el programa In silico PCR amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>).

La simulación *in silico* estuvo propuesta para que se ejecute en las siguientes condiciones cíclicas descritas en la tabla 4, mismas que están relacionadas con la Tm de los primers de 60 °C y la concentración de CG entre el 50 y 55 %.

**Tabla 4:** Parámetros de PCR.

Actividad	Temperatura °C	Estado experimental
-----------	----------------	---------------------

Temperatura inicial muestra	4 °C	Inicio del proceso
Desnaturalización	~ 95 °C	Se recomienda entre 35 y 45 ciclos
Alineamiento o hibridación	60 °C ajustado a los primers	
Extensión o elongación	~ 72 °C	
Temperatura final (resultado)	4 °C	Fin del proceso

### 3.3.4. Diseño de primers para identificar cepas con *phaC*

Se diseñaron dos pares de primers para identificar cepas bacterianas que contengan el gen *phaC* que codifica para polihidroxicanoato sintasa, estos primers fueron diseñados a partir de las secuencias conservativas en la enzima mencionada mediante un alineamiento múltiple. Este alineamiento se ejecutó con la cadena de aminoácidos que conforman a la enzima con una longitud aproximada de 578 aminoácidos y se revirtieron para buscar los nucleótidos de péptidos para encontrar el gen *phaC*.

### 3.4. Elaboración de un escenario teórico de producción biotecnológica de PHAs

La recolección de información bibliográfica ayudó en la obtención de parámetros para el desarrollo de una producción biotecnológica de PHAs. Para ello, se seleccionó la especie bacteriana con mayor importancia experimental y producción de PHAs, misma que fue obtenida de la selección de microorganismos. Siguiendo con la propuesta de un proceso de producción fermentativa, en donde se consideró el uso de un medio de cultivo que contenga concentraciones de fuentes de carbono o sustrato, nitrógeno, fósforo y sales para el establecimiento de la célula y también un medio de cultivo para la producción de PHAs.

Se enfatizó en la extracción de datos relacionados con los parámetros para la obtención de PHA como son las condiciones ambientales (pH, T, rpm, etc.) y el tipo de cultivo. Posteriormente se constituyó un proceso de purificación, en donde se indica el método de cosecha, ruptura celular y obtención de PHA. Mediante un diseño de diagrama de flujo que permitió explicar el proceso

para la producción de PHAs con un enfoque biotecnológico a escala de laboratorio. Finalmente se estableció un método de conservación y un método analítico de detección de PHAs.

### **3.6. Análisis Estadístico**

Dada la naturaleza bibliográfica de la presente investigación, se recopilaron datos cuantitativos y cualitativos discretos que fueron analizados y sus resultados se expresaron en tablas de frecuencia y gráficas de los datos, los cuales se desarrollaron a través de los softwares o programas de Excel, Orange y Gephi. Los tratamientos estadísticos que se aplicaron al análisis de la base de datos, redes sociales artificiales y algoritmos de agrupación se realizaron con un nivel de confianza de 95%. Para evaluar la agrupación de K-Means en la selección del clúster, se usó un análisis de la varianza con un nivel de confianza del 95%.

## CAPÍTULO IV

### 4. Resultados y discusión

#### 4.1. Selección de la especie bacteriana de mayor productividad de PHAs.

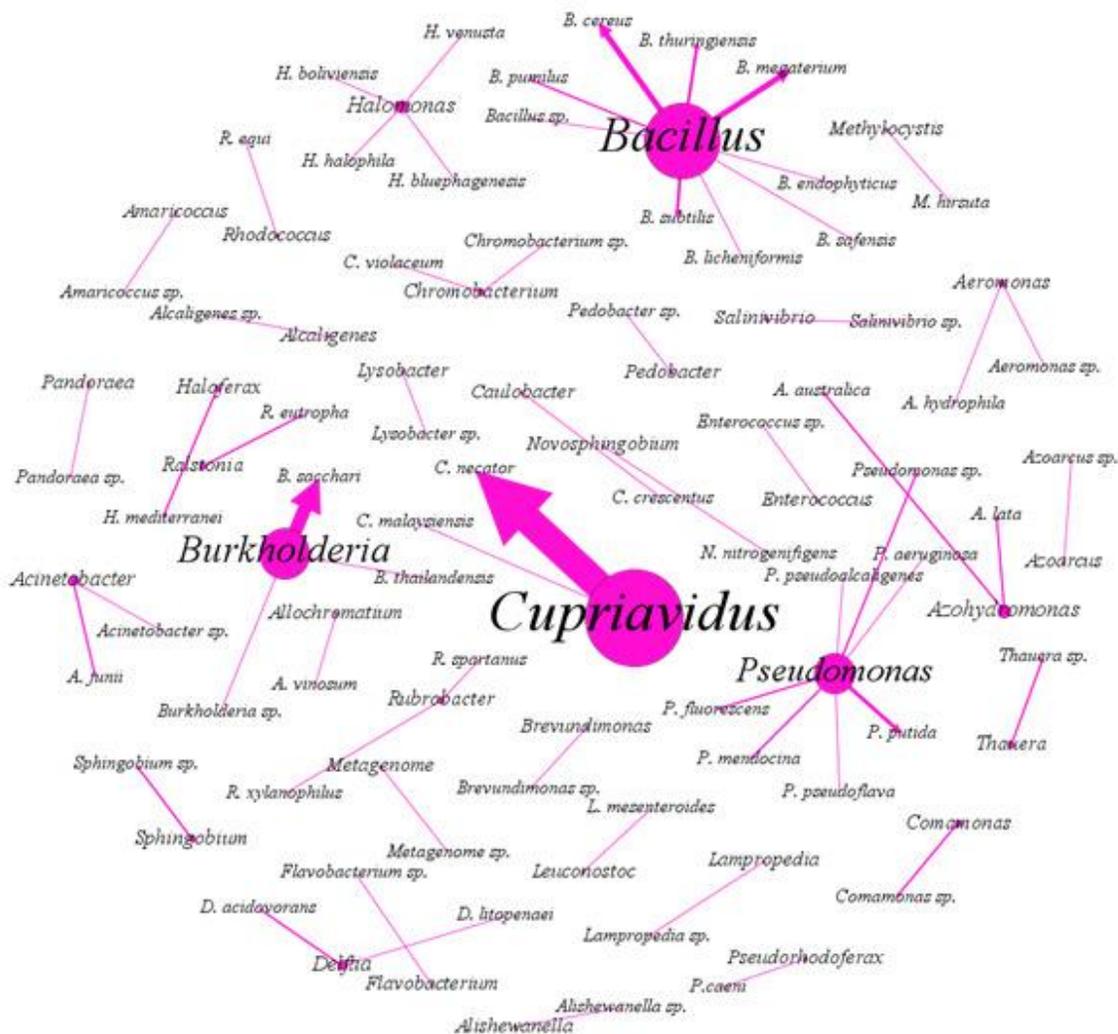
La selección de la especie se realizó mediante un proceso de cribado de información científica basándose en técnicas de minería de datos según lo descrito en el apartado metodológico. De los 500 artículos de alto impacto seleccionados de las bases de datos se filtraron 130 artículos tomados a partir de los criterios de inclusión y exclusión.

En el presente estudio se registraron 64 especies productoras de PHAs contenidas en 36 géneros bacterianos que se observa en el resultado del grafo en la figura 6, también se reportaron 28 consorcios bacterianos productores de bioplásticos a base de residuos agroindustriales o aguas municipales.

En esta investigación se determinó la existencia de particularidades entre géneros y especies; sin embargo, se priorizó la selección de una cepa productora de PHAs con importancia biotecnológica, para ello se analizó la información bibliográfica de los artículos seleccionados siguiendo un orden taxonómico que inició con la selección y análisis de los géneros más importantes, seguido por la selección de la especie y terminando con la selección de la cepa productora de PHAs con interés industrial biotecnológico. No se consideraron los consorcios bacterianos debido a que el enfoque de esta investigación está ligada a la producción biotecnológica de PHAs con una sola cepa y en ambientes controlados.

##### 4.1.1. Selección del género productor de PHAs

Para seleccionar el género se tomó en cuenta la importancia biotecnológica en cuanto al mayor rendimiento de producción de PHAs y la frecuencia aplicativa según los reportes científicos e industriales. Para ello, se cribó la información usando redes sociales artificiales (RSA). En los resultados obtenidos por el análisis de RSA se resaltan los grados de salida (out degree) del grafo pertenecientes a los géneros *Cupriavidus*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* con 31, 25, 16, y 13 grados respectivamente (Figura 6).



**Figura 6:** Grafo de selección de géneros y especies de mayor grado.

Existen frecuencias significativas de grado de entrada, es decir la arista más grande en las especies pertenecientes a cada género, sin embargo, la distribución de las especies dentro de ciertos géneros como es el caso de *Bacillus* y *Pseudomonas* con grados de entrada de 3 y 2 respectivamente es amplia conteniendo así muchas especies productoras de PHAs en un mismo género a excepción del género *Cupriavidus* en donde se resalta la especie *C. necator* con grado de entrada de 30, siendo la especie más representativa para este género. Huang et al., (2016); Leong et al., (2017); Naranjo et al., (2013), priorizaron sus investigaciones en el estudio de

especies de los géneros *Cupriavidus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Azohidromona*, entre otros, en donde mencionan que los microorganismos pertenecientes a estos géneros se caracterizan por una producción de PHAs significativa y en ciertos casos se usan especies modificadas genéticamente, también se menciona que existen especies que evolucionaron de forma natural para presentar una producción de PHAs superior a las convencionales.

En esta investigación se obtuvieron resultados de alta producción de biopolímeros para las especies contenidas en los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia*, lo que permitió la selección de estos géneros como modelos de interés biotecnológico y de mayor importancia de producción. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* presentaron grados de salida con valoración elevada; sin embargo, no se consideraron como modelos de interés en el presente estudio debido a su amplia distribución en las especies productoras de PHAs.

#### **4.1.2. Selección de especies de mayor importancia biotecnológica**

De los géneros de mayor importancia seleccionados en el apartado anterior, se consideraron las especies *Cupriavidus necator* y *Burkholderia sacchari* debido a su elevado grado de entrada en el grafo (30 y 14 grados respectivamente), seguidos por las especies *B. megaterium* y *B. cereus* que mostraron 6 grados de entrada cada una, seguidas por *P. putida* con 4 repeticiones, *B. thuringiensis* y *B. subtilis* con 3 grados (Figura 6). En este análisis no se tomaron en cuenta las especies que presentaron 2 o 3 grados de entrada o centralidad debido a su gran distribución y su dificultad para presentarse como resultados de selección de la especie con mayor rendimiento de producción de PHAs.

Se encontraron diferencias significativas entre las especies seleccionadas de chi-cuadrado ( $\chi^2$ : 61.49; gl: 7) (Anexo 1) siendo la especie *C. necator* la más importante en la producción de PHAs seguida por *B. sacchari*. Mendonça et al., (2014), en su investigación sobre la exploración del potencial productivo de PHAs con *Burkholderia sacchari*, demostraron que esta especie es una gran productora de P3HB-co-3HHx usando ácido hexanoico como fuente de carbono y mencionan que su producción es similar a la producida por *Ralstonia eutropha* sinónimo de *Cupriavidus necator*.

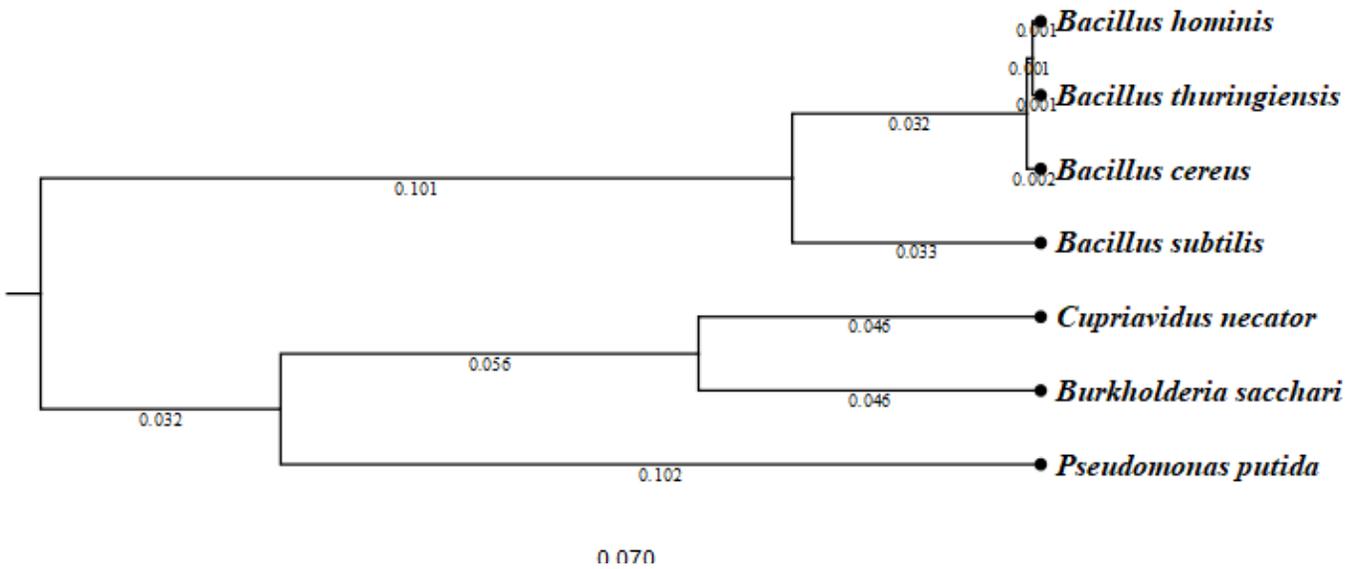
No obstante, Choonut et al., (2017) argumentan que esta producción está directamente relacionada con la fuente de carbono, ya que al usar ácidos grasos, ácido valérico o ácido

heptanoico como fuente de carbono, se incrementa la producción del monómero 3HV, mientras que el uso de fuentes de carbono dicarboxílico, incrementa la producción de moléculas de hidroxialcanoatos como: 5HV, 4HV, 3HH, entre otros. Y en el caso de *C. necator* reducen los compuestos y producen mayor cantidad de PHAs, siendo la especie más adecuada para la presente investigación.

Los resultados presentados en el grafo de la (Figura 6), permitieron sugerir que *C. necator* es la especie de mayor relevancia entre las dos especies mencionadas. Por otro lado, el género *Pseudomonas* también contiene especies capaces de producir PHAs y entre ellas se resalta *P. putida* que en condiciones adecuadas también es una buena opción para producir estos biopolímeros, aunque estas especies se debe tratar con mucho cuidado debido a su nivel de patogenicidad. Sin embargo, debido a la diferencia metabólica y afinidad por distintas fuentes de carbono, se consideró únicamente como una propuesta investigativa para futuros proyectos. En este estudio también se puede observar que el grupo de especies *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. megaterium* y *B. subtilis*, a pesar de pertenecer al único género de Gram positivas en el grupo de estudio, también presentaron rendimientos de PHAs representativos con distintos metabolismos y procesos de acumulación de biopolímeros.

#### **4.1.3. Análisis filogenético entre las especies seleccionadas**

Para describir la distancia filogenética cualitativa que se presenta entre las especies seleccionadas, se elaboró un árbol según lo descrito en la metodología (Figura 7). Se obtuvo que, las especies bacterianas Gram negativas, *C. necator* y *B. sacchari* mostraron menor distancia filogenética dentro del grupo de especies en estudio. Esto demuestra que la frecuencia referencial que presentaron las dos especies en la presente investigación también está relacionada con su configuración genómica y que son especies que adquirieron la capacidad de producir PHAs por evolución natural.



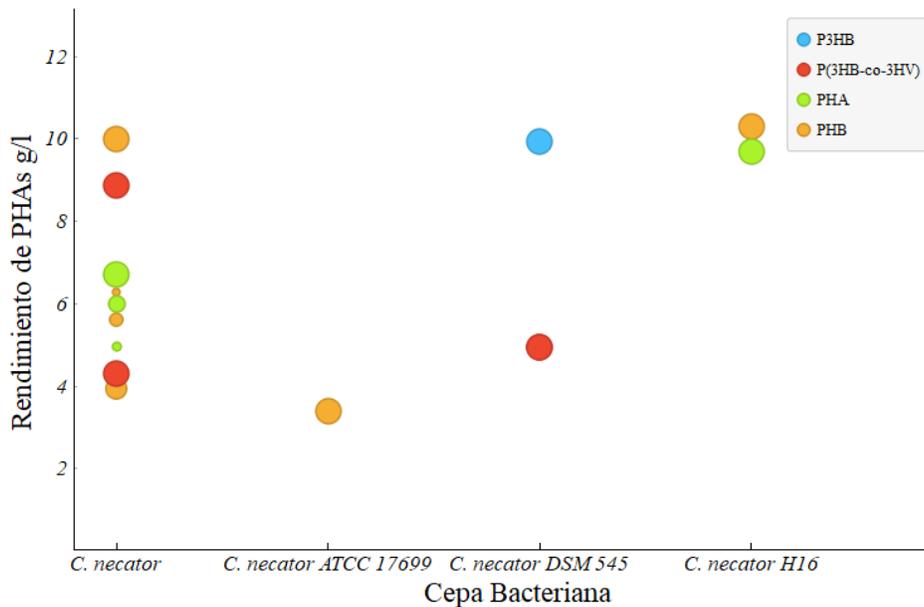
**Figura 7:** Árbol filogenético de las especies de mayor importancia para la producción de PHAs según las referencias analizadas

Según Guamán et al., (2018), los genes encargados de biosintetizar PHAs pueden estar presentes en el ADN genómico e incluso adaptarse al ADN plasmídico de ciertas especies ajenas a la producción de PHAs. Sin embargo, la producción de bioplásticos con estas bacterias requiere de fuentes de carbono específicas y su rendimiento es inferior al compararse con las especies productoras por naturaleza evolutiva ya que contienen los genes biosintetizadores en su ADN genómico que pueden ser potenciados al contener ciertos genes relacionados en sus plásmidos.

