

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS DE RESIDUO CERO PARA LA
PRODUCCIÓN DE PLÁSTICOS TERMOFORMABLES A PARTIR DE
ORUJO DE UVA**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ana Paula Falero- 246398

Lea Teguer- 210140

Tutoras: Mary Lopretti y Mariana Umpierrez

2024

Declaración de autoría

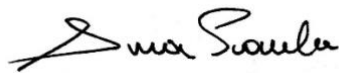
Nosotras, Ana Paula Falero y Lea Teguer, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el proyecto final de Ingeniería en Biotecnología
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Lea Teguer

5 de Marzo de 2024



Ana Paula Falero

5 de Marzo de 2024

Agradecimientos

En esta ocasión, se quiere expresar nuestro agradecimiento a las personas e instituciones que colaboraron y permitieron desarrollar este proyecto.

En primer lugar, agradecer a nuestras tutoras Mary Lopretti y Mariana Umpierrez por brindarnos el apoyo y conocimiento necesario para desempeñar este trabajo, como también por su orientación y disposición durante el transcurso del mismo.

Agradecer a la Universidad ORT por la formación a nivel profesional que nos ha brindado. También por permitirnos utilizar las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología. Sumado a esto, agradecemos la colaboración y el aprendizaje que nos han dado los funcionarios docentes y estudiantes. Particularmente, queremos agradecer a Florencia Pirotti, Sebastián Rodríguez y Nicolás Soriano por toda la ayuda y orientación brindada.

Además, queremos agradecerle al personal del Laboratorio de Diseño Industrial, especialmente a Carlos Galarraga, por su asesoría en el laboratorio de diseño.

Queremos agradecer a la bodega Spinoglio, a Inés Tiscorna y la empresa BIOPACK por brindarnos el material necesario para realizar este trabajo. Además, agradecer a la Dra. Ana Inés Catalán por su conocimiento y orientación en la temática del estudio.

Le queremos dar una mención especialmente a Male, Mati y Clara por todo su apoyo, tiempo compartido en el laboratorio, ayudándonos a llevar el proyecto adelante .

Por último, agradecemos sinceramente el apoyo emocional brindado por nuestros familiares, amigos, compañeros y demás seres queridos, que ha hecho posible que lleguemos hasta esta instancia.

Resumen

El orujo de uva es el principal residuo de la industria vinícola, representando el 12% de las uvas procesadas para la producción del vino. En el año 2023 se estima la generación de 8.264.825,51 kg de este residuo. En la mayoría de las bodegas uruguayas, este subproducto se utiliza como fertilizantes para los viñedos, lo que genera preocupaciones ambientales en cuanto al impacto en el suelo y en efluentes de agua adyacentes.

El orujo de uva es un residuo orgánico de alto valor nutricional, que presenta carbohidratos, fenoles, ácidos orgánicos, entre otros. Actualmente, se ha estudiado la producción de bioplásticos a partir de orujo, generando un gran interés debido al problema ambiental que representan los plásticos derivados del petróleo.

Por lo mencionado, se dedicó este trabajo final de carrera a la creación de una técnica de residuo cero. Se diseñó un innovador bioproceso que revaloriza el orujo de uva y del cual se logró obtener dos productos finales; un bioplástico biodegradable denominado PHB y un copolímero. Ambos productos están dirigidos a ser utilizado por la industria vitivinícola, apoyando la idea de una economía circular.

Se utilizó el residuo como fuente de nutrientes para el cultivo de *C. necator* y *B.ginsengi*. Para ambas bacterias se realizó una identificación molecular, que confirmó su identidad y una prueba de screening que arrojó un resultado positivo para producción de PHB, reportándose por primera vez la producción del biopolímero por *B.ginsengi*.

Por otro lado, se logró extraer del orujo de uva 4.07 g/L de glucosa y 5.36 g/L de fructosa, a partir de un pretratamiento de hidrólisis ácida. El extracto fue incorporado en medio YEM, obteniéndose un $Y_{p/x}$ de 0,4567, un Q_x de 0,0053 q/L.h y un Q_p de 0,0050 g/L.h para la bacteria *B.ginsengi*. *C.necator* reportó los valores de $Y_{p/x}$ de 0,3063, Q_x de 0,0008 g/L.h y Q_p de 0,0020 g/L.h. Se realizó un proceso de extracción de PHB para ambas bacterias y se analizó las muestras por FTIR. Por otro lado, se logró obtener un copolímero con relación 20:80 de polvo de orujo y bioplástico respectivamente. Estos resultados muestran que es posible la generación de PHB y del copolímero. Para finalizar, se estudia cómo se llevaría a cabo el proyecto a escala industrial y se realiza el análisis económico del mismo.

Palabras clave

B. ginsengi; bioplástico; *C. necator*; copolímero; orujo; PHB; residuo cero; revalorización.

Abreviaturas

PHA- Polihidroxialcanoato

PHB- Polihidroxibutirato

INAVI- Instituto Nacional de Vitivinicultura

UNEP- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

PP- Polipropileno

PET- Tereftalato de polietileno

°C- Grados Celsius

KDPG- 2-keto-3-desoxy-6-fosfogluconato aldolasa

FBP- fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa

LB- Medio Luria Bertani

PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

DNS- Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

MEGA- Molecular Evolutionary Genetics Analysis

NCBI- National Center for Biotechnology Information

3-HB- 3 hidroxibutirato

OD- densidad óptica

Índice de contenido

1. Introducción.....	12
1.1. <i>Industria vinícola</i>	12
1.1.1. Orujo como problema de la industria.....	13
1.1.2. Potencial del orujo como sustrato en procesos biológicos	15
1.2. <i>Problemática del plástico</i>	15
1.2.1. Biopolímeros biodegradables	16
1.2.2. Copolímeros.....	17
1.3. <i>Polihidroxibutirato (PHB)</i>	18
1.3.1. Síntesis biológica.....	19
1.3.2. Degradación del PHB.....	20
1.4. <i>Microorganismos productores de PHB</i>	21
1.4.1. <i>Cupriavidus necator</i>	22
1.4.2. <i>Bhargavaea ginsengi</i>	22
1.5. <i>Utilización de bioprocesos para la producción de PHB</i>	23
2. Objetivos.....	25
2.1. <i>Objetivo general</i>	25
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	25
3. Metodologías.....	26
3.1. <i>Materiales</i>	26
3.1.1. Reactivos	26
3.1.2. Material biológico.....	26
3.2. <i>Caracterización y pretratamiento del sustrato de partida</i>	26
3.2.1. Almacenamiento	26
3.2.2. Hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.....	27
3.2.3. Optimización de hidrólisis ácida.....	28
3.2.4. Determinación de azúcares presentes	28
3.3. <i>Screening e identificación de cepas productoras de PHB</i>	30
3.3.1. Tinción de gram	30
3.3.2. Identificación molecular	30
3.3.3. Análisis filogenético.....	32
3.3.4. Screening con Sudan Black B.....	32
3.3.5. Extracción y degradación	32
3.4. <i>Optimización de parámetros fisicoquímicos y condiciones de cultivo</i>	33
3.4.1. Determinación de la concentración de sustrato inicial.....	33
3.4.2. Determinación de temperatura y agitación óptima	33
3.4.3. Modelado de curvas de crecimiento bacteriano.....	34
3.4.4. Realización de curvas nefelométricas entre OD _{600nm} y peso seco.....	34
3.5. <i>Optimización del proceso y producto final</i>	35
3.5.1. Determinación de consumo de sustrato	35
3.5.2. Determinación de la formación de producto	36
3.5.3. Evaluación del producto final.....	37
3.5.4. Crecimiento con medio nutriente.....	37
3.5.5. Ensayo con dos pasos batch utilizando <i>resting cells</i>	38
3.5.6. Modelado de curvas de consumo de sustrato y formación de producto	38
3.6. <i>Producción del copolímero</i>	39
4. Resultados y discusión.....	41

