

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUCIDOS POR LA BACTERIA *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS*

Ruiz Gutiérrez Javier David (1), Mendoza Novelo Birzabith (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería Química Sustentable, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ruizgj2011@licifug.ugto.mx]

2 [Departamento de Ingeniería Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [bmnovelo@fisica.ugto.mx]

Resumen

Los polímeros biodegradables son materiales que en la actualidad se utilizan en diversas áreas, por lo que variados grupos de investigación han propuesto nuevas rutas de síntesis a partir de fuentes renovables de energía, a la vez que se emplean procesos amigables con el ambiente. Los polihidroxicanoatos (PHA) son un tipo especial de biopoliésteres sintetizados por ciertos microorganismos que utilizan al polímero como fuente de carbono y almacenamiento de energía.¹ La bacteria *Methylobacterium extorquens* es capaz de producir productos de interés biotecnológico, entre los que se encuentra un tipo especial de polímero llamado polihidroxibutirato (PHB)²⁻³. El polímero fue producido por la fermentación de *M. extorquens* en presencia de metanol y de una mezcla metanol-polietilenglicol (PEG-400) como fuentes de carbono y posteriormente caracterizado por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN de ¹H y de ¹³C respectivamente) con un equipo Bruker Avance III™ HD 500 MHz y por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Al final se observó la producción de PHB con ambas fuentes de carbono sin la presencia de PEG en la cadena del polímero obtenido.

Abstract

Biodegradable polymers are materials currently used in various areas, so many research groups have proposed new synthesis routes from renewable energy sources, while friendly processes are employed with the environment. The polyhydroxyalkanoates (PHA) are a special type of biopolyesters synthesized by certain microorganisms using the polymer as a carbon source and storage. *Methylobacterium extorquens* energy.¹ The bacterium is capable of producing products of biotechnological interest, among which is a special type polymer called polyhydroxybutyrate (PHB) 2-3. The polymer was produced by the fermentation of *M. extorquens* in the presence of methanol and a methanol-polyethylene glycol (PEG-400) as carbon sources mix and characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton and carbon (¹H and ¹³C respectively) with a Bruker Avance III™ HD equipment 500MHz infrared spectroscopy and Fourier transform (FTIR). At the end PHB production was observed with both carbon sources without the presence of PEG in the chain of the polymer obtained.

Palabras Clave

Methylobacterium extorquens, polihidroxibutirato, extracción con cloroformo, copolimerización, resonancia magnética nuclear.

INTRODUCCIÓN

Los polímeros biodegradables son materiales que en la actualidad se utilizan en diversas áreas, por lo que diversos grupos de investigación han propuesto nuevas rutas de síntesis a partir de fuentes renovables de energía, a la vez que se emplean procesos amigables con el ambiente. Actualmente se conocen una gran multitud de estos procesos, por los cuales es posible obtener materiales sustentables. Entre éstos se encuentra la modificación de sustancias orgánicas como el colágeno, empleado para producir geles y variados andamios para su uso en ingeniería tisular y medicina regenerativa. Por otra parte, están los procesos que emplean fuentes renovables de carbono como el metanol, empleado para la síntesis de ciertos polímeros a partir de la fermentación de bacterias capaces de metabolizar estos compuestos.

Las bacterias son organismos unicelulares capaces de metabolizar compuestos orgánicos generando con ellos incrustaciones citoplasmáticas las cuales emplean como reserva de energía cuando se encuentran en condiciones de crecimiento desbalanceadas [1]. Los estudios sobre la síntesis microbiana de polímeros ha permitido encontrar una gran variedad de bacterias capaces de almacenar estos materiales, cada una sometida a condiciones de crecimiento específicas [2]. Una familia de poliésteres que han sido estudiados desde la década de 1950 son los polihidroxialcanoatos. Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros bacterianos producidos de forma natural por una amplia variedad de microorganismos, los cuales lo almacenan intracelularmente y lo utilizan como fuente de energía cuando presentan un déficit de nutrientes [3]. La bacteria *Methylobacterium extorquens* es capaz de producir productos de interés biotecnológico, entre los que se encuentra un tipo especial de polímero llamado polihidroxibutirato (PHB) [4]. La obtención de esta clase de polímeros por vía fermentativa proporciona una alternativa a los métodos de síntesis convencionales que involucran subproductos de desecho perjudiciales al medio ambiente, además de que al tratarse de un producto generado por el metabolismo de un microorganismo destinado a la reserva nutricional de éste, es posible biodegradar por completo los