#### 4.1.4. Selección de la cepa por su rendimiento de PHAs

A pesar de que se obtuvieron dos especies de distintos géneros con mayor grado de entrada, se seleccionó la especie *C. necator* ya que en el análisis estadístico de  $\chi^2$  se obtuvo un  $p = 0.016$  frente a la especie *B. sacchari*. Al analizar los grupos de cepas reportados en las referencias científicas para la especie *C. necator* se obtuvo una elevada frecuencia para el grupo sin denominación específica de cepa como se muestra en la (Figura 8). Sin embargo, en este estudio se optó por seleccionar las cepas que si presentaron una denominación o identificación y que a la vez estuvieron respaldadas por su elevada producción de PHAs como es el caso de: *C. necator* ATCC 17699, *C. necator* DSM 545 y *C. necator* H16, de donde las dos últimas son las más representativas y estudiadas por su rendimiento productivo para PHAs o sus derivados como P3HB, P(3HB-co-

3HV) o PHB. El análisis de este rendimiento se analizó basándose en la concentración de polihidroxialcanoato reportada en las referencias bibliográficas de los artículos seleccionados.

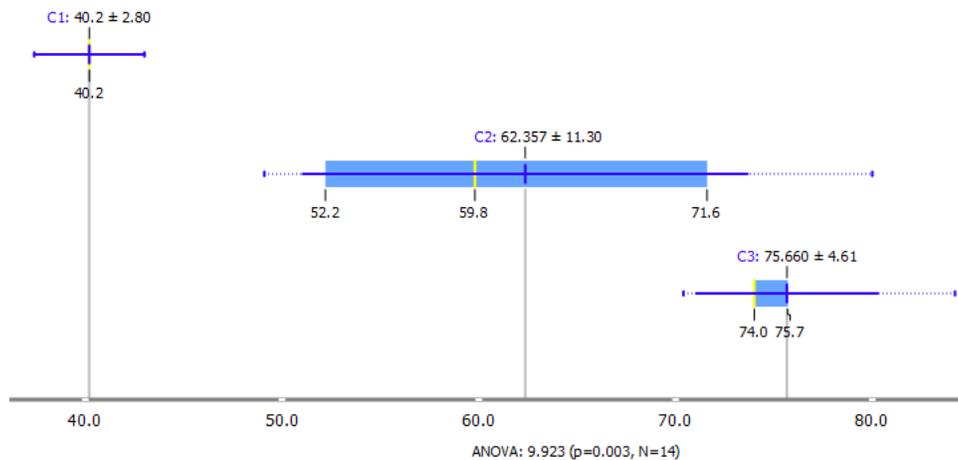


**Figura 8:** Rendimiento en la producción de PHAs por las cepas de *C. necator*. El color de los marcadores está mediado por el tipo de molécula y el tamaño por el tiempo de estudio siendo 24 horas el tiempo mínimo y 72 horas el tiempo máximo en cultivo.

Las cepas *C. necator* DSM 545 y *C. necator* H16 presentan un gran potencial investigativo y biotecnológico para la producción de PHAs expresado en el grafico; sin embargo, su rendimiento puede ser variable debido a la concentración y estructura molecular de nutrientes y fuente de carbono. Según Sangkharak et al., (2021), *C. necator* DSM 545 produce hasta el 73.3% de P(3HB-co-3 HV) por gramo de biomasa seca usando glicerol como fuente de carbono. Mientras que, la misma cepa produce 84.2 % de P(3HB) al usar jugo de ensilaje como fuente de carbono, las dos producciones se evaluaron en biorreactores con operación tipo batch, el rendimiento de esta cepa se reduce cuando la molécula usada como fuente de carbono es más compleja o difícil de hidrolizar. Por su parte Heinrich et al., (2012), menciona que *C. necator* H16 puede producir concentraciones de P(3HB) superiores al 65.2% por gramo de biomasa seca usando glutamato de sodio como fuente de carbono en un biorreactor Biostat D650 (Sartorius) con operación tipo fed-batch. De igual forma, (Kunasundari et al., 2017), en su estudio menciona que el rendimiento de

PHAs usando *C. necator* H16 cultivada con aceite de palma como fuente de carbono, produjo 39% de P(3HB).

Para determinar el rendimiento de PHAs promedio para cepas en estudio usando los parámetros fisicoquímicos experimentales, tiempo y rendimiento, se realizó un clustering mediante el algoritmo de K-means para el grupo de artículos seleccionados y pertenecientes a *C. necator* H16 y DSM545 (Figura 9). En este agrupamiento se obtuvo que el 64.3% de los artículos se agrupan en el clúster 3 (C3) y presentan un rango de valores entre 70% y 85% de rendimiento por gramo de biomasa. Mientras que en el caso del clúster 2 (C2) se agrupan el 21.4% de los artículos con la particularidad de que el rango de agrupación en función del rendimiento está entre el 47% y 80%, esta agrupación genera rangos que cubren ciertos valores de C3 debido a que K-means considera también el pH y temperatura reportada en las investigaciones. Finalmente, está el clúster 1 (C1) con el 14.3% conformado por dos artículos con bajos rendimientos, en estos artículos se estudió *C. necator* H16 con fuentes de carbono de difícil bioasimilación como es el caso del aceite de coco y residuos de café.

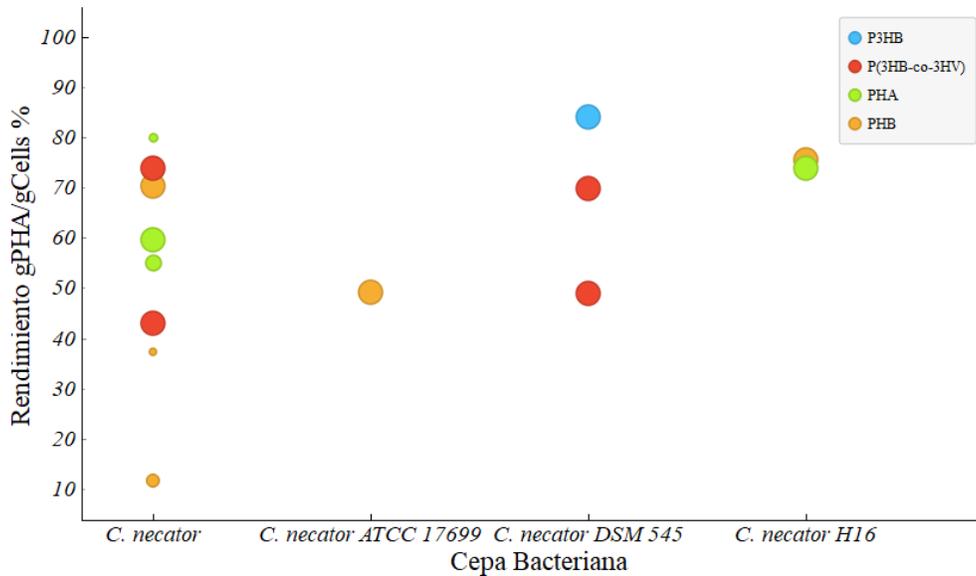


**Figura 9:** Clustering para la verificación del rendimiento en la producción de PHAs descritos por los autores mencionados.

La elevada producción de PHAs por litro de medio de cultivo, no siempre es beneficiosa ya que la producción de biomasa puede superar en gran cantidad a la concentración del biopolímero, esto se traduce en un mayor costo de producción y baja rentabilidad neta en el proceso biotecnológico. Por esta razón fue importante seleccionar una cepa que sea capaz de producir altas

cantidades y diversidad molecular de PHAs en relación con su peso de biomasa y que, a la vez esta sea capaz de metabolizar fuentes de carbono de bajo costo de adquisición e hidrólisis. En este caso, se seleccionó como cepa modelo a *Cupriavidus necator* H16 que según el German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, (2022), se puede encontrar referenciada con los sinónimos de: *Cupriavidus necator* ATCC 428, *Ralstonia eutropha* H16, *Ralstonia eutropha* ATCC, *Alcaligenes eutropha* H16 o *Wautersia eutropha* H16.

Según el estudio de data mining, la cepa *C. necator* H16, presentó un rendimiento del 74% de PHA por gramo de biomasa seca, se destaca la producción de la subfamilia de PHBs (Figura 9). Hay que tomar en cuenta que los PHAs son un grupo de amplia diversidad molecular y que P3HB y P(3HB-co-3HV) tan solo son subgrupos pertenecientes a la subfamilia PHB. Según lo mencionado por Kunasundari et al., (2013), si el cultivo de *C. necator* H16 es óptimo, se pueden alcanzar rendimientos entre el 82 y 97% de bioplásticos por gramo de biomasa, estos valores se referencian principalmente por la producción mediante estrés metabólico a las celular bacterianas.



**Figura 10:** Rendimiento de gPHAs/gBiomasa seca. El color de los marcadores representa a la molécula biosintetizada y el tamaño se refiere al tiempo de fermentación.

#### 4.1.5. Descripción genética de la cepa seleccionada

La cepa *C. necator* H16 es una especie que contiene 2 cromosomas y un plásmido denominado pHG1 (Tabla 5). Está conformada por un total de 7416678 nucleótidos que codifican para 6116 genes de proteínas y 73 genes de ARN. Según Pohlmann et al., (2006), *C. necator* H16 o *R. eutropha* H16, es una cepa bacteriana perteneciente al grupo de gran negativas con metabolismo versátil que puede sobrevivir en ausencia de fuentes de carbono ya que también puede usar H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> como fuentes de energía y carbono. Esta cepa ha sido de gran interés biotecnológico desde hace 5 décadas debido a su capacidad de producir P(3HB-co-3HV) así como sus monómeros P(3HB) y P(3HV) los cuales forman los polímeros de interés para la producción de bioplásticos.

**Tabla 5:** Características genómicas de *C. necator* H16.

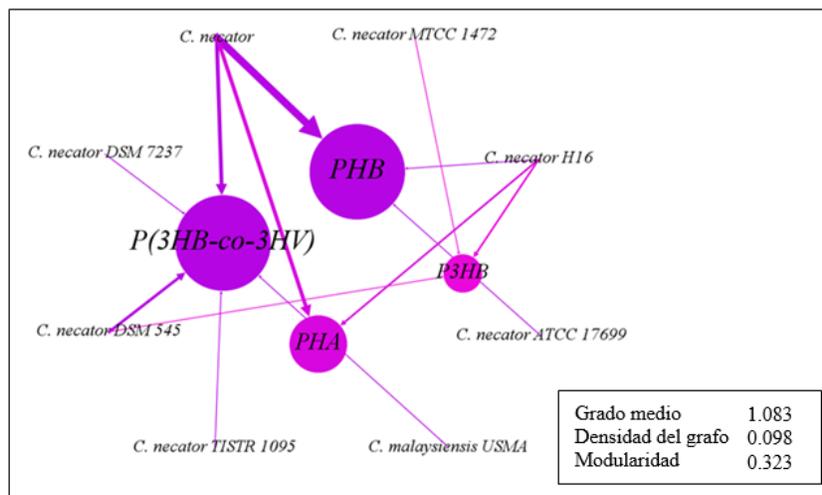
Cepa	Tipo de ADN	Número de nucleótidos	Accession
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Cromosoma 1	4052032	NC_008313
	Cromosoma 2	2912490	NC_008314
	Plásmido pHG1	452156	NC_005241
	<b>Total</b>	<b>7416678</b>	

#### 4.1.6. Selección de moléculas producidas por *C. necator*

La especie *C. necator* tiene la capacidad de producir distintas moléculas pertenecientes al grupo de los polihidroxialcanoatos. Sin embargo, se prioriza la producción de un solo tipo molecular con gran rendimiento respecto al tiempo y biomasa. En el apartado anterior, se seleccionó la cepa más representativa y de mayor importancia que fue *C. necator* H16. No obstante, para validar los resultados previos y sustentar la selección de las moléculas producidas, se realizó un análisis de redes sociales aplicado a los artículos que presentan estudios con *C. necator* según lo indicado en la metodología.

Se obtuvo un grafo con densidad de 0.098 y modularidad de 0.323, en este grafo se resaltan los componentes nodulares con grados de entrada para las moléculas PHA, PHB, P3HB y P(3HB-co-3HV) con 6, 10, 4 y 10 grados respectivamente. Mientras que para los nodos con grados de

salida sobresalen la especie y cepas: *C. necator*, *C. necator* DSM 545 y *C. necator* H16 con 16, 4 y 5 grados respectivamente (Figura 11). En este análisis se descartó a la especie *C. necator* sin su respectiva identificación y registro como cepa debido a que el rendimiento productivo de PHAs puede variar incluso entre cepas.



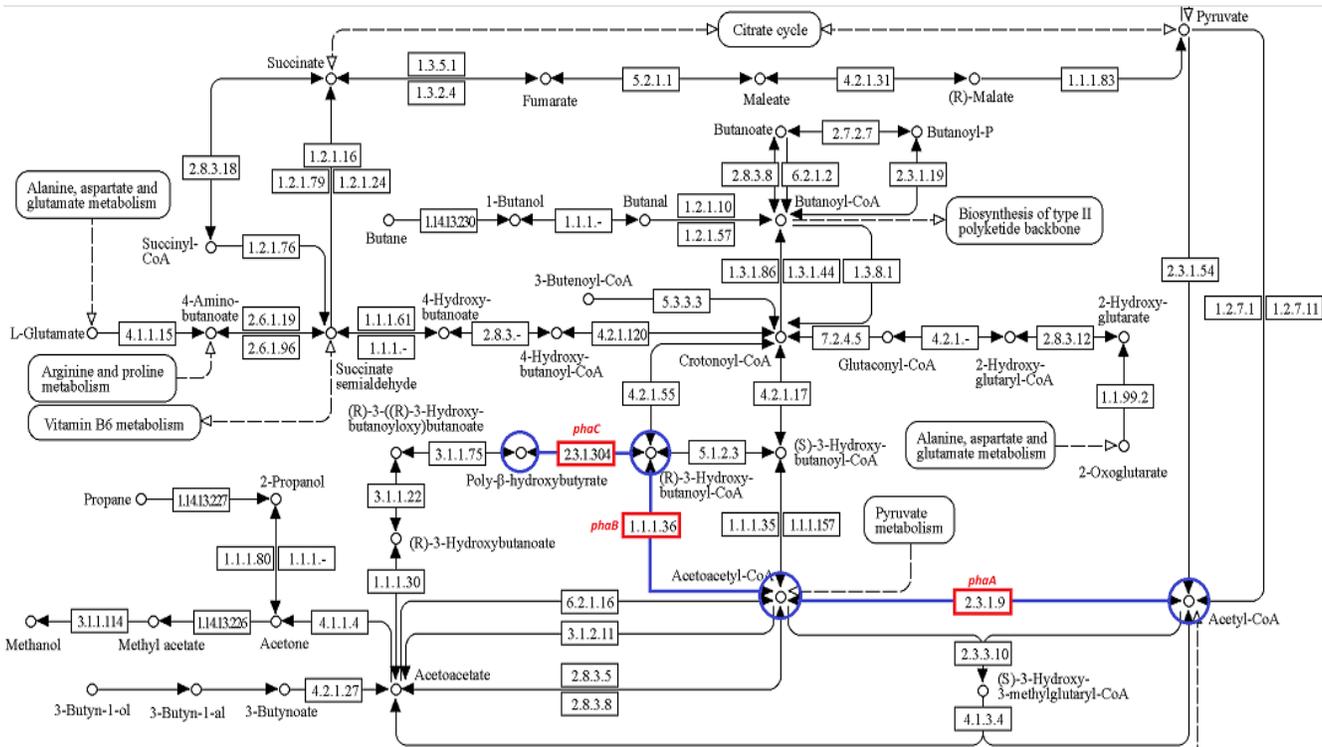
**Figura 11:** Análisis de redes sociales artificiales para los PHAs producidos por diferentes cepas de *C. necator*.

Como se mencionó en la selección de microorganismos, entre las cepas *C. necator* H16 y *C. necator* DSM 545, se optó por seleccionar la primera cepa mencionada debido a su alto rendimiento por gramo de biomasa y por su capacidad de metabolizar distintas fuentes de carbono de bajo costo de adquisición. Sin embargo, no se descarta la segunda cepa ya que los resultados presentados en esta investigación están basados en un análisis de minería de datos usando información de experimentaciones previas. Según la bibliografía analizada, *C. necator* tiene la alta capacidad de producir monómeros de PHAs y no se reporta algún estudio sobre la producción de moléculas diméricas. Por esta razón, no se ratifica la exclusión de una ruta biosintética para dímeros de PHAs.

Para este estudio, se seleccionó la familia de moléculas PHB ya que es el grupo más frecuente producida por *C. necator* H16. Según López et al., (2015), el PHB se forma a partir del exceso de fuente de carbono en un medio con limitación de otros nutrientes como nitrógeno, fósforo u oxígeno. Como ya se ha mencionado, estas moléculas se acumulan en vesículas intracelulares y es una forma de almacenar energía para la célula.

## 4.2. Selección del metabolismo involucrado en la producción de PHAs

Una vez seleccionada la molécula de mayor relevancia P3HB, se realizó una búsqueda y estudio de su ruta biosintética. Se determinó que P3HB, al ser una molécula perteneciente al grupo de los PHB, presenta el mismo proceso biosintético y también están relacionados con la ruta metabólica del butanoato. Esta ruta metabólica inicia con la asimilación de fuentes de carbono que pueden ser: sacáridos, ácidos grasos, glicerol, aminoácidos y entre otras moléculas con pocos átomos de carbono. La mayoría de estas moléculas atraviesan por distintas reacciones bioquímicas que naturalmente consiguen formar Acetil-CoA (Figura 12). Tanadchangsaeng y Yu, (2012), indican que, a partir Acetil-CoA y por medio de la actividad enzimática se forma el Poli(3-hidroxi butirato) o P3HB y posteriormente se generan otras moléculas que conforman la familia de los PHB e incluso se empieza la formación de copolímeros por acción de *phaZ*.