4.1.	<i>Pretratamiento del orujo</i>	41
4.1.1.	Comparación de los procesos de hidrólisis	41
4.1.1.	Evaluación de hidrólisis ácida	42
4.2.	<i>Screening e identificación de cepas productoras de PHB</i>	47
4.2.1.	Tinción de gram	47
4.2.2.	Identificación molecular	48
4.2.3.	Análisis filogenético	49
4.2.4.	Screening con Sudán Black B	52
4.2.5.	Producto obtenido de la extracción	53
4.3.	<i>Parámetros fisicoquímicos y condiciones de cultivo</i>	54
4.3.1.	Concentración de sustrato inicial	54
4.3.2.	Temperatura y agitación óptima	55
4.4.	<i>Evaluación del proceso</i>	59
4.4.1.	Producción en formato un paso batch con crecimiento	59
4.4.2.	Comparación de crecimiento con medio nutriente	65
4.4.3.	Ensayo con dos pasos batch utilizando resting cells	67
4.4.4.	Evaluación del producto final	75
4.5.	<i>Producción del copolímero</i>	77
5.	Diseño del proceso industrial y análisis económico	81
5.1.	<i>Diseño de planta</i>	81
5.2.	<i>Generación del inóculo</i>	89
5.3.	<i>Análisis preliminar de viabilidad económica</i>	90
6.	Conclusiones	93
7.	Referencias bibliográficas	95
8.	Anexos	107

Índice de ilustraciones

Figura 1. Mapa de distribución de bodegas y viñedos turísticos en Uruguay (2).....	12
Figura 2. Imagen satelital de la bodega Spinoglio, donadora del orujo de uva utilizado en este proyecto (2).....	13
Figura 3. Estructura molecular del PHB.....	19
Figura 4. Vía de síntesis del PHB para <i>C. necator</i> a partir de carbohidratos (12).	20
Figura 5. Vía de degradación térmica del PHB a ácido crotónico (19).	21
Figura 6. Comparación del crecimiento de <i>B.ginsengi</i> bajo distintas condiciones de tratamiento del orujo. En la placa A se ve crecimiento de <i>B.ginsengi</i> en medio YEM suplementado con 40g/L de hidrolizado acido de orujo de uva. En la placa B también se vio crecimiento de la bacteria en medio YEM con la misma concentración de hidrolizado enzimático de orujo. Sin embargo, la placa C de medio YEM con 40g/L de orujo sin tratar no presento crecimiento.....	42
Figura 7. Cromatograma del HPLC para glucosa y fructosa obtenidas mediante hidrólisis ácida. En la imagen se ven dos picos, uno al minuto 9,138 correspondiente a la glucosa, y otro al minuto 11,745 correspondiente a la fructosa. Los demás picos corresponden a componentes sin caracterizar del hidrolizado de orujo de uva.	46
Figura 8. Tinción de gram obtenidas. <i>B. ginsengi</i> (A) mostró un resultado de bacilo gram positivo. <i>C. necator</i> (B) mostró un resultado de bacilo gram negativo. Ambos resultados coinciden con lo reportado en bibliografía.	48
Figura 9. Gel de agarosa al 1% para el fragmento de 16S. Los carriles corresponden a: 1) Ladder. 2) Bacteria 1 sin diluir. 3) Bacteria 1 dilución 1:5. 4) Bacteria 1 dilución 1:10. 5) Bacteria 2 sin diluir. 6) Bacteria 2 dilución 1:5. 7) Bacteria 2 dilución 1:10. 8) Control negativo.corresponden	49
Figura 10. Árbol filogenético obtenido para el fragmento de 16S para <i>B. ginsengi</i> y <i>C. necator</i> . Se utilizó <i>E. coli</i> como grupo externo. Los microorganismos enmarcados son los utilizados en este trabajo. Los valores observados en las ramas corresponden al valor dado por el test de <i>Bootstrap</i>	51
Figura 11. Crecimiento bacteriano y tinción de Sudan Black B. La placa A corresponde a <i>B. ginsengi</i> . La placa B corresponde a <i>C. necator</i> . La placa C corresponde a <i>E. coli</i> , se realizó como control negativo. Se creció las bacterias en medio YEM y la coloración azul se debe a la tinción Sudan Black B, donde se esperan ver colonias azul oscuro si se produce PHB.....	53
Figura 12. Crecimiento de <i>B. ginsengi</i> en medio YEM con distintas concentraciones iniciales de sustrato. A) 10 g/L de hidrolizado de orujo inicial. B) 20 g/L de hidrolizado de orujo inicial. C) 40 g/L de hidrolizado de orujo inicial. La coloración azul oscuro se debe a la tinción realizada por Sudan Black B.	54
Figura 13. Crecimiento de <i>C. necator</i> en medio YEM con distintas concentraciones iniciales de sustrato. A) 10 g/L de hidrolizado de orujo inicial. B) 20 g/L de hidrolizado de orujo inicial. C) 40 g/L de hidrolizado de orujo inicial. La coloración azul oscuro se debe a la tinción realizada por Sudan Black B.	55
Figura 14. Curvas de crecimiento de <i>B. ginsengi</i> . A) Curvas obtenidas para las condiciones de 25°C, 30°C y 37°C a 150 rpm. B) Curvas obtenidas para las condiciones de 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm a 30°C. Se realizaron en medio YEM suplementado con 40 g/L de hidrolizado de orujo. .	57
Figura 15. Curvas de crecimiento para <i>C. necator</i> correspondientes a las condiciones de 150 rpm, 200 rpm y 250 rpm a 30°C. Se realizaron en medio YEM suplementado con 40 g/L de hidrolizado de orujo.	58
Figura 16. Curvas de crecimiento de <i>C. necator</i> para condición de sustrato inicial de 20 g/L y 40 g/L de hidrolizado de orujo en medio YEM.....	59
Figura 17. Curva de crecimiento y de formación de producto obtenidas para <i>B. ginsengi</i> a 30°C y 200 rpm. Se realizaron en medio YEM suplementado con 40 g/L de hidrolizado de orujo por una duración de 54 y 147 horas respectivamente.....	60
Figura 18. Curva de crecimiento y de formación de producto obtenidas para <i>C. necator</i> a 30°C y 200 rpm. Se realizaron en medio YEM suplementado con 20 g/L de hidrolizado de orujo por una duración de 72 y 147 horas respectivamente.....	62
Figura 19. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC para las muestras de consumo de sustrato tomadas durante el crecimiento de <i>B. ginsengi</i> y <i>C. necator</i> . Se indica los picos de glucosa y fructosa en sus respectivos tiempos de retención. Se indica en rojo un pico correspondiente a una interferencia. A) Muestra tomada para <i>C. necator</i> a tiempo 0. B) Muestra tomada para <i>C.</i>	

