

SÍNTESIS DE BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE MICROORGANISMOS

BIOPLASTICS SYNTHESIS FROM MICROORGANISMS

Martha Lucía Malagón Micán*
Sonia Marcela López López**
Ángela Tatiana Martínez Hernández***

Recibido: 15 de agosto de 2017

Aceptado: 4 de octubre de 2017

Resumen

El artículo analiza el panorama general de la producción de bioplásticos, así como las propiedades de los polihidroxialcanoatos (PHA) y las condiciones para su producción: temperatura, pH, tiempo, agitación, sustrato, medios de cultivo y microorganismo. La investigación plantea que la producción de bioplásticos derivados de microorganismos es una alternativa ante la problemática ambiental generada por el uso de plásticos producidos por la industria petroquímica. Este estudio describe la síntesis del biopolímero según dos tipos de bacterias: las que necesitan de la limitación de algún nutriente esencial para la producción de metabolitos secundarios y las que no requieren limitación de nutrientes porque producen el biopolímero durante la fase de crecimiento. El estudio concluye que es necesario evaluar otros tipos de microorganismos para obtener un mejor rendimiento y una mayor producción de bioplástico.

Palabras clave: bioplásticos, recursos renovables, sostenibilidad, rendimiento, microorganismos.

Abstract

The article analyzes the general panorama of the production of bioplastics, as well as the properties of the polyhydroxyalkanoates (PHA) and the conditions for their production: temperature, pH, time, agitation, substrate, culture media and microorganism. The research proposes that the production of bioplastics derived from microorganisms is an alternative to the environmental problems generated by the use of plastics produced by the petrochemical industry. This study describes the synthesis of the biopolymer according to the types of bacteria: those that have the limitation of an essential nutrient for the production of secondary metabolites and those that do not require limitation of nutrients because they produce the biopolymer during the growth phase. The study concludes that it is necessary to evaluate other types of microorganisms to obtain a better yield and a higher production of bioplastic.

Keywords: bioplastics, renewable resources, sustainability, performance, microorganisms.

* Ingeniera química, magíster en Ingeniería Química y magíster en Docencia. Grupo de Investigación BIOTECFUA, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. martha.malagon@investigadores.uamerica.edu.co

** Estudiante coinvestigador de Ingeniería Química. Grupo de Investigación BIOTECFUA, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. soniamar96@gmail.com

*** Estudiante coinvestigador de Ingeniería Química. Grupo de Investigación BIOTECFUA, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. angela.martinez4@estudiantes.uamerica.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las industrias buscan alternativas ecoamigables que transformen sus procesos, no solo en términos de eficiencia, sostenibilidad y rendimiento, sino que además disminuyan la producción de desechos industriales, la huella de carbono y el uso de reactivos contaminantes. Una de estas alternativas es la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) para reemplazar los plásticos derivados del petróleo. Los PHA son poliésteres sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos (arqueas, bacterias o microalgas) como reserva de carbono y energía. Estos poliésteres tienen carácter biodegradable y se originan a partir de fuentes de carbono renovables.

El plástico biodegradable (PHA) más común es el polihidroxibutirato (PHB). El PHB fue el primer poliéster descrito de esta familia de compuestos; se caracterizó en los años veinte, aunque se desarrolló una década después. En 1982 la compañía inglesa Imperial Chemical Industries Ltd. inició el desarrollo de un poliéster termoplástico completamente biodegradable; usó *Wautersia eutropha* mediante un proceso de fermentación, en el que se emplearon tanques agitados con medio líquido para favorecer el crecimiento de la especie. El producto se llamó comercialmente Biopol; sus características físicas eran superiores al PHB, pues era más flexible y resistente. Posteriormente, Metabolix inició la producción de diversos PHA de bacterias y plantas transgénicas, al igual que la empresa japonesa Kaneka Corporation, que desarrolló estos plásticos con el nombre de Nodax (Segura, Noguez y Espín, 2007).