**Figura 12:** Biosíntesis de Poli- $\beta$ -hidroxibutirato a partir de Acetil-CoA generado por la intervención de las enzimas traducidas de los genes *phaA*, *phaB*, *phaC*.

Según Chen y Jiang, (2018), el tipo de la molécula de PHA producida, depende de la fuente de carbono, metabolismo bacteriano y limitación de nutrientes, mientras que la concentración de

polímeros y rendimientos está principalmente relacionada con las rutas biosintéticas, requerimientos de nutrientes para el crecimiento de biomasa y velocidad de asimilación o transformación de materia orgánica. Esto involucra al tipo de microorganismo debido a que si una especie con alto índice de asimilación de fuentes de carbono y rápido metabolismo producirá una gran cantidad de biomasa. Sin embargo, si se obtiene una especie con alto índice de asimilación de nutrientes, pero con metabolismo selectivo y bajo, acumulará el exceso de fuente de carbono en forma de PHAs contenidos en vesículas con la finalidad de utilizarla en futuros procesos metabólicos, este proceso se puede potenciar con la limitación de fuentes de nitrógeno. Este proceso está mediado por dos factores principales que son la presencia de altas concentraciones de nitratos o el cambio significativo en la concentración de fuentes de carbono.

#### **4.2.1. Selección de genes**

El metabolismo del butanoato puede ser efectuado por diversas bacterias. Sin embargo, pocas de ellas tienen la capacidad de generar PHB, y en esta actividad están involucrados genes específicos que desvían el exceso de carbono desde el Acetil-CoA hacia la biosíntesis de otras moléculas de PHAs que posteriormente se almacenan en vesículas especializadas. Existen una amplia variedad de genes entre los microorganismos bacterianos como pueden ser: *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaE*, *phaF*, *phaZ*, *phaZ1*, *phaZ2*, entre otros (Maheshwari et al., 2018). No obstante, según lo descrito por Pohlmann et al., (2006) los genes de biosíntesis de PHAs que tienen mayor expresión en *C. necator* H16 son *phaA*, *phaB*, *phaC* que también se los puede identificar como *phbA*, *phbB* o *phbC*. Estos son los nombres más usados para nombrar a los genes involucrados.

Basnett et al., (2018) describe que *C. necator* puede sintetizar PHAs a partir de distintas fuentes de carbono, pero a una escala industrial es importante que la bacteria pueda consumir el carbono con facilidad y adaptarse al estrés causado por la potenciación para producir biopolímeros. Por esta razón, se seleccionó la vía biosintética de los azúcares disacáridos y se estudiaron los tres principales genes que actúan desde el Acetil-CoA hasta Poli(3-hidroxi-butirato)

#### **4.2.2. Enzimas involucradas en la producción de PHAs**

Los genes de *C. necator* H16 mencionados en el apartado anterior tienen la capacidad de sintetizar enzimas que transforman a las moléculas de Acetil-CoA hasta P3HB, estos genes son: *phaA* expresa a la enzima acetil-CoA acetiltransferasa, *phaB* expresa a la enzima acetoacetil-CoA reductasa y el gen *phaC* da origen a la enzima ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa (Tabla 6).

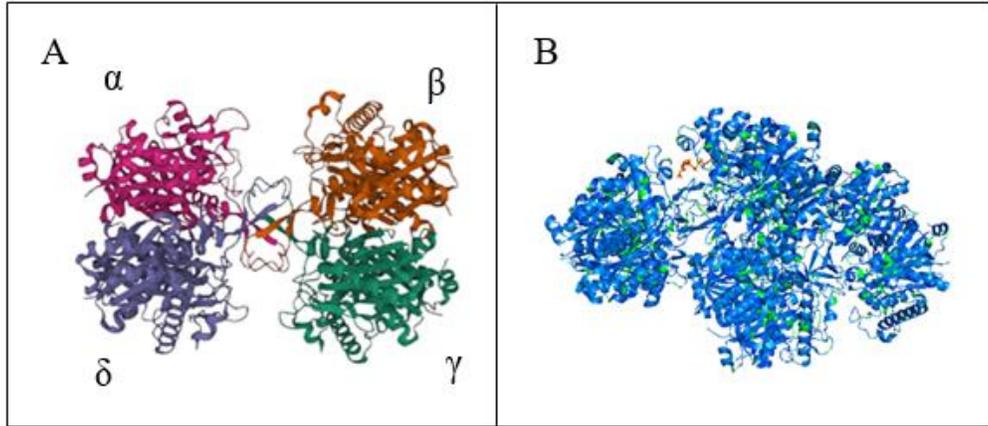
Esta ruta biosintética produce cadenas de PHAs cortas o conocidas como scl-PHA y se caracterizan por usar azúcares para su proceso de síntesis a diferencia de las moléculas de cadena larga que se forman a partir de las rutas de ácidos grasos o  $\beta$ -oxidación y actúan con otros genes que son variantes de los genes en estudio.

**Tabla 6:** Descripción de las enzimas de *C. necator* H16 involucrados en la biosíntesis de PHAs

Microorganismo	Gen	Nombre	Código
<i>Cupriavidus necator</i> H16	<i>phaA</i> (1176 bp)	Acetil-CoA acetiltransferasa	EC: 2.3.1.9
	<i>phaB</i> (744)	Acetoacetil-CoA reductasa	EC: 1.1.1.36
	<i>phaC</i> (1164 bp)	Ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa	EC 2.3.1.304

#### ***Acetil-CoA acetiltransferasa (phaA)***

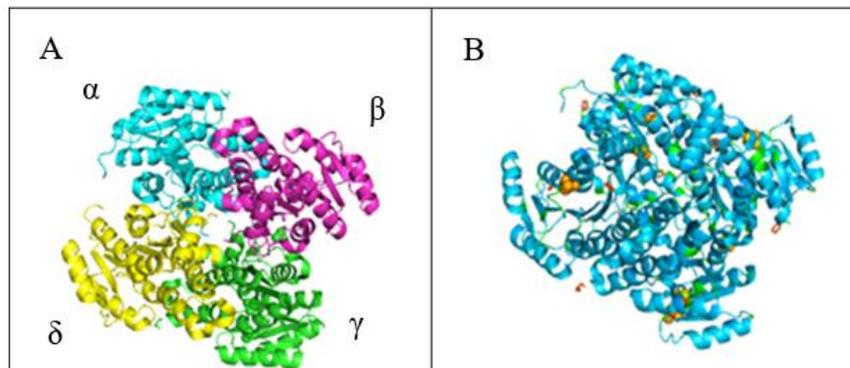
Mediante el análisis bioinformático y la visualización molecular computacional, se determinó que la enzima Acetil-CoA acetiltransferasa o  $\beta$ -cetotiolosa se traduce a partir del gen *phaA* y contiene aproximadamente 392 aminoácidos por subunidad, está compuesta por 4 subunidades ubicadas de tal forma que actúan entre los pares de subunidades  $\alpha - \beta$  y  $\delta - \gamma$ . Cada subunidad tiene afinidad a una molécula de Acetil-CoA y por efecto del NADH los pares de subunidades complementarios se activan y fusionan sus Acetil-CoA formando Acetoacetil-CoA (Figura 13). Según Kim y Kim, (2014), en *R. eutropha* H16 o *C. necator* H16, el tetrámero se forma por la dimerización de dos dímeros y sus principales residuos o aminoácidos activos son fenilalanina Phe219 y cisteína Cys88.



**Figura 13:** Estructura enzimática de Acetil-CoA acetiltransferasa (A). Subunidades del complejo enzimático diferenciadas por diferentes colores  $\alpha - \beta$  y  $\delta - \gamma$  forman sus dímero de actividad enzimática entre sí. (B). Intensidad de la actividad enzimática el color azul

#### **Acetoacetil-CoA reductasa (*phaB*)**

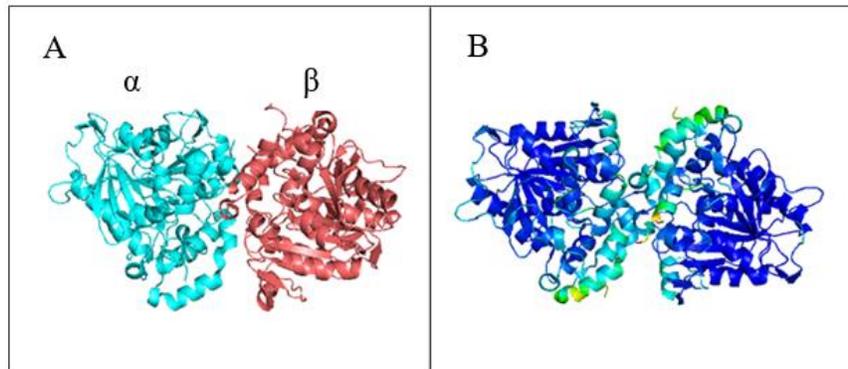
En la revisión cualitativa se observó que esta enzima reduce a la molécula Acetoacetil-CoA específicamente en el carbono 3 próximo al (R) de ahí el nombre de (R)-3-hidroxiacil-CoA. Esta molécula también está formada por 4 subunidades que también se referenciaron con los símbolos  $\alpha - \beta$  y  $\delta - \gamma$  para describir sus pares complementarios (Figura 14). Según Matsumoto et al., (2013), en *C. necator* H16 este tetrámero actúa con la intervención de un NADPH para reducir la molécula antes mencionada y así dar paso a la actividad enzimática de *phaC* descrita en el siguiente apartado.



**Figura 14:** (A). Estructura enzimática de *phaB* con las subunidades diferenciadas por distintos colores. (B). Intensidad de la actividad enzimática las moléculas de color naranja son las participantes en la reducción de Acetoacetil-CoA.

### *Ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa (phaC)*

En este estudio se obtuvo que esta enzima es la encargada de desacoplar la CoA de la molécula (R)-3-hidroxiacil-CoA para formar 3HB incluso está relacionada con la reducción del OH del tercer carbono y unión entre hidroxialcanoatos para formar P3HB u otros PHBs. Esta enzima está formada por un dímero con capacidad de giro manteniendo al sustrato en el centro para dividirlo (Figura 15), también se pueden presentar tetrameros unidos por enlaces covalentes, esto dependerá del tipo de moléculas que se desacoplen. Según Chek et al., (2017), esta enzima desprende el CoA mediante giros en el carbono quiral de la molécula dejando radicales activos que por afinidad química forman cadenas cortas de PHAs.



**Figura 15:** Estructura enzimática de PHA sintasa o Ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa. (A). Dímero con la ubicación de las dos subunidades diferenciadas por colores (B). Intensidad de la actividad enzimática, en el centro los colores cálidos representan la act

#### **4.2.3. Diseño de primers**

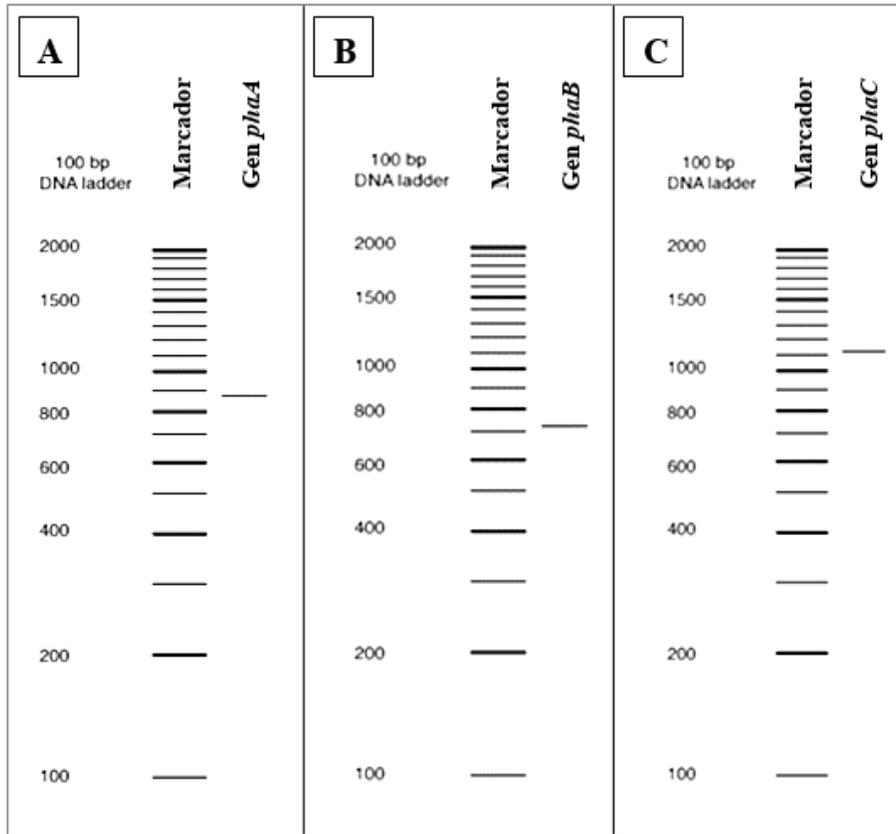
El diseño de primers se ejecutó usando el software SnapGene con la información genética de cada gen *phaA*, *phaB* y *phaC*. En este apartado consideraron parámetros experimentales similares para que reaccionen y actúen en condiciones fisicoquímicas similares con la finalidad de obtener PCRs múltiples en una sola muestra. De este diseño de primers se obtuvieron los resultados expuestos en la (Tabla 7)

**Tabla 7:** Diseño de primers para identificar la presencia de los genes *phaA*, *phaB*, *phaC* en *C. necator* H16.

Gen	Primers	Extensión del fragmento (nucleótidos)
<i>phaA</i> : 1176 nucleótidos		
<b>Acetil-CoA acetiltransferasa</b> <i>Anexo 3</i>	Fw_phaA: 5'AGCGAAGTCATCATGGGCCA-3' Rv_phaA: 5'-CACATTGACCTTGGAGGTGTCC-3'	876 Figura 15A
<i>phaB</i> : 744 nucleótidos		
<b>Acetoacetil-CoA reductasa</b> <i>Anexo 4</i>	Fw_phaB: 5'-ACAACGCATTGCCCTGGTAAC-3' Rv_phaB: 5'-CCGTTGATGGCAAATTCGCG-3'	720 Figura 15B
<i>phaC</i> : 1164 nucleótidos		
<b>Ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa</b> <i>Anexo 5</i>	Fw_phaC: 5'-TCGAGAACGAGTACTTCCAGCT-3' Rv_phaC: 5'-TGCCTTGGCTTTGACGTATCG-3'	1115 Figura 15C

Según Bolivar et al., (2014), el diseño de primers ayuda a ubicar un segmento específico de ADN y a base de esto se puede extraer dicho segmento e identificar la presencia del gen en cepa analizada. En este caso, se generaron segmentos de alta especificidad que tendrán preferencia para ligarse con el ADN de *C. necator* H16 también conocido como *R. eutropha* H16. Estos primers

verificarán la presencia de los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* con la finalidad de determinar la producción de enzimas productoras de PHAs en cepa bacteriana.



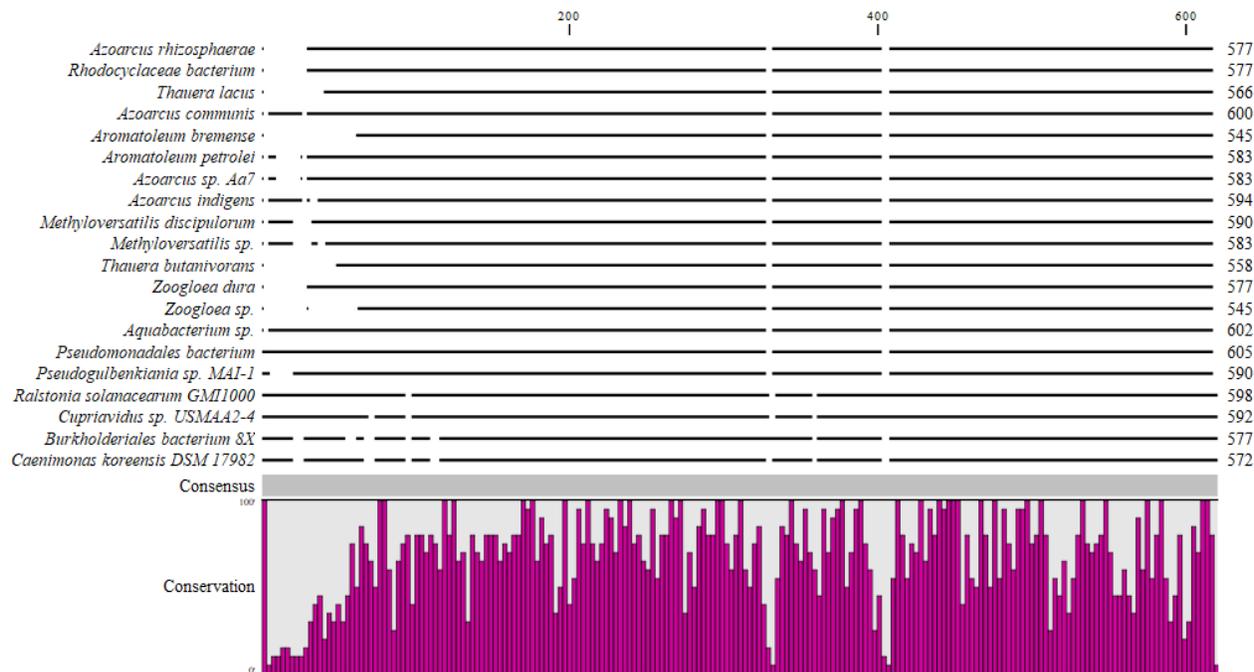
**Figura 16:** Simulación electroforética de los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs. A) Resultado de la PCR para el gen *phaA* con 876 nucleótidos. B) Resultado de la PCR para el gen *phaB* con 744 nucleótidos y C) PCR de *phaC* con 1115 nucleótidos

Los tres pares de primers fueron diseñados para que reaccionen a una temperatura melting  $T_M$  general de 60 °C y sus concentraciones de CG estén entre 50 y 55 %. Se empleó esta particularidad con el fin de usar el mismo protocolo de PCR para los 3 pares de primers en un ambiente *in vitro* usando las mismas condiciones fisicoquímicas y termodinámicas en el termociclador para su respectiva reacción en cadena de la polimerasa PCR.