<i>necator</i> a la hora 76. C) Muestra tomada para <i>B. ginsengi</i> a tiempo 0. D) Muestra tomada para <i>B. ginsengi</i> a la hora 22. E) Muestra tomada para <i>B. ginsengi</i> a la hora 54.....	64
Figura 20. Curvas de crecimiento en medio LB. A) <i>B. ginsengi</i> . B) <i>C. necator</i> . La duración de las mismas fue de 33 y 39 horas respectivamente.	67
Figura 21. Concentración de PHB obtenida en <i>resting cells</i> para <i>B. ginsengi</i> en condiciones del hidrolizao sin diluir, en dilución al medio y en dilución al quinto.....	68
Figura 22. Curvas para el consumo de sustrato de <i>B. ginsengi</i> en <i>resting cells</i> para las condiciones de sin diluir, dilución al medio y dilución al quinto.....	70
Figura 23. Curvas para el consumo de sustrato de <i>C. necator</i> en <i>resting cells</i> . Las condiciones son sin diluir, dilución al medio y dilución al quinto. Los valores que se muestran como 0 g/L corresponden a valores obtenidos por debajo de la curva de glucosa y fructosa.	72
Figura 24. Comparación del crecimiento entre medio YEM con y sin suplemento de 0,5 g/L de fructosa. La figura A corresponde a las curvas para <i>B. ginsengi</i> , donde BGF es el medio suplementando y BG es el medio no suplementando. La figura B corresponde a las curvas para <i>C. necator</i> , donde CNF es el medio suplementando y CN es el medio no suplementando.	74
Figura 25. Espectros obtenidos para ácido crotónicos. Las muestras corresponden a <i>B. ginsengi</i> (1:10), <i>C. necator</i> (1:10), estándar industrial (1:100) y estándar de síntesis biológica (1:100).	76
Figura 26. Láminas de copolímero de almidon de maíz y restos lignocelulósicos del orujo. Las imágenes corresponden a las siguientes proporciones: A) 90:10, B) 80:20 y C) 70:30.	77
Figura 27. Lámina de copolímero obtenida para la proporción de 80:20 de PHB industrial y restos lignocelulósicos del orujo.	79
Figura 28. Corcho de copolímero obtenida para la proporción de 80:20 de pellet de almidon de maíz y restos lignocelulósicos del orujo.	79
Figura 29. Diagrama de bloques para el proceso de producción y extracción del PHB.....	82
Figura 30. Diagrama de flujo de equipos para la producción y extracción de PHB.....	83

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias de los primers, enzima y mix utilizado y condiciones del ciclado de la PCR para el fragmento de 16S.....	31
Tabla 2. Concentración de azúcares obtenidas mediante el método de DNS para distintas temperaturas analizadas.	44
Tabla 3. Concentración de azúcares obtenidas mediante el método de DNS para distintos pH analizadas.....	45
Tabla 4. Concentraciones de glucosa, fructosa y azúcares reductores obtenidas por HPLC y DNS...	47
Tabla 5. Parámetros de crecimiento y de producción obtenidos para <i>B. ginsengi</i>	63
Tabla 6. Parámetros de crecimiento y de producción obtenidos para <i>C. necator</i>	63
Tabla 7. Consumo de glucosa obtenidos a partir de tiras de medición para <i>C. necator</i>	65
Tabla 8. Parámetros de producción obtenidos para <i>B. ginsengi</i> en las condicione SD, 1:2 y 1:5 de <i>resting cells</i>	71
Tabla 9. Descripción de los equipos mencionados en el Diagrama de flujo de equipos.....	84
Tabla 10. Descripción de las líneas entre los equipos correspondientes al diagrama de flujo de equipos.....	87

1. Introducción

1.1. Industria vinícola

Uruguay se destaca a nivel mundial como un país reconocido por su excelencia en la producción y exportación de alimentos, donde la vitivinicultura se considera como uno de los eslabones más importantes dentro del sector agropecuario. La industria vinícola genera un gran impacto, causando que nuestro país se posicione entre los cuatro mejores productores vitivinícolas del continente (1). Según datos reportados por INAVI para el año 2023 Uruguay contaba con 162 viñedos y 26 bodegas, abarcando una extensión de territorio de 1846 hectáreas destinadas al cultivo de uvas para producción de vino (2). El 70 % de la producción se da en los departamentos de Canelones, Montevideo y San José, mientras que el 30 % restante corresponde en su mayoría a los departamentos de Durazno, Colonia, Lavalleja y Maldonado. En la figura 1 se muestra los datos de las declaraciones juradas de cosecha efectiva en el año 2023. Dado que el vino se genera a partir de una fruta de estación como lo es la uva, su producción no es anual, sino que se concentra en una temporada de vendimia. La misma abarca los meses de febrero y marzo, y corresponde al período en el cual se cosecha la uva y comienza la zafra del vino (3). En 2023 se cosecharon 71.378.947 kg de uva, de las cuales el 96,49% se destinó a la producción de vino, generando para ese mismo año 50.224.537,16 litros (2).

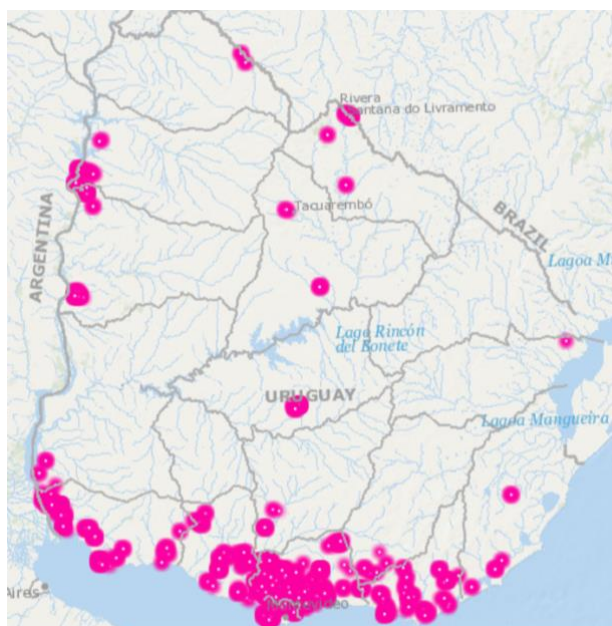


Figura 1. Mapa de distribución de bodegas y viñedos turísticos en Uruguay (2).



Figura 2. Imagen satelital de la bodega Spinoglio, donadora del orujo de uva utilizado en este proyecto (2).

1.1.1. Orujo como problema de la industria

Teniendo en cuenta la magnitud de las cifras mencionadas sobre la producción de vinos, es esperable que se generen volúmenes importantes de residuos o subproductos en el proceso de elaboración. El orujo de uva es el principal residuo de la industria vinícola, representando un 12% de las uvas procesadas (4). Una vez cosechada la uva, se la somete a un proceso de prensado en el que se extrae el jugo del fruto para usarlo en la fermentación del vino. Para el caso de los vinos blancos el orujo de uva se genera a partir de los restos sólidos producto del prensado; por otra parte, en los vinos tintos el residuo orgánico se deja con el mosto por un determinado tiempo para que aporte pigmentos y componentes de la uva, y luego se descarta (5). Teniendo en cuenta los valores de producción anual, se podría estimar la generación de este residuo en aproximadamente 8.264.825,51 kg de orujo de uva en el año 2023. La dimensión de este subproducto genera alarmas sobre la gestión del residuo. Se debe considerar que las bodegas están distribuidas en gran parte del país, por lo cual la gestión de este subproducto debe ser controlada por los vinicultores de forma individual. Además, no todas las bodegas cuentan con las condiciones necesarias para adaptarse a un modelo de gestión del residuo adecuado.

En Uruguay la mayoría de las bodegas utilizan el orujo de uva como fertilizante para el cultivo de viñedos. Esta acción genera preocupación a nivel ambiental ya que este residuo cuenta con un valor de pH bajo. Para poder utilizarlo como fertilizante, los vinicultores realizan un pretratamiento mezclando el orujo con cal para lograr neutralizar su pH, como indica el Decreto

N.º 182/013 de la Ley General de Protección del Medio Ambiente. Sin embargo, esta práctica no está del todo avalada debido a que presenta gran cantidad de macronutrientes, componentes químicos y orgánicos que hacen difícil su descomposición (6). En consecuencia, el uso incorrecto y excesivo de estas acciones podría ocasionar la acidificación y erosión del suelo, así como también el desbalance de su ecosistema, e incluso la contaminación de cauces de agua cercanos. Esto último es muy importante, ya que como se puede ver en la figura 1, en general tanto los viñedos como las bodegas se localizan próximos a efluentes de aguas naturales. Para la industria, el acceso cercano a este recurso es favorable a nivel productivo, sin embargo, se deben extremar los cuidados para evitar riesgo de contaminación. Además, dada la maduración y putrefacción del fruto, este puede atraer distintos insectos o microorganismos, que pueden presentar patogenicidad. Por otro lado, otra alternativa que solía usarse es el uso de orujo de uva como aditivo alimenticio para animales. Sin embargo, la cantidad de polifenoles asociados a proteínas que presenta hace que sean difíciles de asimilar (6, 7).