artículos y utensilios fabricados a partir de estos a través de vías bacterianas generando como productos de desecho CO₂ y agua. Por otra parte, al ser el PHB un material con poca resistencia termomecánica, las investigaciones sobre estos compuestos se han centrado no sólo en las vías de obtención, sino también en la búsqueda de metodologías para la modificación química de éstos últimos para la mejora de tanto de sus propiedades físicas como químicas. Para esto se han ideado métodos de copolimeración siguiendo la misma ruta fermentativa pero con la adición de diversos sustratos que permitan tanto el crecimiento celular del microorganismo como la incorporación de éste a la estructura del polímero.

En este trabajo se reporta la preparación de PHB y sus copolímeros con poliéteres con la intención de generar materiales con propiedades mejoradas. El objetivo de esta investigación consistió en caracterizar los polímeros producidos por la bacteria *M. extorquens* empleando como fuentes de carbono metanol (MeOH) y una mezcla de MeOH-Polietilenglicol (PEG-400) además de comparar la viabilidad de celular de la bacteria en ambos medios de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

La producción del PHB se llevó a cabo por vía metabólica de la bacteria *M. extorquens* ATCC BAA-500. El cultivo de la bacteria se realizó en un medio mineral salino modificado de Zahra B. Mokhtari-Hosseini et al. [4] a base de metanol como fuente principal de carbono con la siguiente composición: 0.645 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.68 g/L KH₂PO₄, 6.14 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 20 mg/L FeSO₄·7H₂O, 20 mg/L CaCl₂·2H₂O, 5 mg/L MnSO₄·7H₂O, 1.5 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.04 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.04 mg/L CuSO₄·5H₂O, 0.6 mg/L CoCl₂·6H₂O y 0.72% de metanol, a un pH de 7.7. El medio de crecimiento utilizado para la copolimeración fue el siguiente: 0.645 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.68 g/L KH₂PO₄, 6.14 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 20 mg/L FeSO₄·7H₂O, 20 mg/L CaCl₂·2H₂O, 5 mg/L MnSO₄·7H₂O, 1.5 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.04 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.04 mg/L CuSO₄·5H₂O, 0.6 mg/L CoCl₂·6H₂O, 0.72% de metanol y 2% de PEG-400, a un pH de 7.7.

Las condiciones de crecimiento se estandarizaron a 30°C a un pH de 7.7 por siete días en condiciones estériles. El cultivo de la bacteria se conformó de dos etapas. En la primera etapa se preparó un reactor semilla para el cual se empleó un matraz de 125 mL operando a 100 mL de su volumen total. El reactor semilla se mantuvo a las condiciones de cultivo por siete días. En la segunda etapa se inoculó un matraz de 500 mL operando a 300 mL con el 5% del preinóculo en fase líquida con la misma composición del reactor semilla. Para el cultivo de *M. extorquens* en presencia de PEG-400 se cultivó un reactor semilla tal como se realizó en la primera etapa descrita anteriormente, seguida de una etapa de inoculación de un matraz de 500 mL operando a un volumen de 300 mL con la composición descrita anteriormente con el 2% de PEG-400 inoculado con 5% del reactor semilla. Para determinar la proliferación celular de la bacteria en ambos medios de cultivo se realizaron ensayos de turbidimetría a 600 nm y de MTT a una longitud de onda de 540 nm durante el tiempo de crecimiento de la bacteria en intervalos de 24 horas en un espectrofotómetro de UV-Vis Multiskan Go. Las bacterias se recuperaron del biorreactor centrifugando a 8,000 g durante 15 min a 30°C. El precipitado se colocó en cloroformo a 30°C a 200 rpm durante 24h para hacer la lisis celular y extraer el PHB del interior de la bacteria. El PHB fue recuperado por precipitación con un disolvente no soluble empleando metanol al 70% seguido de una filtración al vacío para separar el polímero de la fase líquida. Para la caracterización del polímero obtenido se emplearon análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN de ^1H y de ^{13}C respectivamente) incluyendo un espectro de protón en 2D (COSY) obtenidos ambos en un equipo Bruker Avance III HD de 500 MHz y un análisis de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1a muestra el espectro de RMN de ^1H en 2D (COSY) del PHB producido por la bacteria *M. extorquens*. En el espectro se aprecia un multiplete a 5.27 ppm característico del grupo CH que interactúa con el metilo a 1.29 ppm acoplado