#### 4.2.4. Identificación de cepas productoras de PHAs con un par de primers para *phaC*

En el alineamiento de secuencias de aminoácidos para detectar segmentos conservativos, se consideraron 20 especies bacterianas que si contienen el gen *phaC* y se obtuvo que los

segmentos de mayor conservación están entre los aminoácidos: 263 – 273, 444 – 453; 573 – 583 y 528 – 540 (Figura 17). Estos segmentos permitieron detectar la presencia del gen *phaC* a partir de cepas contenidas en las bases de datos biológicas, las cadenas de aminoácidos se revirtieron en cadenas nucleotídicas con la finalidad de diseñar nuevos primers que permitan identificar las especies usando segmentos de distinto tamaño y de mayor conservación genética (Tabla 8).



**Figura 17:** Alineamiento múltiple de aminoácidos correspondientes a la secuencia peptídica de la enzima polihidroxialcanoato sintasa cuyo gen se denomina *phaC*.

**Tabla 8:** Diseño de primers en base a las secuencias conservadas de *phaC* en distintos grupos bacterianos

Secuencia conservada aa	Rango del consenso	Primer correspondiente	TM °C	CG %
PWINKFYILD	263 – 273	<b>Fw1:</b> 5' CTACATCCTGGACCTGCAGCC 3'	60	62
PFDVLYWNMD	444 – 453	<b>Fw2:</b> 5' TTCGACCTGCTGTTCTGGAACG 3'	61	55
GSWWEDWMAWL	573 – 583	<b>Rv1:</b> 5' TTGATCACACCGGCGATATGG 3'	60	52
VLSSSGHILGIVNP	528 – 540	<b>Rv2:</b> 5' CAGCCATGCGGTCCAGTC 3'	60	67

Los primers detallados en la tabla 7 se diseñaron como una segunda opción para detectar cepas productoras de PHAs, esta alternativa es diferente a la propuesta de primers diseñados para

detectar *phaC* en *C. necator* H16 descritos en el apartado anterior ya que se toman en cuenta otras especies bacteriana.

### **4.3. Escenario teórico para la producción biotecnológica de PHAs**

En este apartado, el escenario teórico está enfocado en el Upstream y Downstream que se puede desarrollar en una escala de laboratorio. Para describir y diseñar el presente escenario de una forma adecuada, se aplicaron ciertos análisis de datos como la frecuencia de la información. Este estudio está enfocado en su aplicación en un laboratorio de docencia como es el caso del laboratorio de Biotecnología aplicada de la Universidad Técnica del Norte

#### **4.3.1. Proceso Upstream**

En la propuesta del Upstream para la producción de PHAs utilizando *C. necator* H16, se consideró que la cepa *C. necator* H16 está cultivo puro y sus características fisiológicas son óptimas para la producción de estos biopolímeros. Sin embargo, esta condición también se puede extrapolar a cepas aisladas mediante bioprospección, teniendo en cuenta que la producción o efectividad de los medios de cultivo variarán debido al uso de cepas sin estudios previos.

#### ***Selección y análisis del microorganismo***

A pesar de lo mencionado sobre el uso de una cepa de cultivo puro, lo ideal será verificar la presencia de los genes de producción de PHAs empleando los primers diseñados en apartados anteriores, con la finalidad de obtener rendimientos similares a investigaciones reportadas, esto es debido a que los subcultivos de una cepa pura pueden perder la capacidad productiva de ciertas enzimas por efecto de la mutación genética que es producida por la velocidad de división celular de las cepas. También es recomendable emplear métodos de detección con reactivos colorantes que se unen a los bioplásticos o sus vesículas que los almacenan para así determinar la producción de PHAs en ciertas cepas microbianas.

En el caso de usar microorganismos con bioprospecciones propias, lo adecuado será identificar las cepas productoras de PHAs mediante métodos de tinción, posteriormente identificar la especie basándose en secuencias de ADN conservadas y finalmente verificar la presencia de los genes que codifican para *phaA*, *phaB* o *phaC* de forma general para ello será necesario el diseño de nuevos primers ya que los primers diseñados en el presente estudio, identifican los genes mencionados únicamente para *C. necator* H16 conocido también como *R. eutropha* H16.

Los microorganismos productores de PHAs pueden ser detectados con diferentes reactivos que permitan su tinción ya que estos se unen a los ácidos grasos que forman las vesículas bacterianas, compuestos generados que son los PHAs o sus derivados como PHB, PHV, HV, entre otros. En la tabla 9, se describen tres métodos de tinción más usados para la detección de cepas productoras de PHAs.

**Tabla 9:** *Métodos de tinción para determinar la presencia de PHAs.*

<b>Nombre de método</b>	<b>Metodología de tinción</b>	<b>Referencias</b>
<b><i>Tinción con azul de Nilo</i></b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cultivar las cepas usando azul de Nilo a una concentración de 1 µg/mL.</li> <li>2. Exponer a una luz UV de 312 nm y observar la fluorescencia</li> </ol>	<p>(Cibichakravarthy et al., 2017)</p> <p>(Gholami et al., 2020)</p>
<b><i>Tinción con rojo de Nilo</i></b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislar las cepas en placas con medios reforzados con Xilosa a una concentración de 20 g/L y 0.2 µg/mL de rojo de Nilo</li> <li>2. Incubar bajo una irradiación de UV a 30°C durante 72 horas</li> <li>3. Observar la producción de PHAs mediante la presencia de fluorescencia.</li> </ol>	<p>(Abdullah et al., 2015)</p> <p>(Cibichakravarthy et al., 2017)</p> <p>(Shi et al., 2017).</p>
<b><i>Tinción con Sudan Black B</i></b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cultivar las bacterias en un medio limitante de nitrógeno usando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración de 0.06 g/L. A una temperatura de 37°C por 48 horas</li> <li>2. Añadir Sudan Black sobre los cultivos</li> <li>3. Observar la tonificación negra sobre las biopelículas que será positivo para la presencia de PHAs</li> </ol>	<p>(Gholami et al., 2020)</p> <p>(Jena et al., 2015)</p> <p>(Montenegro et al., 2017)</p> <p>(Ojha y Das, 2018)</p>

Los métodos de tinción mencionados son útiles al momento de bioprospectar cepas productoras de PHAs. Sin embargo, en el presente proyecto se describe la producción biotecnológica de PHAs usando las cepas seleccionadas mediante la minería de datos previa en la cual resaltan *C. necator* H16 y *C. necator* DSM545, la primera cepa es considerada como el microorganismo modelo para la producción y estudio ya que presenta altos rendimientos y su disponibilidad de información genómica también es amplia, esto permite el estudio bioinformático adecuado de la cepa mencionada.

### ***Cultivo del microorganismo***

El medio empleado para cultivar la cepa varía según su objetivo, en el caso de que la cepa requiera de un mantenimiento y conservación se debe optar por un cultivo en medios con agar. Kunasundari et al., (2017), usaron agar nutriente con fuentes de carbono limitadas como medio de conservación para *C. necator* H16 y se menciona que este medio permite que la especie limite su crecimiento sin perder sus capacidades productivas de PHAs, según Kunasundari los genes también pueden activarse e intensificar su actividad mediante la estimulación con la variación en compuestos nutritivos, generalmente con nitratos, sulfatos o fosfatos.

### ***Medio de cultivo para conservación***

Existen muchos medios de cultivo que se pueden emplear para la conservación o mantenimiento de una cepa productora de PHAs. En este apartado se mencionan los más usados junto con las concentraciones de fuentes de carbono y macroelementos de mayor importancia detalladas en la Tabla 10.

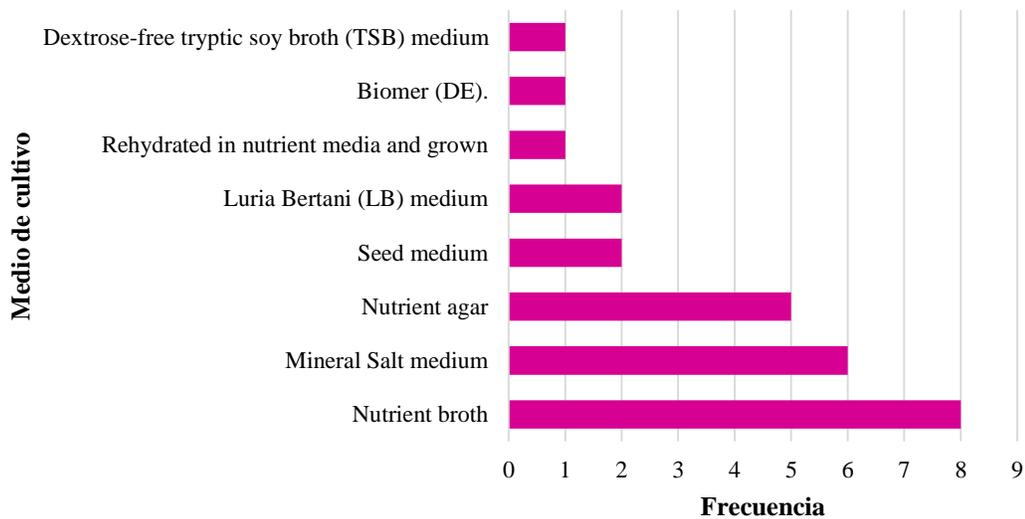
**Tabla 10:** Medio de cultivo y parámetros de pH y temperatura recomendados para la conservación de una cepa productora de PHAs.

<b>Cepa</b>	<b>Medio de mantenimiento</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Referencia</b>
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Nutrient broth	7	30	(Leong, Show, et al., 2017)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Nutrient broth	7	30	(Obruca et al., 2014)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Nutrient agar	7	30	(Kunasundari et al., 2013)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Nutrient agar	7	30	(Leong, Lan, et al., 2017)

<i>Cupriavidus necator</i> <b>H16</b>	Mineral Salt medium	7	30	(López-Abelairas et al., 2015)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Mineral Salt medium	7.4	30	(Sedlacek et al., 2019)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Mineral Salt medium	7	30	(Heinrich et al., 2012)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Luria Bertani (LB) medium	7	37	(Vega-Castro et al., 2016)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Dextrose-free tryptic soy broth (TSB) medium	6.8	30	(Budde et al., 2011)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Specific growth medium	7	37	(Špoljarić et al., 2013)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Seed medium (meat extract 3 g/L, meat peptone 5 g/L, glucose 30 g/L)	7	30	(Li et al., 2019)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Seed medium (meat extract 3 g/L, meat peptone 5 g/L, glucose 30 g/L)	7	32.5	(Li y Wilkins, 2020)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Rehydrated in nutrient media and grown	7	30	(Passanha et al., 2014)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient agar	7	30	(Mozumder et al., 2015)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient broth	7	30	(Mozumder et al., 2014)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient-rich AS-168	7	37	(Alsafadi y Al-Mashaqbeh, 2017)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient Broth, Mineral medium	7	30	(Rodríguez Gamero et al., 2018)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient broth	NN	N	(Montenegro et al., 2017)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient broth	7.4	25	(Das y Grover, 2018)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient broth	6.9	30	(García et al., 2013)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Nutrient agar	7	30	(Brojanigo et al., 2020)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Mineral Salt medium	7	30	(Berezina, 2013)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Luria Bertani (LB) medium	7	30	(Agustín Martínez et al., 2015)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Biomer (DE).	7	30	(Agustín Martínez et al., 2015)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Based medium	7.4	37	(Agustín Martínez et al., 2015)

La selección del medio de cultivo para el mantenimiento de las cepas se dio en base a las frecuencias del medio empleado para el mantenimiento reportado por cada autor (Figura 18). En

el caso de la temperatura se obtuvo que 76% de investigaciones utilizaron 30 °C para mantener, subcultivar y preparar el inóculo durante la investigación. Mientras que para conservar la cepa se emplearon otros métodos como crioconservación, congelación y liofilización, estos métodos mantienen a la cepa por largos periodos ajenos al proceso investigativo. Por otro lado, los resultados del pH presentaron el 80% para un valor de 7 seguido por el 12% para un pH de 7.4. Para el mantenimiento experimental de las cepas se propone el uso de los medios de cultivo (“*Nutrient broth*, *Mineral salt médium*, o *Nutrient agar*”) a una temperatura de 30°C y un pH de 7 el tiempo de cultivo dependerá de la disposición y requerimiento de células para el cultivo.



**Figura 18:** Frecuencias en el empleo de medios de cultivo para el mantenimiento en las investigaciones analizadas en el presente proyecto.

Según García et al., (2013), un medio para los cultivos de inóculo en matraz generalmente está compuesto por:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , extracto de levadura o carne y solución de oligoelementos (elementos traza). La fuente de carbono más utilizada es la glucosa a una razón de 20 – 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Mientras que según lo mencionado por Tripathi et al., (2013), el cultivo de *C. necator* como mantenimiento se lleva a cabo durante todo el estudio a 200 rpm en 25 ml de medio de trabajo en matraces de 200 ml con la finalidad de mantener las cepas disponibles para alguna eventualidad.

### ***Medio de cultivo para crecimiento y fermentación***

Para la selección y propuesta del medio de cultivo para la fermentación en un biorreactor con operación tipo batch se consideró un medio basal con las modificaciones propuestas por (Dey y Rangarajan, 2017; Mozumder et al., 2015; Špoljarić et al., 2013), ya que corresponde al rendimiento más alto reportado para *C. necator*. Los medios de cultivo están orientados a una concentración de inóculo de 5% v/v en matraces Erlenmeyer agitados a 200 rpm con 100 ml de volumen operativo de medio durante 72 horas. En este apartado se proponen dos medios de cultivo seleccionados por el rendimiento que se reportan en sus publicaciones y por el respectivo uso de la fuente de carbono Tabla 11. Sin embargo, la fuente de carbono propuesta está basada en una aplicación biotecnológica empleando los residuos de la industria azucarera que para el caso es la melaza.

**Tabla 11:** Medios de cultivo propuestos para la biosíntesis de PHAs usando *C. necator* H16.

<b>Compuestos nutritivos</b>	<b>Concentración g.L<sup>-1</sup></b>
<b>Opción de medio de fermentación N° 1 (MJR 1)</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.006
Solución de oligoelementos	0.1 ml.L <sup>-1</sup>
Fuente de carbono (Melazas)	30
<b>Opción de medio de fermentación N° 2 (MJR 2)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.1
Solución de minerales traza:	0,5 % v/v

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>2</sub>EDTA, 6 g.L<sup>-1</sup></li> <li>• FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.29 g.L<sup>-1</sup></li> <li>• H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 6.84 g.L<sup>-1</sup></li> <li>• MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.86 g.L<sup>-1</sup></li> <li>• ZnCl<sub>2</sub>, 0.06 g.L<sup>-1</sup></li> <li>• CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.026 g.L<sup>-1</sup></li> <li>• CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.002 g.L<sup>-1</sup></li> </ul>	
Fuente de carbono (Melazas)	30

Según el medio de cultivo para la fermentación propuesto por Ashby et al., (2018), mismo que se denomina medio de siembra y está compuesto por 17 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, 12 g.L<sup>-1</sup> de glucosa; 4 g.L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.47 g.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,2 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 1 ml.L<sup>-1</sup> de solución de oligoelementos. Esta solución fue esterilizada mediante la técnica de filtración usando un filtro de polietersulfona (PES) de 0,2 μm (filtro Whatman). Los autores también mencionan que la fuente de carbono y MgSO<sub>4</sub> se autoclavaron por separado a 121 °C durante 20 min y finalmente estas tres soluciones se mezclaron para formar el medio de cultivo de fermentación. Este medio tuvo un alto rendimiento para la producción de PHAs en *Burkholderia sacchari* DSM 17165 y presenta concentraciones de los macroelementos biodisponibles similares a los medios propuestos para *C. necator* H16.

### ***Parámetros de cultivo a escala laboratorio***

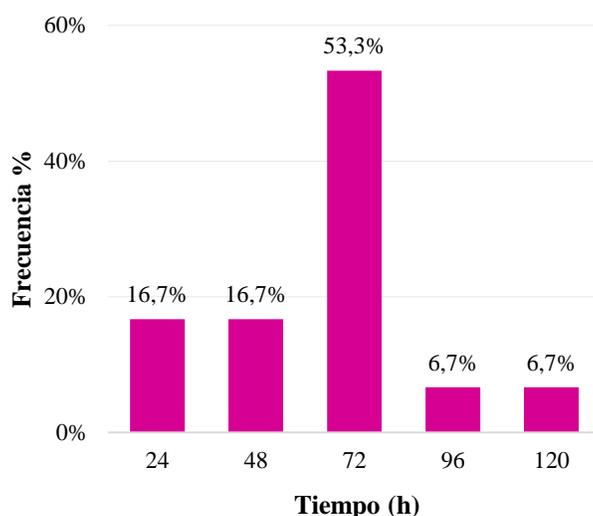
Para la producción de PHAs a escala laboratorio basándose en operaciones tipo batch se requieren de parámetros específicos que han sido preestablecidos por diversas investigaciones experimentales *in vivo* entre las más importantes y notables están: tiempo, pH, temperatura y agitación, estos parámetros se pueden establecer como una propuesta contenida en un escenario teórico, sin embargo, es recomendable evaluar la propuesta frente a otros parámetros que deben ser seleccionados por el investigador. En este caso se recomienda usar un pH ajustado entre 6,9 y 7,0 para cada matraz, para ello se debe usar hidróxido de sodio disuelto según los protocolos del laboratorio. En el caso de la temperatura se recomienda usar 30°C aunque se puede permitir desviaciones de un grado centígrado, mientras que para el caso de la agitación se propone el uso de 200 rpm durante 72 horas como se mencionó en el apartado anterior.