Hoy en día, se ha buscado implementar modelos de revalorización que permitan generar diversos productos a partir del orujo de uva. Estos van desde la implementación de procesos más elaborados, como por ejemplo la generación de productos de valor agregado como el etanol, ácido tartárico, málico y cítrico (8, 9), o también la producción de aguardiente o algunos licores en bodegas que cuenten con la maquinaria adecuada. Sin embargo, en estos procesos también surgen problemáticas, como la generación de residuos sólidos con altos niveles de compuestos fenólicos en la producción de ácido tartárico o etanol, como también la generación de aguas residuales en el proceso de generación de aguardientes con altos niveles de DQO. En consecuencia, estas operaciones también involucran un alto costo adicional para la industria, por lo tanto, aquellas bodegas de menor dimensionamiento recaen en la utilización del orujo como fertilizante.

También, en los últimos años, el orujo se ha explotado en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y en la producción de biocombustibles. En Uruguay, uno de los tratamientos más innovadores que se han implementado ante la problemática del orujo de uva es la elaboración de una harina que funciona como suplemento dietario natural, con alto potencial antioxidante, rico en proteínas y minerales y con alto contenido en fibras (10).

1.1.2. Potencial del orujo como sustrato en procesos biológicos

En la actualidad el orujo de uva es un foco de interés biotecnológico, no solo para amortiguar el riesgo de contaminación, sino también para la revalorización del mismo, debido a su alto valor nutricional. Este presenta concentraciones considerables de lípidos, proteínas, azúcares, lignina, fenoles, pectinas, vitaminas y minerales, entre otros (5, 6, 11). Debido a esto, una estrategia de revalorización es utilizarlo como fuente de carbono en cultivos microbiológicos en diversos procesos de fermentación. Actualmente se ha innovado en la producción de biopolímeros biodegradables a partir de microorganismos. Para esto, el rol que cumple el orujo de uva es proporcionar los azúcares, principalmente glucosa y fructosa al medio (5, 12, 13). Además, también se utiliza el orujo en procesos de fermentación con hongos o en procesos enzimáticos para producir biocombustibles como lo son el etanol y también ácido láctico y biosurfactantes entre otros (14).

1.2. Problemática del plástico

La invención del plástico ha generado un alto impacto a nivel mundial. La versatilidad, durabilidad y rentabilidad del material ha permitido el desarrollo de grandes avances en sectores como la medicina, la exportación de alimentos, entre otros. Sin embargo, el uso desmedido de este material ha causado que se convierta en una de las principales causas del calentamiento global. Según datos brindados por la *National Geographic*, en el año 2015 se generaron 448 millones de toneladas de plásticos, cantidad que crece exponencialmente a medida transcurren los años (15). Sumado a esto, la ONU reveló que alrededor de 19 a 23 millones de toneladas de plásticos terminan en ecosistemas acuáticos (16). Esto causa la muerte anual de millones de animales en océanos, mares y ríos. El plástico es un polímero sintético derivado del petróleo que demora entre 400 y 1000 años en descomponerse. Esto ha causado que se produzcan grandes acúmulos de este material en los océanos, generados por las corrientes marinas, del tamaño de islas. Un ejemplo de ellas es la de isla de basura del pacífico, la cual se estima tiene 1,6 millones de kilómetros cuadrados (17). Una gran parte de los plásticos producidos son de un solo uso, en los que se encuentran las bolsas plásticas y productos de espuma de poliestireno, las cuales se utilizan masivamente para envasados de productos alimenticios. Además de ser uno de los productos plásticos que demoran más en descomponerse, alrededor de 1000 años, también contienen sustancias químicas tóxicas que a largo plazo ocasionan perjuicios en la salud. Esto es relevante ya que al estar en contacto con los alimentos puede causar daños al sistema nervioso, respiratorio y reproductivo (18).

Sumado a esto, el plástico no se degrada completamente, sino que se descompone en microplásticos y nanoplásticos que siguen en circulación en el medio ambiente (19). Esto hace más difícil su control debido a su diminuto tamaño y los vuelven más nocivos para nuestra salud, ya que terminan ingresando a nuestro organismo a través de los alimentos, el agua y el aire que respiramos. Estudios científicos han demostrado la presencia de microplásticos y nanoplásticos en nuestro sistema circulatorio, pulmones e incluso se ha visto la presencia de estos dentro de nuestras células (19).

1.2.1. Biopolímeros biodegradables

Para esta problemática se han planteado varias alternativas para revertir los daños ambientales. Dado que el uso de plásticos es imprescindible en la actualidad, no se puede erradicar su producción. Sin embargo, se ha planteado diversas soluciones para revertir los daños ambientales. Una de ellas es la incorporación de estrategias de reciclado para sustituir el plástico de un solo uso. Otra posible solución es la generación de un copolímero producto del mezclado de material plástico con material orgánico, buscando reducir el porcentaje de plásticos utilizado (20–22). Por otra parte, una de las estrategias más llamativas de la cual se habla en la actualidad es la sustitución de los plásticos derivados del petróleo, por plásticos biodegradables. Existen dos tipos de definiciones para estos polímeros; por un lado, se puede definir a un bioplástico como aquel plástico que procede de biomasa, mientras que por otro lado se les define como todo aquel plástico biodegradable que cumplen con los criterios científicos establecidos en las normas de biodegradabilidad y compostabilidad. Haga clic aquí para escribir texto. (23).

No todos los bioplásticos son biodegradables. Existen aquellos que provienen de biomasa y no son biodegradables, aquellos que provienen de biomasa y son biodegradables y también los que provienen de productos fósiles y son biodegradables. Algunos de los biopolímeros más renombrados son el PLA, los PHAs y los TPS, los cuales se originan a partir de biomasa y son biodegradables. Hoy en día se sabe que tanto el PLA como los PHAs son capaces de ser producidos por microorganismos. Esto ha despertado un gran interés en el ámbito biotecnológico. Existe una gran variedad de estos organismos vivos que son capaces de sintetizar plástico. La producción de este material por parte de los microorganismos se da con el fin de acumular cadenas carbonadas como fuente de energía. Ante una situación de estrés, se estimula la producción de acúmulos lipídicos con la finalidad de utilizarlos como reserva energética. Teniendo esto en cuenta, estudios biotecnológicos se basan en la optimización del

cultivo de estos microorganismos bajo condiciones de estrés para maximizar la producción del bioplástico. También otros estudios se basan en la manipulación genética de los genes implicados en la vía de síntesis del polímero. La búsqueda de mejoras en el rendimiento de producción ayuda a introducir esta alternativa al mercado. Esto es importante, ya que como se reporta en diversos estudios, los rendimientos obtenidos de producción de bioplástico por parte de microorganismos son bajos. Sumado a esto, los costos de producción son elevados. Sin embargo, esta alternativa es más verde que la generación sintética de los polímeros biodegradables, ya que en esta se implementan sustancias químicas nocivas.

1.2.2. Copolímeros

Una de las alternativas mencionadas anteriormente se basa en la producción de copolímeros que ayuden a reducir el porcentaje de plásticos utilizados. En algunos casos, esto se logra elaborando plásticos compuestos, en los que se genera un producto de la unión de material lignocelulósico o fibras de residuos agroindustriales, con plásticos. El mismo presenta las ventajas de ser fácilmente reciclable, biodegradable, no abrasivo, de bajos costo, entre otros (24). Los métodos empleados para su fabricación son a base de compresión, por extrusión o por inyección (25).

Los materiales orgánicos utilizados para la producción de plásticos compuestos son de preferencia fibras naturales como polisacáridos y lignina que se encuentran en la pared celular de las plantas, cumpliendo funciones estructurales y de almacenamiento energético, entre otros. Ambos presentan las características de ser biodegradables, biocompatibles y no tóxicos, mejoran las propiedades mecánicas del producto, reducen la absorción de agua y además dado que se encuentran en abundancia, reducen los costos (22, 26).