La Universidad Nacional de Colombia ha realizado varias investigaciones sobre la producción de PHA: i) producción del biopolímero utilizando tres especies de *Pseudomonas* (1997); ii) evaluación experimental de diferentes métodos de recuperación de PHA sintetizados por *Pseudomonas* (2001); iii) estrategia de fermentación por lote alimentado con *Ralstonia eutropha* H16, con el fin de aumentar la productividad del polímero (2002); iv) estudio de bioprospección en diversas regiones del país,¹ en el que se aislaron microorganismos de suelos colombianos para evaluar su potencial como sintetizadores de biopolímero y se realizó un cepario de especies productoras de PHA (2002); v) evaluación de un sistema de polímeros de fermentación por lote alimentado, buscando alternativas para escalar el proceso a nivel industrial e identificar cepas que produzcan una cantidad considerable de bioplástico según trabajos anteriores (2005). Actualmente, se están realizando investigaciones para la producción de PHA con sustratos de menor costo que permitan realizar un proceso biotecnológico económicamente eficiente a gran escala (Becerra, 2013). Este es el caso de la producción de PHA a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca, mediante un proceso de hidrólisis enzimática para la obtención de glucosa, de la que se obtiene una cantidad considerable de 0.62 g/L del biopolímero (PHA) (Rojas et ál. 2016).

Este artículo explica algunos rasgos de los polímeros alternativos fabricados a partir de microorganismos: ruta de síntesis, características e importancia de los nutrientes limitantes en el crecimiento de una cepa productora de plástico PHA, con el objetivo de evaluar esta alternativa para la disminución de residuos plásticos derivados de hidrocarburos y el aprovechamiento de residuos biológicos utilizados como sustratos. Igualmente, compara la cantidad de polímero sintetizado a partir de diversos microorganismos y sus condiciones de producción (a escala laboratorio) utilizando especies como *Bacillus subtilis* y *Ralstonia eutropha*.

¹ "Aislamiento y caracterización de microorganismos con alta capacidad de almacenamiento de poliésteres tipo polihidroxialcanoatos (PHA)"; proyecto financiado por Colciencias.

RESULTADOS

Propiedades de los polihidroxicanoatos (PHA)

Los plásticos PHA han sido reconocidos y estudiados por sus propiedades físicas y su alta biodegradabilidad; debido a estas cualidades, su desarrollo en el área de biotecnología ha sido amplio, lo que ha promovido la inversión de recursos para el desarrollo de estos materiales.

En la tabla 1 se describen las propiedades y características del biopolímero: temperatura de transición vítrea (Tg), temperatura de cristalización (Tm), cristalinidad y elongación.

Tabla 1. Cuadro comparativo de propiedades poliméricas características de PHA de cadenas laterales cortas (SCL) y de cadenas largas (MCL) versus las propiedades del polipropileno

Propiedades	PHA SCL	PHA MCL	PP
Tm (°C)	61	177	176
Tg (°C)	-36	2	-10
Cristalinidad (%)	30	70	60
Elongación (%)	300	5	400

Fuente: Castillo (2008).

Debido a su estructura, los PHA de cadena lateral corta o SCL (*short chain length*), catalogados como termoplásticos, tienen una cadena R de 1-2 átomos de carbono. Por su parte, los PHA de cadena lateral media o MCL (*medium chain length*), calificados como elastómeros, tienen una cadena R de 3-13 átomos de carbono; también se caracterizan por tener una cristalinidad menor, así como puntos de fusión menores (Poirier, Erard y MacDonald-Comber, 2002).

De acuerdo a la tabla 1, las propiedades del bioplástico PHA de cadena lateral media son semejantes a las del polímero comercial polipropileno, por lo que puede competir con los polímeros hechos a base de petróleo. Por otra parte, los polímeros PHA tienen una propiedad característica: la biodegradabilidad, es decir, son sintetizados biológicamente por bacterias y pueden llegar a ser eliminados de la biósfera sin afectar el medio ambiente (Maheshwari, Rani, Parihar y Sharma, 2013).

El factor tiempo en el periodo de degradación del plástico es una de las características que confirman la situación expuesta. Por ejemplo, el polipropileno (que es una forma muy refinada del petróleo) se descompone completamente en aproximadamente 500 años (Vidal y Jara, 2008), culminado este tiempo aún pueden existir “microplásticos”, partículas tan reducidas que a simple vista no se pueden ver, pero que se acumulan y alteran la vida en el ecosistema; por el contrario, un bioplástico se descompone en cuestión de semanas (con un tratamiento menos agresivo) y como material orgánico será de patrón reconocido para el ecosistema en el que se encuentre (Acosta, 2014).