con el protón del carbono quiral y con el cuadruplete a 2.58 ppm atribuido al grupo metileno (CH_2) unido al grupo carbonilo que interactúa con el grupo metilo. Se observa un singulete a 1.57 ppm, atribuido al grupo metileno unido al grupo metilo de la cadena lateral. Estas señales son similares a las encontradas en una muestra comercial de Sigma-Aldrich del mismo polímero. La Fig. 1b muestra los espectros de FTIR del PHB extraído de *M. extorquens*, donde se observa la presencia de señales a 2800 cm^{-1} , correspondiente al grupo metilo y a 1700 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo.

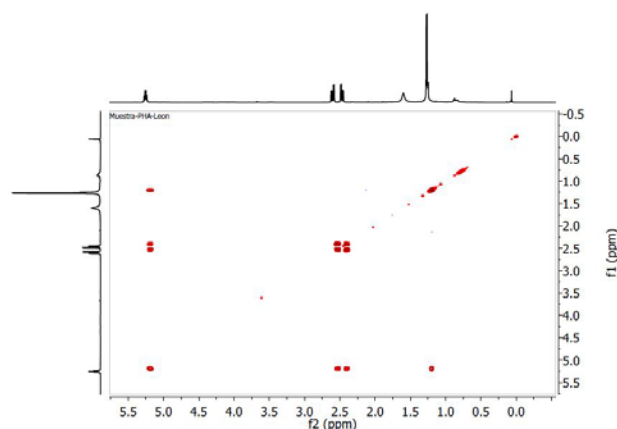


IMAGEN 1: Espectro de RMN de ^1H en 2D de PHB producido por *M. extorquens*

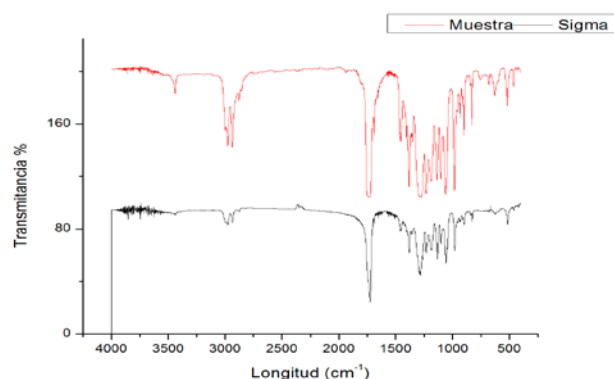


IMAGEN 2: Espectros de FTIR de PHB producido por *M. extorquens* (superior) y comercial (inferior)

El peso molecular viscosimétrico promedio \bar{M}_v es de 10070.65 g/mol lo que permite formar películas por evaporación de solvente. La inclusión de PEG-400 en el medio de cultivo permite el crecimiento de la bacteria sin la integración de éste a la cadena del polímero producido impidiéndose con ello la copolimeración del PHB con el poetilenglicol.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron polihidroxialcanoatos usando como fuente de alimento MeOH y una mezcla de MeOH-PEG-400 de la bacteria *M. extorquens*. Los análisis de RMN de protón en 2D y FTIR indican que el polímero producido por la bacteria *M. extorquens* corresponde al PHB sin presencia de polietilenglicol en la cadena del polímero.

AGRADECIMIENTOS

JDRG agradece una beca del proyecto “Creación del área de nanotecnología en la Universidad de Guanajuato” de la Convocatoria Institucional para Fortalecer la Excelencia Académica.

REFERENCIAS

- [1] Tan, G., Chen, C., Li, L., et al. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review.
- [2] Plackett D., (2011), Biopolymers –New Materials for Sustainable Films and Coating (1st ed.), Noida, India: Wiley
- [3] Bonartsev A. P., Myshkina V. L., et al. (2007). Biosynthesis, biodegradation, and applications of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 295-307.
- [4] Mokhtari-Hosseini Z. B., Vasheghani-Farahani E. et al.(2009), Statistical mediaoptimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium, Bioresource Technology, 100, 2436-2443.