El orujo de uva está conformado por un alto porcentaje de fibras dietarias, entre un 20 y 80 %. Dentro de estos porcentajes se encuentran pectinas, entre un 37 y 54%, celulosa entre un 27 y 37%, lignina entre un 16.8 y 24.2%, y otros polisacáridos (6). Esta característica en base a su composición lo hacen un material orgánico con un alto potencial en su uso para la elaboración de plásticos compuestos.

El posible desarrollo de este producto usando como materia orgánica el orujo de uva es muy relevante, ya que desde el inicio se plantea la revalorización de todo el orujo de uva generado

en la industria vitivinícola, dando como resultado residuo cero. Además, la elaboración de este producto da lugar a la fabricación de otros productos plásticos que puedan ser utilizados en la misma industria, como por ejemplo etiquetas para su utilización en botellas de vino, así como corchos, o también cajones para el transporte de materiales dentro y fuera de la bodega. Así, además de generar residuo cero, se apoya el modelo de economía circular, que busca optimizar los recursos utilizados en la producción reduciendo al máximo los residuos generados.

1.3. Polihidroxibutirato (PHB)

Los PHA pueden clasificarse en dos categorías, de cadena corta y de cadena mediana. Los PHA de cadena corta poseen la característica de tener en su unidad monomérica entre 3-5 átomos de carbono. Estos presentan la ventaja de tener propiedades físicas similares al PP, como son su cristalinidad y dureza. Dentro de esta categoría del bioplástico mencionado se encuentra el PHB, el cual es el biopolímero más estudiado y disponible dentro de los PHA, que se suele encontrar en su forma de 3 carbonos en su monómero y se destaca principalmente por su biodegradabilidad, en especial durante la escala de tiempo en la que interacciona con microorganismos degradadores (27).

El PHB se caracteriza estructuralmente por poseer un grupo metilo y un enlace éster, los cuales le dan la característica al polímero de cristalinidad, rigidez e hidrofobicidad (27). Los monómeros previamente mencionados al unirse forman polímeros de entre 200 a 3000 kDa de tamaño (28). Las propiedades térmicas del polímero se describen a través de las temperaturas de transición a vidrio (T_g), temperatura de melting de la estructura cristalina (T_m) y la temperatura de degradación (T_d). La T_m específica del PHB es de 180°C, mientras que la T_g se encuentra entre 5°C a 9°C (27, 28).

Por otro lado, el PHB puede ser sintetizado de tres formas distintas. La primera es a través de una reacción de polimerización del anillo a partir del compuesto inicial de β -butirolactona. Contrariamente, también puede ser sintetizado a partir de plantas, especialmente plantas transgénicas, las cuales pueden ser utilizadas para este propósito debido a la alta disponibilidad de Acetil-CoA. En último lugar, el método más común es por fermentación bacteriana, lo cual se debe al alto porcentaje de PHB en comparación a la biomasa total, pudiendo ser cercano al 90%. Haga clic aquí para escribir texto. (27).

El PHB es un bioplástico biodegradable perteneciente a la familia de los PHA. Estos últimos son un grupo que aglomera diversos biopolímeros microbianos termoformables. Todos los bioplásticos que forman parte de los PHA poseen una estructura química en común, variando su grupo funcional característico y el número de repeticiones de la estructura (27). Las ventajas de los PHA sobre otros plásticos tradicionales o biopolímeros incluyen la diversidad y el número de microorganismos reportados para su producción, la capacidad de su degradación en condiciones normales, su biocompatibilidad con nuestro organismo, pudiendo ser utilizados para dispositivos biomédicos, y sus propiedades mecánicas, siendo estas similares a plásticos fósiles ampliamente utilizados como el PET y el PP. Su gran potencial como polímero para productos biomédicos se debe a su capacidad de degradarse finalmente a moléculas simples como son el H₂O y el CO₂ (28).

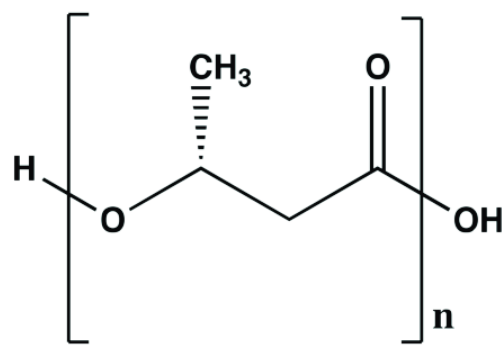


Figura 3. Estructura molecular del PHB (29).

1.3.1. Síntesis biológica

En función de estudios realizados sobre microorganismos productores, se observó que la vía de síntesis para PHB se encuentra conservada en gran parte de ellos (30). El metabolismo observado en la figura 4 corresponde a la formación del producto a partir de diversas fuentes de carbono como son las azúcares, resaltando especialmente la glucosa y la fructosa, y ciertos aminoácidos como el ácido glutónico (31). Estas moléculas ingresan en primera instancia a la vía Entner-Doudoroff, donde se cataboliza la glucosa a piruvato a través de la actividad de la enzima KDPG. Cabe destacar que esta vía es secundaria en la mayoría de las bacterias para la oxidación de la glucosa. Sin embargo, se observó que ciertos microorganismos productores, como *C.necator*, no poseen la enzima FBP, la cuál es clave en la glucólisis, por lo que la vía Entner-Doudoroff funciona como el catabolismo principal (30, 31)

El cluster *pha* consiste en 5 genes *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaR* y *phaZ*. En específico los primeros tres genes mencionados están implicados en la síntesis. En primer lugar, *phaA* codifica para la enzima β -ketotilasa, transformando el Acetil-CoA en Acetoacetyl-CoA. El gen *phaB* codifica la enzima acetoacetyl reductasa, por lo que se obtiene 3-hidroxiacetyl-CoA. Por última, *phaC* codifica la enzima PHB sintetasa, donde se produce finalmente PHB (31). Por otro lado, *phaZ* codifica la enzima PHB depolimerasa, el cual se activa si la bacteria precisa que haya una fuente de carbono disponible (32), y *phaR* corresponde a un regulador transcripcional de la expresión (31).

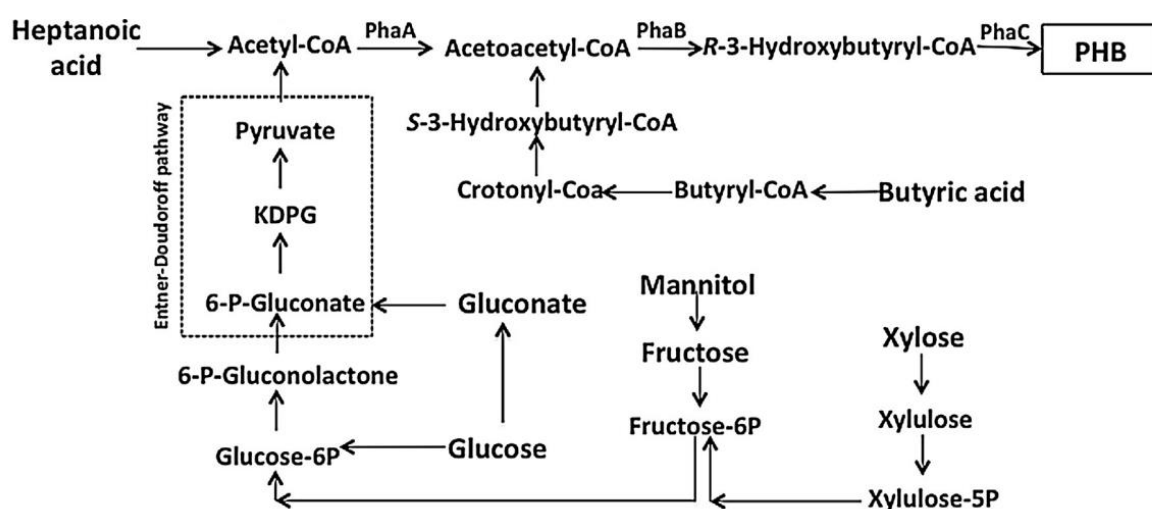


Figura 4. Vía de síntesis del PHB para *C. necator* a partir de carbohidratos (30).