En la figura 1 se muestra la estructura general del PHA.

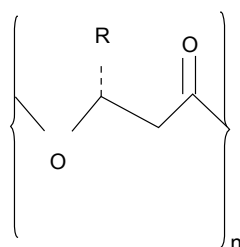


Figura 1. Fórmula general para los polihidroxicanoatos (PHA).

A continuación, las figuras 2 y 3 sintetizan el método general de producción de un biopolímero como el PHA.

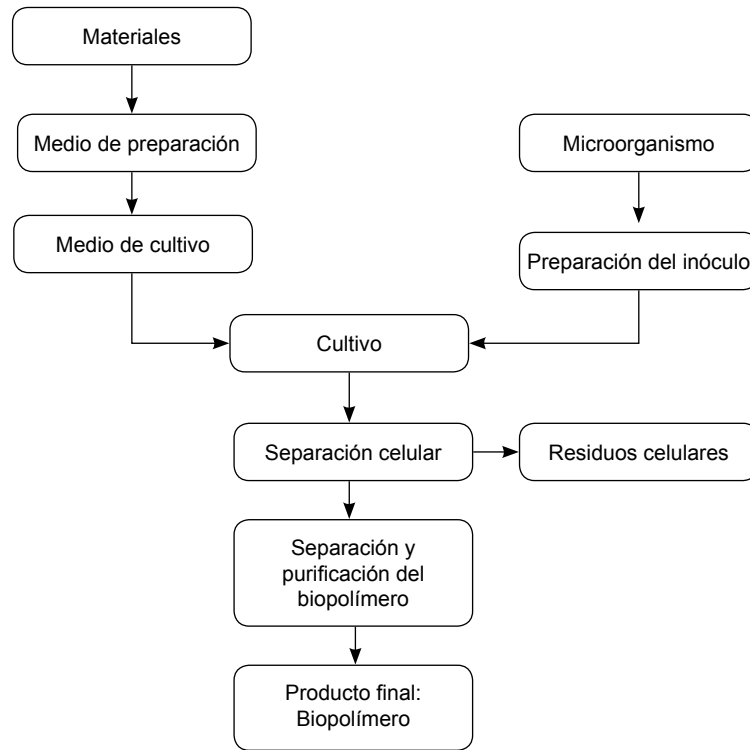


Figura 2. Diagrama esquemático de la producción de biopolímeros y su proceso de purificación.

Fuente: adaptado de Kreyenschulte, Krull y Margaritis (2014).

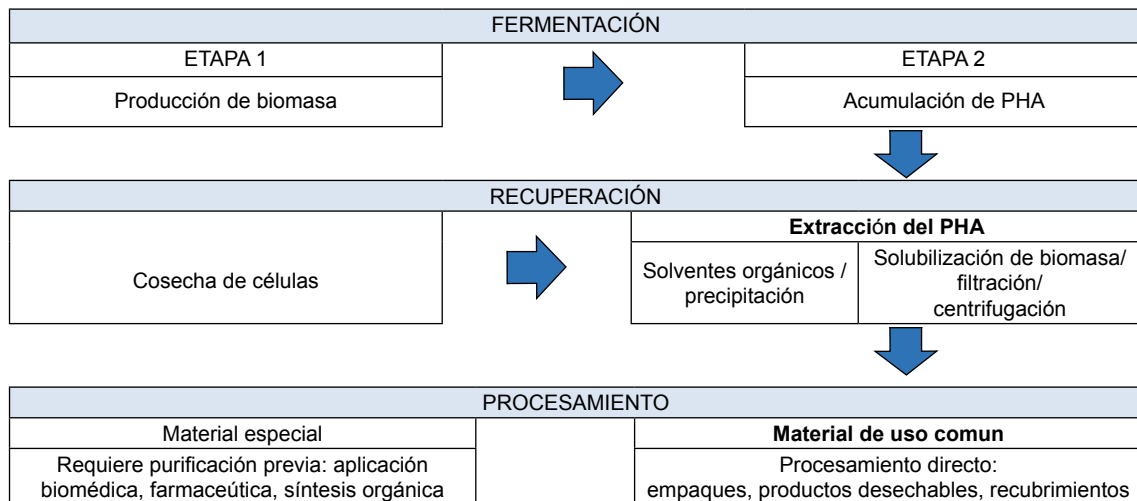


Figura 3. Esquema general en la producción de PHA. El esquema indica las características principales (según lo que el usuario quiera disponer para su transformación y aplicación final): fermentación, recuperación y procesamiento del polímero.