En la investigación desarrollada por Villano et al., (2010), se estudió el efecto del pH en la producción de PHAs en cultivos de consorcios bacterianos. En este estudio se analizaron valores

de pH entre 7 y 9.5 y se obtuvo que a un pH de 7 usando acetato o propionato como fuente de carbono se genera la mayor acumulación de PHAs en las vesículas mientras que, en presencia de varias fuentes de carbono en especial el COD de aguas municipales, se aprecia una alta producción de bioplásticos a valores de pH superiores a 8.

Por otro lado Marang et al., (2016), estudiaron la producción de PHBs a una temperatura de 30°C, en esta investigación se obtuvo una acumulación de 75% de PHB por gramo de biomasa seca de *Burkholderia sp.*, esto representa que la producción de PHB si es recomendable a una temperatura que no requiere de mucha energía. Por su parte Špoljarić et al., (2013), mencionan que a una temperatura de 38 °C se obtienen una producción del 80% de PHB por gramo de biomasa seca de *Cupriavidus necator*, esto usando glicerol como fuente de carbono. En un ambiente biotecnológico no es recomendable producir a elevadas temperaturas porque requieren de elevados gastos de energía para subir la temperatura y los gastos mencionados se convierten en costos de producción innecesarios.

Basándose en lo propuesto en apartados anteriores el tiempo de fermentación recomendado es de 72 horas ya que representa el 53.3% según la frecuencia de las investigaciones seleccionadas para *C. necator* seguido por 24 y 48 horas con el 16.7% (Figura 19). Estas bacterias que producen a menor tiempo son cepas modificadas o en operaciones de fermentación tipo fed-batch o continua. Según los estudiado por (Ashby et al., 2018; Clifton-García et al., 2020; C. Kourmentza et al., 2018; Ramos et al., 2020), el tiempo de 72 horas permite acumular grandes porcentajes de PHAs como rendimiento por gramo de biomasa y es adecuado para una aplicación biotecnológica.



**Figura 19:** Frecuencias de los tiempos empleados para la fermentación durante la producción de PHAs en operaciones tipo batch.

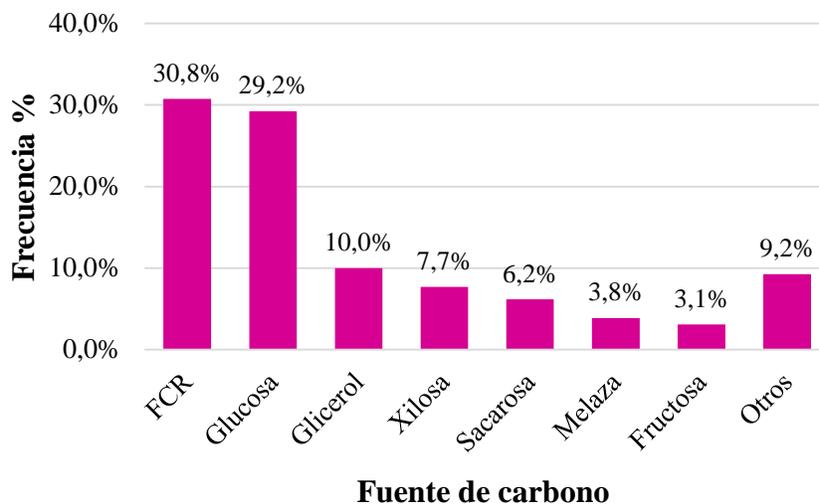
### ***Tipo de sustrato y concentración***

La aplicación biotecnológica para la producción de PHAs se inclina sobre el costo de producción y en este contexto se prioriza el costo de materia prima durante el Upstream que está compuesto por: energía, compuestos químicos, equipos de producción y nutrientes para el cultivo microbiano, principalmente la fuente de carbono.

En las investigaciones analizadas durante el presente proyecto se obtuvo que el 30.8% de investigaciones trabajaron con Fuentes de Carbono Residual (FCR) en donde se incluyen aguas residuales, fuentes de carbono residual de la industria pecuaria, agraria y agroindustrial. En el segundo lugar se encuentra el uso de glucosa como fuente de carbono representado por un 29.2%, seguido de glicerol, xilosa, sacarosa, melaza, fructosa con el 10%, 7.7%, 6.2%, 3.8% y 3.1% respectivamente. Finalmente se describen otras fuentes de carbono que contemplan un solo tipo de moléculas como es el caso gluconato de sodio, acetato, ácido acético, propionato, entre otros Figura 20.

El grupo de fuentes de carbono de un solo tipo de molécula que se mencionaron en el apartado anterior, requieren de altos costos de adquisición exceptuando la melaza que es un subproducto de la industria azucarera. Por esta razón, se seleccionó a la melaza como una fuente

de gran importancia biotecnológica para la propuesta de producción de PHAs a escala laboratorio usando *C. necator* H16 o *C. necator* DSM545 como organismos productores.



**Figura 20:** Frecuencia de empleo de diferentes fuentes de carbono empleadas en el proceso de producción de PHAs.

### ***Tratamiento de la melaza***

Existen diferentes tipos de melazas o conocidas como mieles en la industria azucarera estos residuos están compuestos por diversos tipos de azúcares y requieren ser disueltos e hidrolizados previamente para ser usados. Según (CONADESUCA, 2016), la melaza tiene una contextura viscosa y generalmente está compuesta por un 60% a 70% de materia sólida, entre el 30% y 40% de sacarosa y de 4% a 5% de compuestos nitrogenados como glutamato o aspartato y como ya se mencionó, la melaza requiere de un pretratamiento para ser utilizada. Por lo tanto, la propuesta del presente proyecto, está basada en la metodología descrita por Zakaria, (2014). La cual presenta los siguientes procesos:

- 1. Disolución:** La melaza del azúcar de caña se debe mezclar con agua destilada a una relación 1:1 y esta solución se debe agitar durante 5 horas a 40°C.
- 2. Centrifugación:** La solución obtenida se debe centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, posteriormente se extrae el líquido clarificado que será usado para todos los tratamientos. Esto ayudará a eliminar los residuos sólidos que afectarán al cultivo microbiano.

3. **Tratamiento con  $H_2SO_4$ :** En este proceso, se ajusta el pH de la melaza a 3 usando 0.1N de  $H_2SO_4$  y se deja reposar por 1.5 horas para permitir el efecto hidrolizante y finalmente se tiene que centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos. El extraerá el sobrenadante para el proceso de fermentación y se debe ser almacenado a 4°C.
4. **Tratamiento con  $Ca_3 (PO_4)_2$ :** En este proceso se debe ajustar el pH a 7 empleando NaOH 0.1N y tratarlo con fosfato tricálcico al 2% (p/v). Consecutivamente, se debe autoclavar a 105°C por 5 minutos y finalmente se debe centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante final será usado como fuente de carbono para la fermentación.

#### ***Producción de PHAs con melaza***

La melaza presenta amplias aplicaciones como materia prima de bajos costos en procesos fermentativos en la industria biotecnológica, la principal fuente de producción de melaza es la caña de azúcar, remolacha azucarera y soja. El precio de la melaza en el mercado está entre el 33 y 50% del precio de la sacarosa o azúcar de mesa blanca. Esta fuente de carbono se convierte en un excelente sustrato para la producción de PHAs debido a su abundante concentración de mono y disacáridos (Du et al., 2012).

Según los estudios realizados por Zhang et al., (1994), los compuestos tóxicos contenidos en la melaza hidrolizada con ácido sulfúrico afectan al crecimiento de *E. coli* recombinante que expresa los genes de *pha* de *C. necator*, mientras que *Klebsiella* con las misma recombinación tienen rendimientos superiores a *E. coli* bajo las mismas condiciones, esta cepa acumuló P(3HB) a una concentración de 1 gPHA por litro de cultivo por hora.

Por su parte Saranya y Shenbagarathai, (2011), menciona que la producción de PHA empleando melaza como fuente de carbono es superior en un 18.3% a la producida con sacarosa como fuente de carbono utilizando *E. coli* recombinante que contiene el gen *phaCI* de *Pseudomonas sp.* LDC-5. Esto se debe a la concentración de azúcares en la melaza sin presencia de compuestos tóxicos con diferencia de los reportado por Zhang et al., (1994).

Según Gomaa, (2014), el crecimiento y acumulación óptima de PHA se apreció en cultivos de *Bacillus subtilis* enriquecidos con 2% de melaza obteniendo un rendimiento de biomasa seca

de 10.98 g/L con un contenido de PHA del 48.26%. En este proceso se estimuló el crecimiento bacteriano y acumulación de PHA usando etanol al 1% y 1 g/L de amonio y nitrato de amonio.

El proceso de Upstream finaliza con la extracción del caldo de cultivo bacteriano y se procede a la extracción y caracterización que corresponde a una segunda fase denominada Downstream. Existe también una fase intermedia conocida como Midstream, esta fase no es muy estudiada en la industria biotecnológica debido a que hace referencia al transporte del producto del Upstream, no obstante, este término es muy usado en la industria del petróleo. A continuación, se describe el proceso de Downstream.

#### **4.3.2. Proceso de Downstream**

El proceso de Downstream es la parte final de un bioproceso, en esta fase se extrae y purifica el producto biotecnológico que posteriormente será aplicado como materia prima para un producto específico como es el caso de los bioplásticos o biopolímeros para prótesis en el área biomédica o cosmética. A continuación, se describe el proceso de Downstream que se le atribuye a la producción de PHAs hasta obtener biomoléculas que serán usadas como sustituyente polímeros derivados del petróleo.

##### ***Recuperación y purificación de PHAs***

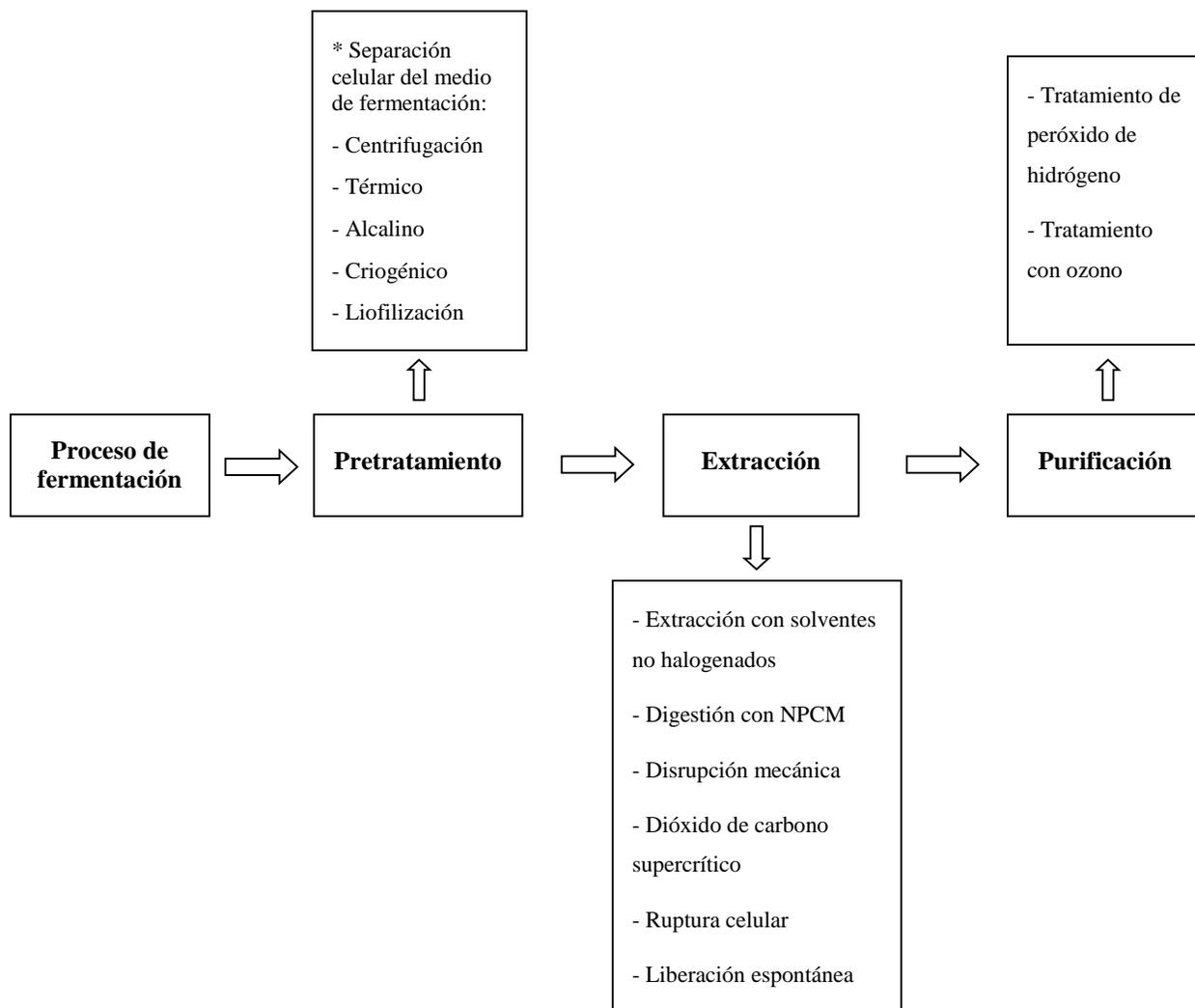
Los polihidroxicanoatos (PHA) son una de las posibles alternativas ecológicas al plástico sintético derivado del petróleo. Su biodegradabilidad y producción a partir de recursos renovables los convierten en sustitutos extremadamente deseables de los plásticos sintéticos. Sin embargo, el uso de PHA como sustituto se ve obstaculizado por el costo total de fabricación, que es mucho más caro que la fabricación de plásticos sintéticos no biodegradables.

La recuperación de PHA juega un papel vital en el costo total de producción. Dado que el PHA es un producto intracelular, se requieren métodos de pretratamiento celular y extracción para aislar y purificar el PHA del interior de las células bacterianas, lo que ha introducido costos adicionales en el proceso de producción de PHA. El método de extracción por solventes es la forma más común y convencional de extracción de PHA. Según Ramos et al., (2020) y Yang et al., (2015), este método podría representar hasta el 50 % o más del costo total de fabricación de PHA. Por lo tanto, el procesamiento posterior de la recuperación de PHA es uno de los pasos clave para garantizar la rentabilidad del sistema de fermentación.

Reducir el costo del método de recuperación de PHA no es el único factor para considerar durante el procesamiento posterior. El requisito de una operación más simple y un sistema equilibrado, mientras se mantiene la calidad del material, también es esencial para el establecimiento de un método de extracción rentable (Mohamad Fauzi et al., 2019). Esto es aún más importante cuando se trata de la extracción de PHA a gran escala, ya que una operación más simple garantiza un menor consumo de energía y un tiempo de proceso más corto. Un eco-equilibrado el sistema implica el uso de productos químicos respetuosos con el medio ambiente que reducen el impacto ambiental; además, este sistema no requiere laboriosos pasos adicionales de tratamiento posterior de aguas residuales (Pérez-Rivero et al., 2019). Por lo tanto, los métodos que devuelven un alto porcentaje de recuperación y pureza, con una reducción mínima de la masa molar, son favorables ya que se conserva la calidad del material.

Según Ashby et al., (2018), hay algunos factores que influyen en la elección del método de recuperación de PHA, que incluyen: tipo de cepa microbiana (fragilidad variable de la membrana celular), tipo de PHA (PHA de cadena corta, PHA de longitud de cadena media y PHA de longitud de cadena larga), carga (contenido) de PHA en la biomasa, pureza requerida de acuerdo con la aplicación del polímero, disponibilidad y eliminación de productos químicos, y su impacto en el peso molecular de PHA extraído.

La extracción de gránulos de PHA es la operación principal en la recuperación de PHA. Sin embargo, se podrían agregar pasos de pretratamiento y purificación, respectivamente, antes y después de cada paso de extracción. El primero tiene como objetivo mejorar el proceso de disrupción celular, mientras que el segundo tiene como objetivo obtener PHA de mayor pureza. Por lo tanto, la recuperación de PHA podría estar compuesta por tres pasos, es decir, pretratamiento, extracción y purificación. La Figura 21 muestra la descripción general de los tres pasos involucrados en la recuperación de PHA.



**Figura 21:** *Proceso de recuperación y purificación de PHAs a partir de un bioproceso fermentativo.*

- **Pretratamiento de biomasa**

El paso de pretratamiento consiste principalmente en separar la biomasa celular del ambiente acuoso después de la fermentación. Por lo general, esto se logra mediante centrifugación o filtración, con una concentración típica de biomasa de alrededor de 5 – 9 g/l (Campanari et al., 2017; Janarthanan et al., 2014). Antes de la extracción del polímero, la biomasa normalmente se somete a un paso de secado para eliminar los residuos de agua, ya que esto reduciría la eficiencia de extracción, lo que posteriormente provocaría una disminución en el peso molecular del PHA resultante (Riedel et al., 2013). Por ejemplo, el pretratamiento con sal funciona deshidratando la

célula en condiciones de alta concentración de sal, mientras que la liofilización consiste en liofilizar la biomasa en condiciones de vacío en el equipo adecuado. Algunos pasos de pretratamiento de biomasa, como calor y alcalinos, contribuyen a la desnaturalización de las proteínas microbianas y el material genético. En algunas situaciones, estos métodos de pretratamiento podrían combinarse; por ejemplo, (Alsafadi y Al-Mashaqbeh, 2017) realizaron un método combinado de pretratamiento con sal y alcalinos para una disrupción celular más eficaz.

- **Extracción de PHAs**

Hay varios métodos de extracción de PHA que se encuentran en la literatura (Tabla 12). La extracción con solventes es el método más antiguo y utilizado para extraer PHA de la biomasa liofilizada y se ha utilizado desde el descubrimiento de PHA por Lemoigne 1927 (Obruca et al., 2018; Oliveira-Filho et al., 2021). Por lo general, los solventes halogenados, como el cloroformo, el diclorometano y el etano policlorado, se usan en la extracción de PHA. Estos disolventes actúan debilitando la membrana celular y posteriormente disuelven el PHA. A escala de laboratorio, el PHA que contiene los disolventes se concentran evaporando el exceso de disolvente utilizando un aparato Soxhlet. Esto es seguido por la precipitación usando antisolventes, típicamente los alcoholes de bajo peso molecular, como el metanol y el etanol a temperaturas más bajas (Palmieri et al., 2021).