Identificando al Acetil-CoA como el precursor del PHB, se puede plantear estrategias para mejorar la producción de este biopolímero. Tomando en cuenta que esta molécula participa en numerosas vías del microorganismo, agregando a los medio de cultivo componentes que participen de estas vías puede ayudar a centrar el Acetil-CoA en la producción de PHB. En el trabajo realizado por Yong-Hyun *et al.* 1996 (30) se demostró que agregando citrato, tirosina o ácido palmítico mejoro tanto el crecimiento bacteriano como la producción de PHB (33).

1.3.2. Degradación del PHB

Una de las características más importantes y atractivas de este biopolímero es su capacidad de ser biodegradado. Esto se debe principalmente al enlace estér con el que cuenta la molécula de PHB, ya que es un punto de clivaje para diversas enzimas provenientes de microorganismos. Mediante el accionar tanto de bacterias como de hongos, el PHB puede ser biodegradado a

moléculas de menor peso molecular y menos complejas que la unidad monomérica del biopolímero (34). En condiciones aeróbicas, los productos de degradación que se obtienen son CO₂ y H₂O. Por otro lado, bajo anaerobiosis se obtiene CO₂, H₂O y CH₄Haga clic aquí para escribir texto. (28, 34).

Sin embargo, el PHB puede ser degradado por un proceso de descomposición térmica, o a través de la degradación usando ácido sulfúrico (35, 36). Como se observa en la figura 3, en este proceso de degradación se obtienen dos productos, ácido crotonico y oligómeros, mediante una reacción de escisión en cadena que genera una β-eliminación de un grupo CH (35). Si bien el ácido crotonico es una molécula más compleja que las obtenidas por el primer mecanismo de biodegradación mencionado, esta posee diversas ventajas. El ácido crotonico es utilizado en la síntesis de copolímeros en conjunto con compuestos como acrilamida, polietileno glicol y acetato de ácido vinílico (37). Además, suele emplearse en industrias como la pintura, textil, adhesivos, floculantes y de agroquímicos (38).

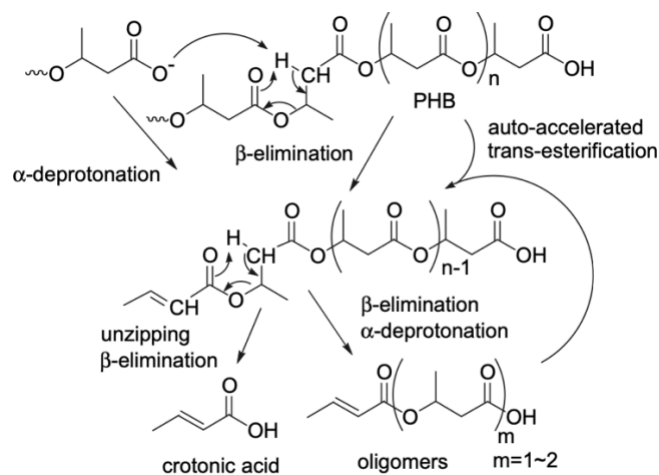


Figura 5. Vía de degradación térmica del PHB a ácido crotonico (39).

1.4. Microorganismos productores de PHB

La producción de PHB está reportada para un vasto número de microorganismos en la literatura bibliográfica. Llevando a cabo procesos optimizados, se ha observado que la acumulación en ciertas bacterias puede alcanzar valores de hasta 90% de su biomasa total, mientras que la concentración del biopolímero obtenida puede ser de hasta 150 g/L (40). Algunos de los microorganismos reportados que producen PHB son: *Bacillus cereus*, *Bacillos megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Brevibacillus invocatus* y *Halomonas campisalis*.

1.4.1. *Cupriavidus necator*

C. necator es una bacteria bacilo gram negativa de la familia *Burkholderiaceae*. Este microorganismo es ampliamente estudiado como productor de PHB, y se encuentra reportado como una de las bacterias con mejores rendimientos tanto de producción del biopolímero, como de las características mecánicas del mismo (27). Su gran potencial para usos en procesos biotecnológicos se debe a sus diversas capacidades metabólicas, ya que la misma puede ser quimiolitótrofa o heterótrofa, y a la vez crecer bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Dentro de la heterotrofia que presenta, se analizó que puede utilizar distintos sustratos como fuente de carbono, como fructosa, N-acetil-glucosamina, gluconato y precursores y derivados del mismo PHB (41). En total, se reportaron hasta el momento 33 cepas de la bacteria, siendo 14 *wild type* y 19 obtenidas mediante mutagénesis o ingeniería genética. En la totalidad de cepas reportadas se encontró mediante análisis de taxonomía y filogenia los genes *phaCAB*, fundamentales para producir el biopolímero (41). Específicamente, se observó tres cepas ampliamente estudiadas en la producción de PHB. Estas son la cepa DSM 531 o ATCC 17697, la cepa DSM 428 o H16, y en tercer lugar una cepa mutante, la DSM 545 o H16 G⁺³ (40). Las cepas H16, tanto *wild type* o la obtenida por ingeniería genética, son reportadas con las cepas con mejor producción de PHB. La diferencia entre ambas corresponde que a contrario de la DSM 428, la cepa 545 expresa la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, por lo que posee la capacidad de consumir glucosa (41).

1.4.2. *Bhargavaea ginsengi*

B. ginsengi es una bacteria con morfología de bacilo y gram positiva, la cual también es un microorganismo halotolerante de forma moderada (42). Pertenece a la familia de *Planococcaceae* (43–45).

En la literatura bibliográfica analizada para el presente trabajo no se reportó producción de PHB. Sin embargo, si se observó que ciertos microorganismos pertenecientes a la misma familia tienen la capacidad de producir este biopolímero, siendo estas *Caryophanon latum* (46), *Jeotgalibacillus Soli* (47) y *Planomicrobium sp* (48). Por otro lado, la familia de bacterias *Planococcaceae*, que a su vez pertenece al filo *Bacillota*, forma parte de un grupo más amplio de bacterias conocido como Posibacteria. Dentro de esta agrupación, se encuentra también los microorganismos del filo *Actinomycetota*, de los cuales un gran número de bacterias dentro del

mismo reportan producción de PHB, como son *Nocardia sp.*(49), *Rhodococcus sp.* (50), *Mycobacterium sp.* (51) y *Gordonia sp.* (52).

1.5. Utilización de bioprocesos para la producción de PHB

En este proyecto se busca producir PHB a través de la fermentación del orujo de uva mediada por bacterias.

Los bioprocesos son escalables, pueden ir desde una escala de laboratorio, una escala piloto y por último una escala industrial. La mayor diferencia que presentan es la dimensión en volúmenes trabajados. Particularmente, en la escala de laboratorio se selecciona la cepa a trabajar, se estudia los parámetros de cinética de crecimiento y las condiciones del medio de cultivo. Por otro lado, en la escala piloto se optimizan las condiciones de operación, como por ejemplo la forma en la que se realizará el bioproceso (batch, fed-bath, continuo o *resting cells*), se establecen las condiciones de flujos y presión, la temperatura y las velocidades de agitación. Finalmente, llegado a la escala industrial se lleva a cabo la producción del producto a gran escala.

Las dos primeras etapas de escalado son fundamentales para lograr obtener el producto final en las mejores condiciones posibles y en el menor tiempo y costo. Entre los parámetros cinéticos y de producción a estudiar se encuentran, la temperatura, el pH, la agitación, la velocidad específica de crecimiento del microorganismo, así como también las velocidades de consumo de sustrato y generación de producto, los rendimientos de biomasa y producto en función de sustrato, las productividades volumétricas, entre otros.