Fuente: González et ál. (2012).

R. eutropha produce moléculas de acetil-CoA a partir del metabolismo de carbohidratos. Estas moléculas (vía malonil-CoA) son incorporadas a la biosíntesis de nuevos ácidos grasos, proceso que genera el 3-hidroxiacil, que es transportado de la ACP (*acyl carrier protein*) para la coenzima A (Coa) y ahí es polimerizado por la acción de la PHA sintasa (Rehm y Steinbüchel, 1999).

Según las condiciones de cultivo adecuadas para la síntesis del biopolímero, las bacterias utilizadas para la producción de PHA se clasifican en dos grupos. El primer grupo lo conforman las bacterias que requieren la limitación de algún nutriente esencial (González, et ál., 2012), como *R. eutropha*, *Protomonas extorquens* o *Pseudomonas* sp.; esta restricción ocasiona que el microorganismo frene su reproducción (que es una fase de considerable gasto energético) y produzca un metabolito secundario (PHA).

En el segundo grupo están las bacterias que no requieren limitación de nutrientes, pues acumulan el polímero durante la fase de crecimiento (metabolito primario); algunos microorganismos que pertenecen a este grupo son *A. vinelandii*, *Alcaligenes latus* y *Eschenchia coli recombinante* (López, 2013).

Los metabolitos secundarios se producen por rutas anabólicas (Maldonado, 2010) y no son esenciales para el crecimiento del cultivo de producción; no obstante, cumplen un papel importante en la supervivencia de diversas especies, pues el almacenamiento de estos metabolitos en cuerpos de inclusión se utiliza como fuente de carbono o energía para microorganismos durante periodo de ayuno (posteriormente recupera el carbono) (Arcos, 2007).

Para la producción de biopolímero PHA, algunos microorganismos como *Ralstonia eutropha* y la familia bacteriana *Pseudomonas* generan la enzima PHA sintasa cuando hay ausencia de elementos nutricionales como N, P, S, O o Mg. Cuando crecen en medios ricos, los microorganismos no producen metabolitos secundarios o su producción es muy reducida. La información genética necesaria para producir estos metabolitos se expresa al máximo nivel cuando el crecimiento se halla restringido (Parés, Farrás y Juárez 2015).

Varias investigaciones en el tema han realizado estudios utilizando diversas bacterias, como las mencionadas, teniendo en cuenta la capacidad de síntesis de PHA (principalmente de cadena corta). Estas bacterias sintetizan metabolitos secundarios mediante la limitación de un nutriente especial, como nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno. En cuanto a los sustratos para el crecimiento bacteriano, se requieren que estos tengan altas concentraciones de fuentes de carbono; dicha fuente actúa como materia prima para la síntesis del PHA, como, por ejemplo, la sacarosa, que se puede encontrar en la melaza de caña y que es muy usada por su economía y abundancia en los sectores azucareros (Porrás, Cubitto, y Villar, 2012).

Condiciones de proceso para la obtención de PHA

Las condiciones del proceso para la síntesis de PHA a partir de *Bacillus subtilis* y *Ralstonia Eutropha*, tratadas por Sanabria y Sarmiento (2017) y Rojas, Hoyos y Mosquera (2016), se analizan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de proceso para producción de PHA a partir de *Bacillus subtilis* y *Ralstonia eutropha*