**Tabla 12:** *Métodos de extracción de PHAs.*

<b>Método de Extracción</b>	<b>Referencia</b>
Extracción con disolventes (halogenados, no halogenados)	(Aramvash et al., 2015)
Digestión de NPCM (químico, surfactante, enzima)	(Wen et al., 2018)
Disrupción mecánica de NPCM (HPH, ultrasonicación, molinos de perlas)	(Gutt et al., 2016)
Dióxido de carbono supercrítico	(Cruz et al., 2014)
Fragilidad celular	(Danis et al., 2015)
DAF	(Carvalho et al., 2014)
Clasificación del aire	(De Eugenio et al., 2007)
Liberación espontánea	(Chen et al., 2017)

## **Purificación de PHAs**

El tratamiento con peróxido de hidrógeno es un método común utilizado para la purificación de PHA y se combina con enzimas o agentes quelantes. El método de purificación con ozono fue propuesto por Horowitz y Brennan en 2001. Se añadió aproximadamente del 2 al 5% de ozono a la biomasa que contribuyó al blanqueo, solubilización y desodorización de las impurezas. Esta es una alternativa al tratamiento con peróxido de hidrógeno que requiere altas temperaturas de operación y da como resultado una alta concentración de PHA de peso molecular reducido (Tugarova et al., 2021).

## ***Cuantificación de PHAs***

Los polihidroxicanoatos (PHA) son un grupo de polímeros compuestos por una amplia gama de monómeros. La variedad de monómeros y la composición porcentual influyen en las propiedades del material, contribuyendo al desarrollo de diferentes aplicaciones. Esto destaca la importancia de determinar y cuantificar los tipos y la composición de los monómeros.

Lemoigne 1926, quien fue el primero en descubrir el polihidroxitirato [P(3HB)], también fue el primero en describir la cuantificación de PHA. En su informe, el P(3HB) se pesó y calculó con precisión usando dos fracciones volátiles y no volátiles resultantes que contenían los compuestos correspondientes al peso total de PHA en la biomasa. Este método requiere una gran cantidad de biomasa y no dio una medida precisa. Además, este método gravimétrico requiere mucho tiempo ya que se involucraron una serie de procesos para obtener P(3HB) puro.

Venkateswar Reddy et al., (2017), desarrollaron un método más rápido y sensible que determinó espectrofotométricamente el PHA en función de la turbidez de la biomasa después del tratamiento con hipoclorito de sodio. Este método adolecía de la necesidad de personalizarse para diferentes microorganismos y solo podía medir el polímero en los gránulos de PHA de lípidos nativos.

Maheshwari et al., (2018) usaron un ensayo espectrofotométrico de P(3HB) convirtiendo cuantitativamente P(3HB) en ácido crotónico, utilizando un proceso de calentamiento y concentrado ácido sulfúrico, que posteriormente se midió con luz ultravioleta (UV) a una absorción de 235 nm. Este ensayo solo requirió una pequeña cantidad de PHA extraído, hasta 5

µg; sin embargo, se requerían procedimientos laboriosos, como centrifugaciones repetidas después de la digestión de la biomasa y el lavado de las muestras.

Impallomeni et al., (2018) estudiaron la cuantificación de PHA mediante cromatografía de gases (GC). Se consideró que era un gran avance en el desarrollo del método de cuantificación de PHA porque proporcionaba una medición analítica precisa y más reproducible. Se encontró que la hidrólisis ácida de la biomasa microbiana es superior a la hidrólisis alcalina, ya que la primera dio como resultado la formación de un solo éster metílico y la última resultó en dos ésteres metílicos para un solo componente. Además, la cuantificación mediante GC podría mejorarse mediante el uso de un patrón interno. Se encontró que este método muestra un mejor rendimiento en comparación con la mayoría de los métodos utilizados anteriormente; por lo tanto, este método fue adaptado y utilizado por muchos autores.

El uso de resonancia magnética nuclear (RMN) en la cuantificación de PHA se exploró por completo a partir de 1980 en adelante. RMN es un enfoque no invasivo, que se puede utilizar con precisión para determinar los diferentes tipos de PHA que consisten en una variedad de estructuras químicas (Anburajan et al., 2019).

El método se propuso para superar algunos inconvenientes, como la menor robustez del detector de ionización de llama (FID) de GC, que depende en gran medida de los estándares analíticos de PHA disponibles. GC-MS puede compensar los inconvenientes de GC-FID ya que las supuestas composiciones de PHA podrían identificarse comparando el patrón de pico con la Biblioteca de referencia estándar del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (Gaithersburg, MD, EE. UU.) (Davis et al., 2013). Sin embargo, esto requiere una mayor validación. Además, los estándares analíticos existentes para PHA no son suficientes para representar todos los tipos de monómeros de PHA descubiertos hasta ahora.

Convencionalmente, la cuantificación de PHA mediante análisis GC comenzaba con el proceso de transesterificación que convertía los monómeros de PHA en ésteres metílicos. Este proceso implica el uso de disolventes clorados, como el cloroformo y el diclorometano, ya que proporcionan un excelente sistema de extracción para las mediciones analíticas de PHA. Además, el proceso de metanólisis también requirió el uso de reactivos adicionales como el ácido sulfúrico, por lo que requiere mucho tiempo y genera un gran volumen de desechos; además, los disolventes clorados se clasifican como reactivos peligrosos y tóxicos (Lakshman y Shamala, 2006).

En otro estudio realizado por Luokun Huang et al., (2016), los autores demostraron la rápida cuantificación de PHA utilizando Nile blue A (NBA). Esta investigación adoptó como caso de estudio el uso de cultivos mixtos microbianos en lodos activados; se encontró que la producción de PHA por microorganismos en lodos activados presenta un rendimiento comparable o incluso superior al del sistema de cultivo puro. Por lo tanto, los autores destacaron la importancia de la aplicación de la cuantificación rápida de PHA para detectar un gran conjunto de microorganismos, con capacidad de producción de PHA, en lodos activados.

El método para la cuantificación rápida de PHA se logró no solo introduciendo las tinciones de fluorescencia rojo Nilo o NBA como se discutió anteriormente, sino también usando espectroscopia infrarroja. Al igual que el método de tinción de colorantes, la espectroscopia infrarroja evita el uso de disolventes y requiere un volumen de muestra y una preparación mínimos (Zihayat et al., 2019). Sin embargo, se aplicó solo en la fermentación de cultivos microbianos puros.

La citometría de flujo se utiliza para estudiar el estado de una sola célula. Se usa comúnmente para analizar y cuantificar componentes, como proteínas, ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, receptores y enzimas, utilizando colorantes fluorescentes específicos (M. Li y Wilkins, 2020); el método se ha utilizado para cuantificar la PHA intracelular. En el informe de Li y Wilkins se tenían como objetivo mejorar el método de cuantificación de PHA basado en citometría de flujo utilizando Nile red. Para minimizar la tinción no específica, las células que no acumulan PHA (cultivadas en caldo rico en nutrientes) se hicieron fluir a través del equipo de citometría de flujo que actúa como control negativo para la selección. La viabilidad del control negativo se confirmó cuantificando el contenido de lípidos (fosfolípidos) de las cepas bacterianas durante la acumulación de PHA (Maheshwari et al., 2018).

En cuanto a la comparación, hay una reducción en la determinación del contenido de PHA cuando se utiliza el método clásico. Los autores sugirieron que esto podría deberse a la pérdida de una porción de PHA durante el procesamiento posterior. Con una mayor sensibilidad y eliminación del componente de fondo teñido con lípidos, el flujo basado en rojo Nilo se encontró que la cuantificación de PHA mejoró. Este estudio también justifica el uso del método de cuantificación para la determinación de PHA en tiempo real en aplicaciones industriales.

### *Caracterización de PHAs*

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son un grupo de polímeros compuestos por una diversa gama de monómeros de hidroxialcanoatos, que son responsables de las variadas características de los PHA. Dependiendo del contenido de monómero, estos polímeros pueden ser homopolímeros, copolímeros y terpolímeros (Naranjo et al., 2013). La variación de las características de los polímeros se debe principalmente al procesamiento anterior del PHA, como los tipos de cepas bacterianas aisladas (grampositivas y gramnegativas; género y especie; fuente de aislamiento), las materias primas de carbono (tipos y concentración), los aspectos físicos de los parámetros de fermentación (pH, temperatura), modos de fermentación (por lotes, lote alimentado, lote continuo), escala de fermentación (matraz de agitación, varias escalas de biorreactores), etapas de cultivo (una etapa, dos etapas ) y también manipulando los ingredientes y la composición de los medios (aspectos químicos de los parámetros de fermentación) (Das y Grover, 2018).

La caracterización de PHA es un paso esencial en el procesamiento de PHA y es necesaria debido a la diversidad de características de los polímeros provocada por los diversos factores mencionados anteriormente. PHA son diferentes a plásticos sintetizados químicamente que tienen menos variabilidad en términos de estructura química y, posteriormente, en las propiedades de los materiales resultantes (Chek et al., 2017).

La caracterización de PHA está bien establecida. Hasta la fecha, se han empleado varios análisis para determinar las propiedades físicas y químicas de estos polímeros, incluidos: análisis de cromatografía de gases para cuantificación, ensayo de tracción para determinar las propiedades físicas de los polímeros, análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para caracterización térmica, análisis nuclear análisis de resonancia magnética (RMN) para determinar la aleatoriedad del polímero y la composición del monómero, análisis de difracción de rayos X para estudiar la estructura cristalina del PHA, análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier para determinar la estructura (grupos funcionales) del polímero y análisis termogravimétrico (TGA) para estudiar la descomposición térmica del polímero (Anburajan et al., 2019).

## CAPITULO V

### Conclusiones

- Mediante la aplicación de redes sociales artificiales se obtuvo que las cepas bacterianas *C. necator* DSM 545 y *C. necator* H16 son las más representativas y estudiadas por su capacidad para producir derivados de PHAs como PHB, P3HB, P(3HB-co-3HV). De estas cepas se observó que *C. necator* H16 presenta 74% de PHA por gramo de biomasa seca, es decir mayor rendimiento de gPHAs/gBiomasa\*L en relación con *C. necator* DSM 545.
- En el análisis metabólico se obtuvo que los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* codifican para las enzimas acetil-CoA acetiltransferasa, acetoacetil-CoA reductasa y ácido Poli(R)-hidroxialcanoico sintasa respectivamente, estas enzimas transforman las moléculas de Acetil-CoA en P3HB y se caracterizan por usar azúcares para producir PHAs de cadena corta en su proceso biosintético.
- La información científica previamente publicada y analizada con Data mining, permitió describir los escenarios teóricos para los procesos de Upstream y Downstream a escala de laboratorio usando *C. necator* H16 como microorganismo modelo para la producción de PHAs que se puede fermentar a un pH de 6.5 con una temperatura de 37°C y 72 horas en el medio de cultivo MJR2.

## Recomendaciones

- Es importante verificar los sinónimos referenciales para las cepas ya que sus registros pueden ser variantes como el caso de *C. necator* H16 que reporta también como: *Cupriavidus necator* ATCC 428, *Ralstonia eutropha* H16, *Ralstonia eutropha* ATCC, *Alcaligenes eutropha* H16 o *Wautersia eutropha* H16. Esto puede alterar los resultados ya que incrementa la dispersión de la información categórica.
- Para determinar la ruta biosintética de PHAs se recomienda identificar previamente el tamaño de la molécula ya que los PHAs de cadena corta consumen azúcares como fuente de carbono mientras que los PHAs de cadena larga consumen ácidos grasos y usan distintas enzimas, la producción de PHAs también depende del tipo de microorganismo, su capacidad de consumir distintas fuentes de carbono y adaptación a la presencia de sales o cambios de macronutrientes.
- Los procesos de Upstream y Downstream, pueden variar de acuerdo con el tipo de especie o género microbiano, por lo que se recomienda analizar variables como el consumo de sustrato y nutrientes, producción de PHAs, ruta de biosíntesis, parámetros fisicoquímicos, tiempo de producción y viabilidad de producción para utilizar la metodología planteada en nuevas investigaciones con enfoques futuros de producción de bioplásticos de manera *in vivo*.
- El desarrollo de la presente investigación es una iniciativa para el enfoque de nuevos trabajos a futuro en el cual se pueda plasmar la metodología propuesta de manera *in silico* a una escala de laboratorio y a su vez a escala industrial.

## Bibliografía

- Abdullah, A. A.-A., Huong, K.-H., & Ramachandran, H. (2015). Microbial-based Polyhydroxyalkanoates: Upstream and Downstream Processing. In *Smithers Rapra Technology*. [https://www.bioplasticmagazine.com/en/books/smithers\\_Microbial.php](https://www.bioplasticmagazine.com/en/books/smithers_Microbial.php)
- Abdullah, A. A.-A., Huong, K.-H., & Ramachandran, H. (2015). Microbial-based Polyhydroxyalkanoates: Upstream and Downstream Processing. In *Smithers Rapra Technology*. [https://www.bioplasticmagazine.com/en/books/smithers\\_Microbial.php](https://www.bioplasticmagazine.com/en/books/smithers_Microbial.php)
- Agustín Martínez, G., Bertin, L., Scoma, A., Rebecchi, S., Braunegg, G., & Fava, F. (2015). Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biochemical Engineering Journal*, 97, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.015>
- Alsafadi, D., & Al-Mashaqbeh, O. (2017). A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*, 34, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.003>
- Anburajan, P., Naresh Kumar, A., Sabapathy, P. C., Kim, G. B., Cayetano, R. D., Yoon, J. J., Kumar, G., & Kim, S. H. (2019). Polyhydroxy butyrate production by *Acinetobacter junii* BP25, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, and their co-culture using a feast and famine strategy. *Bioresource Technology*, 293(August), 122062. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122062>
- Aramvash, A., Gholami-Banadkuki, N., Moazzeni-Zavareh, F., & Hajizadeh-Turchi, S. (2015). An environmentally friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer with non-halogenated solvents. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1936–1943. <https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05053>
- Argiz, L., González-Cabaleiro, R., Val del Río, Á., González-López, J., & Mosquera-Corral, A. (2021). A novel strategy for triacylglycerides and polyhydroxyalkanoates production using waste lipids. *Science of the Total Environment*, 763, 142944. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142944>
- Asamblea General Constituyente. (2019). Reglamento al Código Orgánico del Ambiente. *Fielweb Evolución Jurídica*, 752(507), 1–192.
- Asamblea Nacional Constituyente. (2018). Ley Organica del Regimen de la Soberania

- Alimentaria. *Ley Orgánica Del Regimen de La Soberanía Alimentaria*, 2(5), 255.  
<http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu88076.pdf>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2017). Código Orgánico Del Ambiente. *Registro Oficial Suplemento* 983, 1–92.  
[http://gobiernoabierto.quito.gob.ec/Archivos/Transparencia/2017/07julio/A2/ANEXOS/PR-OCU\\_CODIGO\\_ORGANICO\\_ADMINISTRATIVO.pdf](http://gobiernoabierto.quito.gob.ec/Archivos/Transparencia/2017/07julio/A2/ANEXOS/PR-OCU_CODIGO_ORGANICO_ADMINISTRATIVO.pdf)
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y., Nuñez, A., Strahan, G. D., & Johnston, D. B. (2018). *Burkholderia sacchari* DSM 17165: A source of compositionally-tunable block-copolymeric short-chain poly(hydroxyalkanoates) from xylose and levulinic acid. *Bioresource Technology*, 253, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.045>
- Basnett, P., Marcello, E., Lukasiewicz, B., Panchal, B., Nigmatullin, R., Knowles, J. C., & Roy, I. (2018). Biosynthesis and characterization of a novel, biocompatible medium chain length polyhydroxyalkanoate by *Pseudomonas mendocina* CH50 using coconut oil as the carbon source. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(12). <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6183-9>
- Bello Lara, R. (2018). Análisis estático de la red de colaboración científica en la Revista Cubana de Ciencias Informáticas. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*, 12(1), 220–232.
- Bengtsson, S., Karlsson, A., Alexandersson, T., Quadri, L., Hjort, M., Johansson, P., Morgan-Sagastume, F., Anterrieu, S., Arcos-Hernandez, M., Karabegovic, L., Magnusson, P., & Werker, A. (2017). A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale. *New Biotechnology*, 35, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.11.005>
- Berekaa, M. M., & Al Issa, A. M. (2016). Enhanced production of polyhydroxybutyrate (PHB) from agro-industrial wastes: fed-batch cultivation and statistical media optimization. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 05(06), 606–611. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.6.606-611>
- Berezina, N. (2013). Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. *New Biotechnology*, 30(2), 192–195. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.002>

- Bhattacharjee, J. (2020). Practical Machine Learning with Rust. In *Practical Machine Learning with Rust*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4842-5121-8>
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.
- Brojanigo, S., Parro, E., Cazzorla, T., Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2020). Conversion of starchy waste streams into polyhydroxyalkanoates using *Cupriavidus necator* DSM 545. *Polymers*, 12(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/polym12071496>
- Budde, C. F., Riedel, S. L., Willis, L. B., Rha, C. K., & Sinskey, A. J. (2011). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2847–2854. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-10>
- Burchell, J. T., Wikstrom, M. E., Stumbles, P. A., & Sly, P. D. (2015). *Page 1 of 43* 1–43. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00521.2007>
- Caballero, R., Martín, E., & Riesco, A. (2019). *Big Data Con Python*.
- Campanari, S., Augelletti, F., Rossetti, S., Sciubba, F., Villano, M., & Majone, M. (2017). Enhancing a multi-stage process for olive oil mill wastewater valorization towards polyhydroxyalkanoates and biogas production. *Chemical Engineering Journal*, 317, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.094>
- Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M. G. E., & Reis, M. A. M. (2014). The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *New Biotechnology*, 31(4), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.010>
- Castilho, L. R., Mitchell, D. A., & Freire, D. M. G. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(23), 5996–6009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>
- Chek, M. F., Kim, S. Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2,

- producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05509-4>
- Chen, G. Q., & Jiang, X. R. (2018). Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.008>
- Chen, X., Yin, J., Ye, J., Zhang, H., Che, X., Ma, Y., Li, M., Wu, L. P., & Chen, G. Q. (2017). Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). In *Bioresource Technology* (Vol. 244). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.149>
- Ching, K. Y., Andriotis, O. G., Li, S., Basnett, P., Su, B., Roy, I., Tare, R. S., Sengers, B. G., & Stolz, M. (2016). Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate)/poly(3-hydroxyoctanoate) scaffolds provide a functional microenvironment for cartilage repair. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(1), 77–91. <https://doi.org/10.1177/0885328216639749>
- Choonut, A., Yunu, T., Pichid, N., & Sangkharak, K. (2017). The Optimization Conditions of Polyhydroxybutyrate Methyl Ester from Polyhydroxybutyrate via Acid-Catalyst. *Energy Procedia*, 138, 435–440. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.195>
- Christensen, H. (2019). Introduction to Bioinformatics in Microbiology. In *Anticancer research* (Vol. 39, Issue 3).
- Cibichakravarthy, B., Abinaya, S., & Prabakaran, S. R. (2017). Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.100>
- Clifton-García, B., González-Reynoso, O., Robledo-Ortiz, J. R., Villafañá-Rojas, J., & González-García, Y. (2020). Forest soil bacteria able to produce homo and copolymers of polyhydroxyalkanoates from several pure and waste carbon sources. *Letters in Applied Microbiology*, 70(4), 300–309. <https://doi.org/10.1111/lam.13272>
- Coats, E. R., Watson, B. S., & Brinkman, C. K. (2016). Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. *Water Research*, 106, 26–40.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.039>

Colombo, B., Sciarria, T. P., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, 218(2016), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.024>

CONADESUCA. (2016). *NOTA INFORMATIVA PARA GANADO CONADESUCA Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar NOTA INFORMATIVA Contenido*. [www.gob.mx/conadesuca](http://www.gob.mx/conadesuca)

Constitución de la Republica del Ecuador. (2008). Constitución de la República del Ecuador 2008 [Constitution of the Republic of Ecuador 2008]. *Incluye Reformas*, 1–136. <https://n9.cl/hd0q>

Cordón García, Ó. (2013). Tema 6. Modularidad, Particionamiento y Comunidades. *Redes y Sistemas Complejos Cuarto Curso Del Grado En Ingeniería Informática*, 64. <https://sci2s.ugr.es/sites/default/files/files/Teaching/GraduatesCourses/RedesSistemasComplejos/Tema06-DetecciondeComunidades-13-14.pdf>

Cruz, M. V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V. D., Simões, P., Barreiros, S., & Reis, M. A. M. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource Technology*, 157, 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.013>

Danis, O., Ogan, A., Tatlican, P., Attar, A., Cakmakci, E., Mertoglu, B., & Birbir, M. (2015). Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery. *Extremophiles*, 19(2), 515–524. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0735-4>

Das, M., & Grover, A. (2018). Fermentation optimization and mathematical modeling of glycerol-based microbial poly(3-hydroxybutyrate) production. In *Process Biochemistry* (Vol. 71). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.017>

Davis, R., Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., Kenny, S., O'Donovan, A., Guzik, M., Shaikh, H., Duane, G., Gupta, V. K., Tuohy, M. G., Padamatti, R. B., Casey, E., & O'Connor, K. E. (2013). Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains.

*Bioresource Technology*, 150, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.001>

De Donno Novelli, L., Moreno Sayavedra, S., & Rene, E. R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresource Technology*, 331(March). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124985>

De Eugenio, L. I., García, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., Román, J. S., García, J. L., & Prieto, M. A. (2007). Biochemical evidence that phaZ gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: Characterization of a paradigmatic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4951–4962. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608119200>

Dey, P., & Rangarajan, V. (2017). Improved fed-batch production of high-purity PHB (poly-3 hydroxy butyrate) by *Cupriavidus necator* (MTCC 1472) from sucrose-based cheap substrates under response surface-optimized conditions. *3 Biotech*, 7(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0948-6>

Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W., & Ki Carol Lin, S. (2012). Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*, 6(1), 14–25. <https://doi.org/10.2174/187231312799984394>

Duque, A. F., Oliveira, C. S. S., Carmo, I. T. D., Gouveia, A. R., Pardelha, F., Ramos, A. M., & Reis, M. A. M. (2014). Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition. *New Biotechnology*, 31(4), 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.010>

Espinosa Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. *LE Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds). INECC. México*, 517–539. <https://hopelchen.tecnm.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r119344.PDF>

Estévez-Alonso, Á., van Loosdrecht, M. C. M., Kleerebezem, R., & Werker, A. (2021). Simultaneous nitrification and denitrification in microbial community-based polyhydroxyalkanoate production. *Bioresource Technology*, 337(June). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125420>

Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2019). Improving polyhydroxyalkanoate production from

- inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(1), 208–227. <https://doi.org/10.1002/bbb.1944>
- Fradinho, J. C., Oehmen, A., & Reis, M. A. M. (2019). Improving polyhydroxyalkanoates production in phototrophic mixed cultures by optimizing accumulator reactor operating conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1085–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.270>
- Gahlawat, G. (2019). *Polyhydroxyalkanoates Biopolymers: Production Strategies*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33897-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33897-8_4)
- Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. (2012). Estimation of fundamental kinetic parameters of polyhydroxybutyrate fermentation process of *azohydromonas australica* using statistical approach of media optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5), 1051–1064. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9840-3>
- García, I. L., López, J. A., Dorado, M. P., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Papanikolaou, S., Villar, M. A., & Koutinas, A. A. (2013). Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 130, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.088>
- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details*. (n.d.). Retrieved September 4, 2022, from <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-428>
- Gholami, A., Ghasemi, Y., Kazemi, A., Abootalebi, S. N., Irajie, C., Ireji, A., Omidifar, N., & Mohkam, M. (2020). Bacterial strain isolated from high-salt environments can produce large amounts of new polyhydroxyalkanoate (Pha). *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 8(4), 1268–1273. [https://doi.org/10.47277/JETT/8\(4\)1273](https://doi.org/10.47277/JETT/8(4)1273)
- Gobi, K., & Vadivelu, V. M. (2015). Polyhydroxyalkanoate recovery and effect of in situ extracellular polymeric substances removal from aerobic granules. *Bioresource Technology*, 189, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.023>
- Guamán, L. P., Barba-Ostria, C., Zhang, F., Oliveira-Filho, E. R., Gomez, J. G. C., & Silva, L. F. (2018). Engineering xylose metabolism for production of polyhydroxybutyrate in the non-

- model bacterium *Burkholderia sacchari*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0924-9>
- Gutiérrez-pérez, J., Herrera, M., Pérez-garcía, R., & Izquierdo, J. (2010). *Uso de teoría de grafos para determinar zonas de vulnerabilidad en redes de abastecimiento de agua. Imm.*
- Gutt, B., Kehl, K., Ren, Q., & Boesel, L. F. (2016). Using ANOVA Models to Compare and Optimize Extraction Protocols of P3HBHV from *Cupriavidus necator*. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55(39), 10355–10365. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02694>
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha H16* using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-59>
- Huang, Long, Chen, Z., Wen, Q., & Lee, D. J. (2017). Enhanced polyhydroxyalkanoate production by mixed microbial culture with extended cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 241, 802–811. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.192>
- Huang, Luokun, Liu, C., Liu, Y., & Jia, X. (2016). The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source. *Waste Management*, 52, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.020>
- Impallomeni, G., Ballistreri, A., Carnemolla, G. M., Rizzo, M. G., Nicolò, M. S., & Guglielmino, S. P. P. (2018). Biosynthesis and structural characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* from long odd-chain fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.037>
- Iqbal, S., & Sheelani, J. (2017). Application of Modified K Means Clustering Algorithm in Segmentation of Medical Images of Brain Tumor. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 14(2), 735–739. <https://doi.org/10.13005/bbra/2502>
- Janarthanan, O. M., Yu, Y., Laycock, B., Werker, A., & Pratt, S. (2014). Fractionation of microbial populations in a PHA accumulating mixed culture and associated PHA content and composition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 53–58.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.055>

- Jena, J., Kumar, R., Dixit, A., Pandey, S., & Das, T. (2015). Evaluation of simultaneous nutrient and COD removal with polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation using mixed microbial consortia under anoxic condition and their bioinformatics analysis. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116230>
- Kachrimanidou, V., Ioannidou, S. M., Ladakis, D., Papapostolou, H., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Kookos, I. K. (2021). Techno-economic evaluation and life-cycle assessment of poly(3-hydroxybutyrate) production within a biorefinery concept using sunflower-based biodiesel industry by-products. *Bioresource Technology*, *326*(October 2020), 124711. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124711>
- Kaewbai-ngam, A., Incharoensakdi, A., & Monshupanee, T. (2016). Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemica* TISTR 8095. *Bioresource Technology*, *212*, 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.035>
- Kalia, V. C. (2019). Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*, 1–420. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8>
- Kataria, R., Woods, T., Casey, W., Cerrone, F., Davis, R., O'Connor, K., Ruhel, R., & Babu, R. (2018). Surfactant-mediated hydrothermal pretreatment of Ryegrass followed by enzymatic saccharification for polyhydroxyalkanoate production. *Industrial Crops and Products*, *111*(April 2017), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.029>
- Kim, E. J., & Kim, K. J. (2014). Crystal structure and biochemical characterization of PhaA from *Ralstonia eutropha*, a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *452*(1), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.074>
- Koller, M. (2020). *The handbook of polyhydroxyalkanoates. 1.*
- Kourmentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, C., Grandfils, C., De Freitas, V., & Reis, M. A. M. (2018). *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresource Technology*, *247*,

829–837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.138>

Kourmentza, Constantina, Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4(2), 1–43. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>

Kumar, P., Singh, M., Mehariya, S., Patel, S. K. S., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2014). Ecobiotechnological Approach for Exploiting the Abilities of Bacillus to Produce Copolymer of Polyhydroxyalkanoate. *Indian Journal of Microbiology*, 54(2), 151–157. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0457-9>

Kunasundari, B., Arza, C. R., Maurer, F. H. J., Murugaiyah, V., Kaur, G., & Sudesh, K. (2017). Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. *Separation and Purification Technology*, 172, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.07.043>

Kunasundari, B., Murugaiyah, V., Kaur, G., Maurer, F. H. J., & Sudesh, K. (2013). Revisiting the Single Cell Protein Application of *Cupriavidus necator* H16 and Recovering Bioplastic Granules Simultaneously. *PLoS ONE*, 8(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078528>

Lakshman, K., & Shamala, T. R. (2006). Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1471–1475. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.037>

Leong, Y. K., Lan, J. C. W., Loh, H. S., Ling, T. C., Ooi, C. W., & Show, P. L. (2017). Cloud-point extraction of green-polymers from *Cupriavidus necator* lysate using thermoseparating-based aqueous two-phase extraction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.007>

Leong, Y. K., Show, P. L., Lan, J. C. W., Loh, H. S., Yap, Y. J., & Ling, T. C. (2017). Extraction and purification of Polyhydroxyalkanoates (PHAs): application of Thermoseparating aqueous two-phase extraction. *Journal of Polymer Research*, 24(10), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1307-3>

Li, M., Eskridge, K., Liu, E., & Wilkins, M. (2019). Enhancement of polyhydroxybutyrate (PHB)

- production by 10-fold from alkaline pretreatment liquor with an oxidative enzyme-mediator-surfactant system under Plackett-Burman and central composite designs. *Bioresource Technology*, 281(February), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.045>
- Li, M., & Wilkins, M. (2020). Flow cytometry for quantitation of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using alkaline pretreated liquor from corn stover. *Bioresource Technology*, 295, 122254. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122254>
- Li, T., Elhadi, D., & Chen, G. Q. (2017). Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metabolic Engineering*, 43, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.07.007>
- López-Abelairas, M., García-Torreiro, M., Lú-Chau, T., Lema, J. M., & Steinbüchel, A. (2015). Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.018>
- Maheshwari, N., Kumar, M., Thakur, I. S., & Srivastava, S. (2018). Production, process optimization and molecular characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) by CO<sub>2</sub> sequestering *B. cereus* SS105. *Bioresource Technology*, 254, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.002>
- Marang, L., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2016). Combining the enrichment and accumulation step in non-axenic PHA production: Cultivation of *Plasticumulans acidivorans* at high volume exchange ratios. *Journal of Biotechnology*, 231, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.016>
- Matsumoto, K., Tanaka, Y., Watanabe, T., Motohashi, R., Ikeda, K., Tobitani, K., Yao, M., Tanaka, I., & Taguchi, S. (2013). Directed evolution and structural analysis of nadph-dependent acetoacetyl coenzyme A(acetoacetyl-CoA) reductase from *Ralstonia eutropha* reveals two mutations responsible for enhanced kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 6134–6139. <https://doi.org/10.1128/AEM.01768-13>
- Mendonça, T. T., Gomez, J. G. C., Buffoni, E., Sánchez Rodríguez, R. J., Schripsema, J., Lopes, M. S. G., & Silva, L. F. (2014). Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 815–829.

<https://doi.org/10.1111/jam.12406>

- Mohamad Fauzi, A. H., Chua, A. S. M., Yoon, L. W., Nittami, T., & Yeoh, H. K. (2019). Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol. *Process Safety and Environmental Protection*, *122*, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.12.002>
- Mohammadi, M., Hassan, M. A., Phang, L. Y., Shirai, Y., Man, H. C., & Ariffin, H. (2012). Intracellular polyhydroxyalkanoates recovery by cleaner halogen-free methods towards zero emission in the palm oil mill. *Journal of Cleaner Production*, *37*, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.07.038>
- Mohd Yatim, A. F., Syafiq, I. M., Huong, K. H., Abdullah Amirul, A. A., Mohd Effendy, A. W., & Bhubalan, K. (2017). Bioconversion of novel and renewable agro-industry by-products into a biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) by marine *Bacillus megaterium* UMTKB-1 strain. *Biotechnology*, *98*(2), 141–151. <https://doi.org/10.5114/bta.2017.68313>
- Moita, R., Freches, A., & Lemos, P. C. (2014). Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Research*, *58*, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.066>
- Montenegro, E. M. da S., Delabary, G. S., da Silva, M. A. C., Andreote, F. D., & Lima, A. O. de S. (2017). Molecular diagnostic for prospecting polyhydroxyalkanoate-producing bacteria. *Bioengineering*, *4*(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020052>
- Mozumder, M. S. I., De Wever, H., Volcke, E. I. P., & Garcia-Gonzalez, L. (2014). A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. *Process Biochemistry*, *49*(3), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004>
- Mozumder, M. S. I., Garcia-Gonzalez, L., De Wever, H., & Volcke, E. I. P. (2015). Effect of sodium accumulation on heterotrophic growth and polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, *191*, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.110>
- MREMH. (2018). Protocolo de cartagena, seguridad de la Biotecnología. *La Diversidad Biológica*, *1*, 1–18. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/05/Protocolo->

- Naciones Unidas. (1992). Convenio sobre Diversidad Biológica. *Secretariat of the Convention on Biological Diversity*, 1–34. <http://www.cbd.int/convention/convention.shtml>
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higueta, J. C., & Cardona, C. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, *133*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.129>
- Neves, A., & Müller, J. (2012). Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Progress*, *28*(6), 1575–1580. <https://doi.org/10.1002/btpr.1624>
- Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(13), 5883–5890. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5653-3>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, *36*(3), 856–870. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>
- Odeniyi, O. A., Adeola, O. J., Pan, W., Nomura, C. T., Nakas, J. P., Passanha, P., Esteves, S. R., Kedia, G., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2017). Estimation of inhibitory effects of hemicellulosic wood hydrolysate inhibitors on PHA production by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, *104*, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.050>
- Ojha, N., & Das, N. (2018). A Statistical approach to optimize the production of Polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using Response Surface Methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 2157–2170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.089>
- Oliveira-Filho, E. R., Gomez, J. G. C., Taciro, M. K., & Silva, L. F. (2021). *Burkholderia sacchari* (synonym *Paraburkholderia sacchari*): An industrial and versatile bacterial chassis for sustainable biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and other bioproducts. *Bioresource*

- Technology*, 337(April). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125472>
- ONU. (2017). Protocolo De Nagoya Sobre Acceso a Recursos Geneticos. *Onu*, 0–27. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/12/PROTOCOLO-DE-NAGOYA-SOBRE-ACCESO-A-RECURSOS-ENERGETICOS.pdf>
- Pakalapati, H., Chang, C. K., Show, P. L., Arumugasamy, S. K., & Lan, J. C. W. (2018). Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>
- Palmieri, S., Tittarelli, F., Sabbatini, S., Cespi, M., Bonacucina, G., Eusebi, A. L., Fatone, F., & Stipa, P. (2021). Effects of different pre-treatments on the properties of polyhydroxyalkanoates extracted from sidestreams of a municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 801, 149633. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149633>
- Passanha, P., Kedia, G., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., & Esteves, S. R. (2014). The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 163, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.068>
- Pérez-Rivero, C., López-Gómez, J. P., & Roy, I. (2019). A sustainable approach for the downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates: State-of-the-art and latest developments. *Biochemical Engineering Journal*, 150(February), 107283. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107283>
- Persidis, A. (2000). Data mining in biotechnology. *Nature Biotechnology*, 18(2), 237–238. <https://doi.org/10.1038/72722>
- Pittmann, T., & Steinmetz, H. (2016). Potential for polyhydroxyalkanoate production on German or European municipal waste water treatment plants. *Bioresource Technology*, 214, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.074>
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., & Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257–1262.