También se debe considerar que el tiempo de duración del bioproceso puede variar dependiendo del formato elegido. Por ejemplo, la fermentación en modalidad Batch consiste en el cultivo de microorganismos en un solo lote. Esto quiere decir que no hay un flujo del medio a medida transcurre el proceso. El organismo vivo pasa por todas las fases de crecimiento microbiano, desde la fase lag en la cual el mismo pasa por un periodo de adaptación, la fase exponencial en la cual se desarrolla, la fase estacionaria y la fase de muerte. A nivel industrial, muchas veces la fermentación en modalidad Batch no es la más eficiente, ya que requiere la pérdida de tiempo en la limpieza del fermentador una vez terminado cada lote, además de que, al no ser una fermentación alimentada como en el caso de Fed-Batch o en modalidad continua, en la que en

ambas se va agregando sustrato, el microorganismo tiene un límite de crecimiento establecido por la cantidad de sustrato que se le suministra inicialmente. Sin embargo, esta modalidad es la más utilizada a nivel de laboratorio, ya que permite determinar el comportamiento natural del organismo vivo, además de que muestra la curva de crecimiento con todas sus fases, permitiendo establecer los tiempos de duración de cada una (53). Esto es importante ya que, en el caso de que el producto sea un metabolito primario asociado al crecimiento, conociendo los tiempos de inicio y fin de la fase exponencial, se puede modelar el bioproceso para extender esta fase, adoptando una modalidad fed-batch o continua. Por otro lado, si el producto de interés es un metabolito secundario, que se produce en fase estacionaria, también se puede modelar el bioproceso para extender esta etapa, por ejemplo, adoptando una modalidad de *resting cells*.

Como se mencionó anteriormente, el PHB es un metabolito secundario que se produce una vez llegada a la fase estacionaria. Por lo tanto, la modalidad más adecuada para potenciar la producción de este biopolímero es la de *resting cells*. En términos generales, esta forma de bioproceso se basa en trabajar con el organismo vivo en estado de reposo, en el cual no se fomenta el crecimiento celular. El organismo vivo se pone en contacto con un medio que potencie la producción del metabolito de interés, permitiendo trabajar en fase estacionaria. Hay que aclarar, que previo a esto se debe cultivar el microorganismo en un medio rico en nutrientes que fomente al máximo su crecimiento, para luego contar con un número de células adecuadas para la metodología descrita (54).

En este proyecto se trabajó únicamente en una escala a nivel de laboratorio empleando dos formatos de bioprocesos como lo son la modalidad Batch y *Resting cells*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Desarrollo de una tecnología de residuo cero a partir de orujo de uva para la producción de PHB por fermentación bacteriana.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterización del sustrato de partida y evaluación de condiciones de pretratamiento.
- Screening e identificación de cepas para producción de PHB.
- Optimización de los parámetros fisicoquímicos de la fermentación para la producción de PHB y evaluación del producto final.
- Estudio de la producción de un copolímero utilizando PHB y residuos lignocelulósicos generados.
- Diseño de planta para la producción del polímero y copolímero y factibilidad económica del proceso.

3. Metodologías

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El cloroformo, metanol, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico se obtuvieron de *Carlo Erba Reagents* (Val de Reuil, Francia). Los componentes para los medios de cultivo NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ también son de *Carlo Erba Reagents* (Val de Reuil, Francia). La peptona, extracto de levadura, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ y agar son de. El Ladder utilizado es de *Thermo Fischer* (Massachusetts, EEUU). El reactivo (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilano es de *Sigma Aldrich* (Darmstadt, Alemania).

3.1.2. Material biológico

El orujo de uva fue donado por la bodega Spinoglio ubicada en el departamento de Montevideo. La cepa *B. ginsengi* DSM 19083 fue otorgada por el Laboratorio de Biotecnología ORT Uruguay y la cepa *C. necator* DSM 531 se adquirió de *nite*. Las enzimas celulasa y hemicelulasa son de *Sigma Aldrich* (Darmstadt, Alemania) y la Taq Polimerasa es de *New England Lab* (Massachusetts, EEUU).

3.2. Caracterización y pretratamiento del sustrato de partida

Para maximizar la extracción de azúcares del orujo de uva, manteniendo intacta su integridad a corto y largo plazo, se realizaron diferentes métodos para extraer azúcares y almacenar el orujo.

3.2.1. Almacenamiento

Una vez obtenido el orujo, se llevó a cabo el almacenamiento en el Laboratorio de Biotecnología en ORT. Los métodos de almacenamiento utilizados fueron el congelado y el secado. El método de congelamiento se planteó en perspectiva a largo plazo para el resguardo y conservación de la integridad de la materia prima, mientras que el método de secado se utilizó para el almacenado del orujo a corto plazo, próximo a la experimentación.

El congelado de la materia se realizó a una temperatura de -20°C . El orujo se fraccionó en bolsas autoclavables y se resguardo en las heladeras. Por otra parte, el secado se llevó a cabo en una estufa a una temperatura entre 60°C a 64°C . El orujo se colocó en bandejas de forma distendida y se dejó en la estufa aproximadamente 48 horas hasta lograr eliminar la humedad. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de molienda con la finalidad de mejorar la manipulación de la materia prima. Este paso se realizó utilizando una licuadora trituradora Vitamix 7500. El polvo de orujo obtenido se almacenó en bolsas a temperatura ambiente para su posterior utilización. Los métodos de almacenamiento utilizados se seleccionaron según información bibliográfica (32), para lograr la mejor conservación e integridad de los azúcares presentes en el orujo. Haga clic aquí para escribir texto.

3.2.2. Hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática

Para la extracción de azúcares del orujo de uva se evaluaron dos métodos diferentes, hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida. Además, se evaluó el crecimiento en orujo en polvo sin tratar como control. Los tres ensayos se hicieron por duplicado.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo tomando como referencia el procedimiento realizado por Follonier *et al.* 2014 (55), utilizando las enzimas celulasa y hemicelulasa. Se hizo una mezcla pesando 75 g de orujo en polvo y agregando 150 mL en agua destilada, buscando una consistencia final de una pasta. Posteriormente se adicionaron 7,5 g del cóctel enzimático, en donde ambas enzimas celulasa y hemicelulasa se incorporaron en la misma proporción. La preparación se colocó en una plancha de laboratorio con agitación con pastilla magnética por 60 min a 50°C .

Para la hidrólisis ácida se generó la pasta de orujo con las mismas proporciones de orujo y agua. Luego se bajó el pH de la mezcla a 3, agregando una cantidad aproximada de 2,5 mL de HCl al 37% v/v (12, 56). Como en el método anterior, la preparación se colocó en una plancha de laboratorio a las mismas condiciones.

En el caso del orujo en polvo puro sin tratar, se generó la consistencia de pasta y se colocó en una plancha de laboratorio al igual que en los métodos anteriores.

Una vez culminados los 60 min, se fraccionaron las mezclas hidrolizadas en tubos Falcons y se centrifugaron a 5000 g durante 30 min. En el caso de la hidrólisis ácida, el pH del sobrenadante fue neutralizado a pH 7 y luego almacenado a -20°C para utilizarlo como fuente de carbono para el cultivo de las bacterias. Por otro lado, el pellet se congeló a -20°C y se guardó para su futura utilización en la elaboración de un copolímero,

Posteriormente, se evaluó en placas con medio YEM el crecimiento de *B. ginsengi* con los diferentes hidrolizados y con el orujo sin tratar a una concentración de 40 g/L. Este medio contiene los siguientes componentes (13): 1,0 g de (NH₄)₂SO₄; 4,5 g de Na₂HPO₄·2H₂O; 1,5 g de KH₂PO₄; 0,2 g de MgSO₄·7H₂O; 1.0 g de extracto de levadura y 15 g de agar. Se comparó las hidrólisis únicamente con esta bacteria debido a que no contábamos con *C. necator* en el momento en el que se hizo el ensayo.