PRODUCCIÓN DE PHA		
PROCESOS	A partir de <i>Bacillus subtilis</i>	A partir de <i>Ralstonia eutropha</i>
	Almidón de papa	Harina de yuca
Acondicionamiento del sustrato	Recolección, secado, molienda, tamizado, autoclavado y purificación. Preparación de solución de almidón de papa 0.5 % m/v	Hidrólisis enzimática para la obtención de glucosa a partir de la harina de yuca con enzimas: BAN 480I con actividad de alfa-amilasa y DEXTROZIME GA del tipo Glucoamilasa (glucano 1.4 alfa-glucosidasa)
Activación de cepa microbiana	Utilización de solución de agar nutritivo	Activación en medio tripticasa soya (triptona 17 g/L, soytona o peptona de soya 3 g/L, glucosa 2.5 g/L, cloruro de sodio 5.0 g/L, fosfato dipotásico de hidrógeno 2.5 g/L)
Incubación	Temperatura 36 °C, pH 7, medio aerobio, para escoger las colonias más puras y realizar la fermentación	Temperatura de 32 °C por 48 horas
Fermentación	Preparación de algunas muestras con nutrientes (evaluar si el microorganismo hidroliza el almidón o no, y si para el crecimiento microbiano y producción de PHA, la cepa necesita o no de nutrientes). Condiciones: concentración de sustrato de 15g/L, 72 horas a 15.75 rad/s y pH 7 con muestreos cada 24 horas para analizar el comportamiento de la concentración de azúcares reductores hasta completar 72 horas.	La fermentación se llevó a cabo durante 36 horas, en un medio mínimo de sales a 30 °C y agitación de 150 rpm utilizando como inóculo la bacteria cultivada en medio enriquecido tripticasa soya (TSB) al 10 %.
Extracción de PHA	Implementación de tratamiento con NaCl, NaOH y etanol, con centrifugación a velocidades de 350 y 6000 rpm.	Centrifugación en medio fermentado a 4500 rpm durante 15 min, para posterior extracción empleando 5mL de ácido sulfúrico 0.1 M en ebullición durante 1 hora
Cantidad de biopolímero extraído	Pellet extraído de 0.62 % al finalizar el proceso extractivo en el fermento de 15g/L sin la adición de nutrientes al sustrato.	Con una relación de C/N = 20, la producción de biopolímero de 0,62 g/L.

Fuente: Sanabria y Sarmiento (2017) y Rojas, Hoyos y Mosquera (2016).

Tratada la diversidad de microorganismos que pueden producir PHA, en la tabla 3 se relaciona la cantidad de PHA producido con el tiempo de fermentación y el sustrato utilizado.

Tabla 3. Adaptación, bacterias con los más altos rendimientos de PHA

Microorganismo	Sustrato	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	PHA (g/L)	(%)
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarosa	Info. no disponible	112	98.5	88
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Sacarosa	47	40	31.9	79.8
<i>Bacillus</i> spp.	Decanoato	24	Info. no disponible	0.4	80
<i>Cupeiavidus necator</i>	Residuos líquidos de alimentos	Info. no disponible	Info. no disponible	Info. no disponible	87
<i>Cupriavidus necátor h16</i>	Aceite de plantas	Info. no disponible	44	6.8	80
<i>Enterobacter cloacae SU-1</i>	Lactosa	Info. no disponible	Info. no disponible	Info. no disponible	94
<i>Pseudomonas putida KTOY06</i>	Dodecanoato gluconato	48	5.3	Info. no disponible	84.3
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glucosa	74	281	230.4	82
<i>Rhodobacter shaeroides</i>	Acético	Info. no disponible	Info. no disponible	Info. no disponible	95
<i>Wautersia eutropha</i>	Aceite de canola	Info. no disponible	Info. no disponible	18.2	90

Fuente: González et ál. (2012).

CONCLUSIONES

Para hacer competitiva la producción de los biopolímeros desde el punto de vista ambiental, tecnológico y económico, se deben aprovechar residuos agroindustriales como almidón de tubérculos (por ejemplo, papa y yuca) en la producción de PHA, de manera que se reutilicen estas corrientes que a nivel industrial no tienen mucho valor, pero que sí tienen una aplicación importante en nuevos bioprocesos, en la medida en que actúan como sustratos para cepas que sintetizan sustancias capaces de reemplazar materiales cuya descomposición es ambientalmente negativa. En la tabla 3 se observa los procedimientos realizados y las condiciones para la extracción de bioplástico a partir del microorganismo *Ralstonia Eutropha* y *Bacillus Subtilis* utilizando harina de yuca y almidón de papa como sustrato, respectivamente. Los datos muestran una producción de PHA de 0.62 g/L y pellet extraído de 0.62 %, en el mismo orden, lo que representa la mayor producción para el microorganismo *Ralstonia Eutropha*, con una relación C/N = 20 y condiciones de acondicionamiento-fermentación diferentes a *Bacillus Subtilis*.