<https://doi.org/10.1038/nbt1244>

- RamKumar Pandian, S., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., & Gurunathan, S. (2010). Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technology*, *101*(2), 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.040>
- Ramos, A. F., Muñoz, M., Espinosa, A., Cabeza, I. O., & Moreno-Sarmiento, N. (2020). Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) solubility in non-halogenated solvents to achieve an environmentally friendly recovery process from *Burkholderia cepacia* B27 cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *95*(6), 1657–1665. <https://doi.org/10.1002/jctb.6357>
- Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., & Schönbach, C. (2019). Encyclopedia of Computational Biology Bioinformatics and. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *126*(September 2017), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., & Majone, M. (2011). Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00464-5>
- Riedel, S. L., Brigham, C. J., Budde, C. F., Bader, J., Rha, C., Stahl, U., & Sinskey, A. J. (2013). Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, *110*(2), 461–470. <https://doi.org/10.1002/bit.24713>
- Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Panti6n, A. A., & Alonso-Fari6nas, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*, *205*, 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- Rodr6guez Gamero, J. E., Favaro, L., Pizzocchero, V., Lomolino, G., Basaglia, M., & Casella, S. (2018). Nuclease expression in efficient polyhydroxyalkanoates-producing bacteria could

- yield cost reduction during downstream processing. *Bioresource Technology*, 261, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.021>
- Rogala, M. M., Gawor, J., Gromadka, R., Kowalczyk, M., & Grzesiak, J. (2020). Bioprospection by Popular Screening Methods. *Genes, MDPI*.
- Sabapathy, P. C., Devaraj, S., Parthipan, A., & Kathirvel, P. (2019). Polyhydroxyalkanoate production from statistically optimized media using rice mill effluent as sustainable substrate with an analysis on the biopolymer's degradation potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 977–986. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.003>
- Sakthiselvan, P., & Madhumathi, R. (2018). Kinetic evaluation on cell growth and biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus safensis* EBT1 from sugarcane bagasse. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 11(3), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2018.03.003>
- Samorì, C., Abbondanzi, F., Galletti, P., Giorgini, L., Mazzocchetti, L., Torri, C., & Tagliavini, E. (2015). Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery. *Bioresource Technology*, 189, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.062>
- Samorì, C., Basaglia, M., Casella, S., Favaro, L., Galletti, P., Giorgini, L., Marchi, D., Mazzocchetti, L., Torri, C., & Tagliavini, E. (2015). Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: Two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass. *Green Chemistry*, 17(2), 1047–1056. <https://doi.org/10.1039/c4gc01821d>
- Sangkharak, K., Paichid, N., Yunu, T., Klomklao, S., & Prasertsan, P. (2021). Utilisation of tuna condensate waste from the canning industry as a novel substrate for polyhydroxyalkanoate production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(5), 2053–2064. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00581-4>
- Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(3), 173–182. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.173>
- Sanhueza, G. (2015). *Downstream & Midstream : Desafios de un nuevo mercado Conferencia " A new thinking on Oil & Gas "*.

- Saranya, V., & Shenbagarathai, R. (2011). Production and characterization of pha from recombinant *E. coli* harbouring phaC1 gene of indigenous *Pseudomonas sp.* LDC-5 using molasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1109–1118. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300032>
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Krzyzanek, V., & Obruca, S. (2019). PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 49, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.005>
- Shi, Y., Yan, X., Li, Q., Wang, X., Liu, M., Xie, S., Chai, L., & Yuan, J. (2017). Directed bioconversion of Kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment. *Process Biochemistry*, 52, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.004>
- Silva, F., Campanari, S., Matteo, S., Valentino, F., Majone, M., & Villano, M. (2017). Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *New Biotechnology*, 37, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.013>
- Sindi, S. (2007). Handbook of Computational Molecular Biology. \* Edited by Srinivas Aluru. In *Briefings in Bioinformatics* (Vol. 8, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/bib/bbm002>
- Singh, M., Kumar, P., Patel, S. K. S., & Kalia, V. C. (2013). Production of Polyhydroxyalkanoate Co-polymer by *Bacillus thuringiensis*. *Indian Journal of Microbiology*, 53(1), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0294-7>
- Smolke, C. D. (2009). *The metabolic pathway engineering handbook* (Vol. 148).
- Solano, D. M., Roc, Z., Moreno, R. E. Z., Ria, D. M., Casta, D. M., Anc, F., Aristiz, Z. a R., Guti, B. a L., Bogot, S., & Trieste, L. I. (2007). DE GENES CELULOLÍTICOS Y SOLVENTOGÉNICOS EN CEPAS COLOMBIANAS DE *Clostridium sp.* ( CLOSTRIDIACEAE ) Oligonucleotide Probe Design for the Study of Cellulolytic and Solventogenic Genes in Colombian *Clostridium sp.* Strains ( Clostridiaceae ). *Alcohol*, 12, 55–74.
- Špoljarić, I. V., Lopar, M., Koller, M., Muhr, A., Salerno, A., Reiterer, A., & Horvat, P. (2013). In silico optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]

- synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.019>
- Takahashi, R. Y. U., Castilho, N. A. S., da Silva, M. A. C., Miotto, M. C., & Lima, A. O. de S. (2017). Prospecting for marine bacteria for polyhydroxyalkanoate production on low-cost substrates. *Bioengineering*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030060>
- Tanadchangsang, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2808–2818. <https://doi.org/10.1002/bit.24546>
- Tripathi, L., Wu, L. P., Dechuan, M., Chen, J., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2013). *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresource Technology*, 142, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.027>
- Tugarova, A. V., Dyatlova, Y. A., Kenzhegulov, O. A., & Kamnev, A. A. (2021). Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative in-situ FTIR spectroscopic analysis. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 252, 119458. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119458>
- Van Thuoc, D., My, D. N., Loan, T. T., & Sudesh, K. (2019). Utilization of waste fish oil and glycerol as carbon sources for polyhydroxyalkanoate production by *Salinivibrio* sp. M318. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 885–892. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.063>
- Vega-Castro, O., Contreras-Calderon, J., León, E., Segura, A., Arias, M., Pérez, L., & Sobral, P. J. A. (2016). Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 231, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018>
- Velázquez Álvarez, O. A., & Aguilar Gallegos, N. (2005). *Manual introductorio al análisis de redes sociales. Medidas de centralidad*. July, 45. <https://doi.org/10.13140/2.1.4053.7927>
- Venkateswar Reddy, M., Mawatari, Y., Onodera, R., Nakamura, Y., Yajima, Y., & Chang, Y. C. (2017). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from synthetic waste using *Pseudomonas*

- pseudoflava: PHA synthase enzyme activity analysis from *P. pseudoflava* and *P. palleronii*. *Bioresource Technology*, 234, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.008>
- Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., & Majone, M. (2010). Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochemistry*, 45(5), 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.008>
- Vrana Špoljarić, I., Lopar, M., Koller, M., Muhr, A., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, K., Angerer, H., Strohmeier, K., Schober, S., Mittelbach, M., & Horvat, P. (2013). Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator DSM 545* on substrates stemming from biodiesel production. *Bioresource Technology*, 133, 482–494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.126>
- Wang, X., Lin, L., Dong, J., Ling, J., Wang, W., Wang, H., Zhang, Z., & Yu, X. (2018). Simultaneous improvements of *Pseudomonas* cell growth and polyhydroxyalkanoate production from a lignin derivative for lignin-consolidated bioprocessing. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01469-18>
- Wen, Q., Chen, Z., Wang, C., & Ren, N. (2012). Bulking sludge for PHA production: Energy saving and comparative storage capacity with well-settled sludge. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 24(10), 1744–1752. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61005-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61005-X)
- Wen, Q., Ji, Y., Hao, Y., Huang, L., Chen, Z., & Sposob, M. (2018). Effect of sodium chloride on polyhydroxyalkanoate production from food waste fermentation leachate under different organic loading rate. *Bioresource Technology*, 267, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.036>
- Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*.
- Yang, Y. H., Jeon, J. M., Yi, D. H., Kim, J. H., Seo, H. M., Rha, C. K., Sinskey, A. J., & Brigham, C. J. (2015). Application of a non-halogenated solvent, methyl ethyl ketone (MEK) for recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from bacterial cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(2), 291–297. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0546-y>
- Zadissa, A., & Apweiler, R. (2022). *Data Mining, Quality and Management in the Life Sciences*.

- In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2449). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2095-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2095-3_1)
- Zakaria Gomaa, E. (2014). Brazilian archives of biology and technology: Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. *Arch. Biol. Technol.* V, 57157(1), 145–154. <http://www.scielo.br/pdf/babt/v57n1/20.pdf>
- Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., & Dennis, D. (1994). Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1198–1205. <https://doi.org/10.1128/aem.60.4.1198-1205.1994>
- Zihayat, B., Shakibaie, M., Sabouri-Shahrbabak, S., Doostmohammadi, M., Ameri, A., Adeli-Sardou, M., & Forootanfar, H. (2019). Medium optimization for polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Te using D-optimal design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18(September 2018), 101001. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.039>

## ANEXOS

### *Anexo 1*

<b>Especie</b>	<b>Grados obs</b>	<b>Grados esp</b>	<b>Xi Grados</b>
<i>Cupriavidus necator</i>	30	9.43	44.88
<i>Burkholderia sacchari</i>	14	9.43	2.22
<i>Bacillus megaterium</i>	6	9.43	1.25
<i>Bacillus cereus</i>	6	9.43	1.25

<i>Pseudomonas putida</i>	4	9.43	3.13
<i>Bacillus thuringiensis</i>	3	9.43	4.38
<i>Bacillus subtilis</i>	3	9.43	4.38
Sumatoria	66	66	61.49
Selección de la hipótesis con 12.59 tabulado para chi			Ha

## Anexo 2

Cuenta de Nombre cepa	Molécula derivada de PHA				Total
	PHA	PHB	P3HB	P(3HB-co-3HV)	
<i>C. necator</i>	4	8		4	16
<i>C. necator</i> ATCC 17699		1			1
<i>C. necator</i> DSM 545			1	3	4
<i>C. necator</i> DSM 7237				1	1
<i>C. necator</i> H16	2	1	2		5
<i>C. necator</i> MTCC 1472			1		1
<i>C. necator</i> TISTR 1095				1	1
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>30</b>

## Anexo 3: Primers diseñados para identificar los genes *phaA* de *C. necator* H16

Gen <i>phaA</i> <i>C. necator</i> H16			
Nombre	Primer	Tm °C	% GC
Fw <i>phaA</i> <i>C. necator</i> H16	5'-AGCGAAGTCATCATGGGCCA-3'	60	55
Rv <i>phaA</i> <i>C. necator</i> H16	5'-CACATTGACCTTGGAGGTGTCC-3'	60	55
>NC_008313 <i>Ralstonia eutropha</i> H16 cromosoma 1 - nucleotidos 1559350-1560225 (876) AGCGAAGTCATCATGGGCCAGGTGCTGACCGCCGGTTCGGGCCAGAACCCCGC ACGCCAGGCCGCGATCAAGGCCGGCCTGCCGGCGATGGTGCCGGCCATGACCA TCAACAAGGTGTGCGGCTCGGGCCTGAAGGCCGTGATGCTGGCCGCCAACGCG			

ATCATGGCGGGCGACGCCGAGATCGTGGTGGCCGGCGGCCAGGAAAACATGAG  
CGCCGCCCCGCACGTGCTGCCGGGCTCGCGCGATGGTTTCCGCATGGGCGATGC  
CAAGCTGGTCGACACCATGATCGTCGACGGCCTGTGGGACGTGTACAACAGT  
ACCACATGGGCATCACCGCCGAGAACGTGGCCAAGGAATACGGCATCACACGC  
GAGGCGCAGGATGAGTTCGCCGTCGGCTCGCAGAACAAGGCCGAAGCCGCGCA  
GAAGGCCGGCAAGTTTGACGAAGAGATCGTCCCGGTGCTGATCCCGCAGCGCA  
AGGGCGACCCGGTGGCCTTCAAGACCGACGAGTTCGTGCGCCAGGGCGCCACG  
CTGGACAGCATGTCCGGCCTCAAGCCCGCCTTCGACAAGGCCGGCACGGTGAC  
CGCGGCCAACGCCTCGGGCCTGAACGACGGCGCCGCCGCGGTGGTGGTGTATGT  
CGGCGGCCAAGGCCAAGGAACTGGGCCTGACCCCGCTGGCCACGATCAAGAGC  
TATGCCAACGCCGGTGTGATCCCAAGGTGATGGGCATGGGCCCGGTGCCGGC  
CTCCAAGCGCGCCCTGTGCGCGCCGAGTGGACCCCGCAAGACCTGGACCTGA  
TGGAGATCAACGAGGCCTTTGCCGCGCAGGGCGCTGGCGGTGCACCAGCAGATG  
GGCTGGGACACCTCCAAGGTCAATGTG

*Anexo 4: Primers diseñados para identificar los genes phaB de C. necator H16*

<b>Gen phaB C. necator H16</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Primer</b>	<b>Tm °C</b>	<b>% GC</b>
Fw phaB C. necator H16	5'-ACAACGCATTGCCCTGGTAAC-3'	60	52
Rv phaB C. necator H16	5'-CCGTTGATGGCAAATTCGCG-3'	60	52
<p>&gt;NC_008313 <i>Ralstonia eutropha</i> H16 chromosome 1 - nucleotides 2174310-2175029 (720 bp)</p> <p>ACAACGCATTGCCCTGGTAACGGGAGGCATGGGCGGCCTCGGCGAAGCGATTGCC  GTGCGGCTGCTGGCCGACGGCGCGCGCTCGTGGTACGCACTCCGTACACAATG  ACCACGTGGCCCAGTGGCTCGGCACGCAACGCTCCGCCGGCCGCGAATTCACGGC  GTTCCCGGTGACGTGACGGACTTCGCGTCCTGCCAGCGCTGCGTGTGCAAGTGC  GCAGCGAGCTCGGCGACGTGATATTCTGATCAACAATGCCGGGGTCACGCGCGA  CCGGACCCTGCGCAAGATGGATAAGGCTGACTGGGACTTCGTGCTGCGCACGGAC</p>			

CTCGACTCGCTCTTTCATATGACGCGGCCGCTGGTTGAGCCGATGTTGGCGCGCGG  
 TTGGGGCCGGATCGTCAATATTTCTTCGGTCAATGCCTCGCGGGGCGCCTTTGGCC  
 AGACCAACTATGCCGCCGCCAAGGCGGGGGTACATGGCTTCACCAAGGCGCTGGC  
 GCTGGAACTCGCACGCAAAGGCATCACCGTCAACACCGTTTCGCCGGGCTACCTG  
 GATACGCACATGGTGACGGACATGCCCGCCGAGATCCTCGAGCGGGACGTGTTGC  
 CGACTATCCCGGTTCGGCCGGCTAGGCAAGCCGGCCGAGGTCGCGGGCGCTGATCTC  
 TTACCTGTGCAGCGACGACGGGGCCTTCGTCACTGGCGCGAATTTTGCCATCAACG  
 G

*Anexo 5: Primers diseñados para identificar los genes phaC de C. necator H16*

<b>Gen phaC <i>C. necator</i> H16</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Primer</b>	<b>Tm °C</b>	<b>% GC</b>
Fw phaC <i>C. necator</i> H16	5'-TCGAGAACGAGTACTTCCAGCT-3'	60	50
Rv phaC <i>C. necator</i> H16	5'-TGCCTTGGCTTTGACGTATCG-3'	60	52

>NC\_008313 *Ralstonia eutropha* H16 chromosome 1 - nucleotides 1558004-1559118 (1115)

TCGAGAACGAGTACTTCCAGCTGTTGCAGTACAAGCCGCTGACCGACAAGGTGCA  
 CGCGCGCCCGCTGCTGATGGTGCCGCCGTGCATCAACAAGTACTACATCCTGGAC  
 CTGCAGCCGGAGAGCTCGCTGGTGCGCCATGTGGTGGAGCAGGGACATACGGTGT  
 TTCTGGTGTTCGTGGCGCAATCCGGACGCCAGCATGGCCGGCAGCACCTGGGACGA  
 CTACATCGAGCACGCGGCCATCCGCGCCATCGAAGTCGCGCGCGACATCAGCGGC  
 CAGGACAAGATCAACGTGCTCGGCTTCTGCGTGGGCGGCACCATTGTCTCGACCG  
 CGCTGGCGGTGCTGGCCGCGCGCGGCGAGCACCCGGCCGCCAGCGTCACGCTGCT  
 GACCACGCTGCTGGACTTTGCCGACACGGGCATCCTCGACGTCTTTGTGACGAG  
 GGCCATGTGCAGTTGCGCGAGGCCACGCTGGGCGGGCGGCCGGCGCGCCGTGCG  
 CGCTGCTGCGCGGCCTTGAGCTGGCCAATACCTTCTCGTTCTTGCGCCCGAACGAC  
 CTGGTGTGGAACTACGTGGTCGACAACTACCTGAAGGGCAACACGCCGGTGCCTG  
 TCGACCTGCTGTTCTGGAACGGCGACGCCACCAACCTGCCGGGGCCGTGGTACTG  
 CTGGTACCTGCGCCACACCTACCTGCAGAACGAGCTCAAGGTACCGGGCAAGCTG

ACCGTGTGCGGGCGTGCCGGTGGACCTGGCCAGCATCGACGTGCCGACCTATATCT  
ACGGCTCGCGCGAAGACCATATCGTGCCGTGGACCGCGGCCTATGCCTCGACCGC  
GCTGCTGGCGAACAAGCTGCGCTTCGTGCTGGGTGCGTCGGGCCATATCGCCGGT  
GTGATCAACCCGCCGGCCAAGAACAAGCGCAGCCACTGGACTAACGATGCGCTGC  
CGGAGTCGCCGCAGCAATGGCTGGCCGGCGCCATCGAGCATCACGGCAGCTGGTG  
GCCGGACTGGACCGCATGGCTGGCCGGGCAGGCCGGCGCGAAACGCGCCGCGCC  
CGCCA ACTATGGCAATGCGCGCTATCGCGCAATCGAACCCGCGCCTGGGCGATAC  
GTCAAAGCCAAGGCA