El estudio de esta rama de los bioprocesos y la microbiología ha sido prácticamente nuevo (hace treinta años aproximadamente), por lo que la información proporcionada para producción a gran escala e industrialización del biomaterial es muy escasa o solo corresponde a ciertos grupos de investigación en países desarrollados con fuentes financieras y con apoyo del gobierno (que es quien autoriza estos estudios). Estos estudios son aún reservados, lo que genera un alto valor agregado en el producto final.

Desde el punto de vista económico, aunque los polímeros derivados del petróleo son económicos, actualmente se evalúa la diversidad de sustratos con el fin de reducir los costos de producción de PHA a partir de microorganismos, como una alternativa de producción de bioplásticos frente a la disminución de las reservas de petróleo.

El microorganismo con mayor producción de PHA es *Ralstonia eutropha*, el cual sintetiza el poliéster cuando el nitrógeno de su fuente nutricional se ve limitado; no obstante, es necesario evaluar otro tipo de microorganismos y otros estudios con el fin de obtener el mejor rendimiento y la mayor producción de bioplástico.

REFERENCIAS

- Acosta, I. (2014). *Caracterización de microplásticos primarios en el ambiente marino de una playa urbana en Cartagena de Indias* (tesis de maestría). Maestría en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.
- Arcos, M. (2007). *Degradación de Aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante un biorreactor discontinuo* (tesis de maestría). Maestría en Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Becerra, M. (2013). *Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiésel* (tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Castillo, D. (2008). *Efecto del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por Pseudomonas putida* (trabajo de grado). Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, San Pablo, Brasil.
- Gandini, A., y Belgacem, M. (2013). The state of the art of polymers from renewable resources. En S. Ebnesajjad (ed.), *Handbook of biopolymers and biodegradable plastics science direct* (pp. 71-86). EE. UU.: Elsevier.
- González, Y., Contreras, J., González, O., y Córdova, J. (2013). Revisión: síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.
- Kreyenschulte, D., Krull, R., y Margaritis, A. (2012). Recent Advances in Microbial Biopolymer Production and Purification. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(1), 1-15. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2012.743501>
- López, J. (2013). *Biopolímeros de interés industrial, síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB)* (tesis de doctorado). Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Maheshwari, R., Rani, B., Parihar, S., y Sharma, A. (2013). Eco-friendly bioplastic for uncontaminated environment. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 1(1), 45.
- Maldonado, D. (2010). *Determinación de metabolitos secundarios a partir de la cepa nativa cv15nd aislada del páramo cruz verde, departamento de Cundinamarca* (trabajo de grado). Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Parés I., Farrás, R., y Juárez, A. (2015). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona: Reverté.
- Poirier, Y., Erard, E., y MacDonald-Comber, S. (2002). Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 207(1), 97-102. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097\(01\)00567-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1097(01)00567-5)
- Porrás, M., Cubito, M., y Villar, M. (2012). Producción de Poli(beta-hidroxibutirato) utilizando glicerol y melaza de caña de azúcar como sustrato. [s. d.]: [s. e.]

- Rehm, B., y Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International journal of biological macromolecules*, 25(1-3), 3-19.
- Rojas, E., Hoyos, J. y Mosquera, S. (2016). Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia Eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 14(1), 19-26.
- Sanabria, C., y Sarmiento, D. (2017). *Evaluación de la obtención de polihidroxialcanoatos (PHAs) partiendo del residuo de almidón de papa por medio de Bacillus Subtilis a nivel laboratorio* (tesis de grado). Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingenieras Fundación Universidad de América, Bogotá Colombia.
- Segura, D., Noguez, R., y Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14, 363.
- Vidal, C., y Jara, I. (2008). *Degradación del plástico [blog sobre medio ambiente y ecología]*. Recuperado de <http://www.ecoclimatico.com/archives/degradacion-del-plastico-137>.