3.2.3. Optimización de hidrólisis ácida

Se decidió seleccionar únicamente el método de hidrólisis ácida para la extracción de azúcares, por lo que se procedió con su optimización, evaluando los parámetros de temperatura, pH y tiempo. Se elaboró una mezcla de orujo y agua siguiendo las mismas proporciones mencionadas en el apartado anterior. Para el estudio del parámetro de temperatura se realizaron hidrólisis a 50°C, 35°C y temperatura ambiente, todas con el mismo valor de pH 3. Por otra parte, para el estudio del parámetro de pH se hicieron hidrólisis a pH 3,5 y 4, a una temperatura fija de 50°C.

Para los cinco experimentos se tomaron muestras en Eppendorf a tiempo 0 min, 15 min, 30 min, 45 min y 60 min. Luego se centrifugaron por 30 min a 5000g. El sobrenadante de los Eppendorf se utilizó para una posterior cuantificación de azúcares reductores por ensayo DNS.

3.2.4. Determinación de azúcares presentes

La determinación de azúcares presentes en el hidrolizado de orujo de uva se llevó a cabo mediante la técnica HPLC y el ensayo de reactivo DNS para azúcares reductores.

3.2.4.1. Reactivo DNS

El reactivo DNS se realizó siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio de biotecnología ORT. Para el ensayo se utilizó placas de 96 pocillos. La curva de calibración se

hizo tomando como referencia la glucosa. Las concentraciones utilizadas fueron de 180 mM, 160 mM, 140 mM, 120 mM, 100 mM, 80 mM, 60 mM, 40 mM y 20 mM.

Dado que la muestra de hidrólisis es una muestra compleja, se hizo el ensayo DNS evaluando el efecto matriz. Para la curva de calibración se sembraron por pocillo 50 μ L de solución de la curva, 25 μ L de agua destilada y 50 μ L de reactivo DNS. Para las muestras problemas, se sembró por pocillo 50 μ L de cada solución de la curva de glucosa, 30 μ L de la muestra problema y 50 μ L de DNS. Las placas se dejaron incubando 10 min y luego se midió la absorbancia de las placas en un lector de placas Thermoscientific Multiskam FC a 562 nm. Tanto la curva como las muestras se sembraron por duplicado.

Una vez obtenidos los datos para el ensayo de efecto matriz, se procedió a analizar los datos de cada muestra. Para lo mencionado, se realizó para cada muestra una gráfica de la absorbancia detectada a 562nm en función de la concentración de glucosa en mM. Una vez que se corroboró que las pendientes obtenidas correspondan a la pendiente de la curva de calibración de glucosa, se utilizó la ley de Lambert Beer para calcular la concentración de azúcares de la muestra problema hallando $-b/a$, correspondiente a cada tiempo de las temperaturas y pH evaluados en la optimización de la hidrólisis ácida.

3.2.4.2. HPLC

La cuantificación de azúcares por HPLC se realizó en el equipo Agilent 1200 HPLC equipment, utilizando la columna cromatográfica Aminex HPX-87C (Biorad) para medir carbohidratos. Se hicieron dos curvas de calibración con concentraciones conocidas de glucosa y otra de fructosa. La muestra de hidrólisis analizada fue la que presentaba las condiciones de temperatura a 50 °C, tiempo de 45 min y a pH 3. Para la preparación de las muestras se filtraron las mismas en un filtro de 0,22 μ m. La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico con un flujo de 0,6 mL/min. La temperatura de la columna fue seteada a 80 °C. El volumen de muestra inyectado fue de 20 μ L, y la detección se hizo por Índice de refracción G1362A (Agilent) (57, 58).

Con el software LabSolutions V: 5.111 se determinó el área de los picos del cromatograma. Con la ecuación de los gráficos 1 y 2 correspondientes a las curvas de calibración de glucosa y fructosa respectivamente, donde X corresponde a la concentración en g/L de cada azúcar, mientras que Y representa el área de cada pico. A partir de estas ecuaciones y del área de los

picos de glucosa y fructosa reportados en las muestras, se logró obtener la concentración de los azúcares analizados en el hidrolizado.

$$y = 200560x + 120137 \text{ (Ecuación 1)}$$

$$y = 215111x - 4644,1 \text{ (Ecuación 2)}$$

3.3. Screening e identificación de cepas productoras de PHB

Con el objetivo de identificar cepas bacterianas productoras de PHB, se evaluó el perfil molecular, morfológico y filogenético de las mismas, acompañado de un screening y una extracción del polímero.

3.3.1. Tinción de gram

Se realizó una tinción gram de las cepas bacterianas *C. necator* y *B. ginsengi* para identificar sus características morfológicas y las propiedades de su pared celular. Para la tinción se siguió el protocolo establecido por el laboratorio. El resultado de la tinción fue observado en el microscopio óptico.

3.3.2. Identificación molecular

Para la identificación molecular de las posibles cepas productoras de PHB se llevó a cabo una amplificación por PCR de la región 16S. Esto se realizó para dos presuntas cepas productoras de PHB disponibles en el laboratorio de biotecnología ORT. Además, vale aclarar que para la bacteria *C. necator* no se realizó este ensayo debido a que la mismo se adquirió posteriormente del sitio *nite*. Para la extracción de ADN de ambas cepas se utilizó el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit. Luego de obtener el material genético bacteriano, se realizó la PCR utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer* (M0273) de *New England Lab*, junto con los primers 27F y 1492R. Las condiciones de ciclado se pueden visualizar en la tabla 1, junto con el Mix utilizado para la PCR. Se llevó a cabo en termociclador *Applied biosystems by Thermo Fischer Scientific*.

Para corroborar el producto de la PCR se hizo una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% para las dos muestras amplificadas, utilizando el *Ladder GeneRuler DNA Ladder Mix* SM0331, de *Thermo Fisher*.

Luego de obtener un amplicón de aproximadamente 1500 pb, las muestras fueron enviadas a secuenciar al laboratorio Genexa (59). Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, se realizó un BLAST para identificar las cepas estudiadas.

Tabla 1. Secuencias de los primers, enzima y mix utilizado y condiciones del ciclado de la PCR para el fragmento de 16S.

Primer	Secuencia	
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	
Enzima		
Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273)		
Mix de PCR		
Reactivo	Volumen (volumen final 25 µL)	
Buffer 10X	2,5 µL	
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µL	
DNTPs mix	5 µL	
Primer 27F (10 µM)	1 µL	
Primer 1492R (10 µM)	1 µL	
ADN	1 µL	
Taq ADN Polimerasa	0,5 µL	
Agua	12,75 µL	
Condiciones de ciclado		
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización X1	95	3 minutos
	95	30 segundos
Hibridación X35	54	45 segundos
	72	1 minuto

Extensión	72	3 minutos
X1	4	∞

3.3.3. Análisis filogenético

El análisis filogenético se llevó a cabo mediante la elaboración de un árbol filogenético. Con la secuencia de la región 16S de las cepas identificadas, *C. necator* y *B. ginsengi*, se diseñó un árbol filogenético estudiando la relación evolutiva que existe entre ellas y con otras cepas productoras de PHB reportadas en bibliografía. La región 16S de las demás cepas fueron extraídas de NCBI. La generación del árbol se llevó a cabo con el software MEGA11 (60). Las secuencias se agruparon utilizando el algoritmo ClustalW, y luego se alinearon utilizando el método de máxima parsimonia, con un Bootstrap de 500. Se utilizó *E.coli* como grupo externo.

3.3.4. Screening con Sudan Black B

Para identificar si *C. necator* y *B. ginsengi* producen PHB se realizó un screening con el colorante Sudan Black B, el cual tiñe de azul oscuro los acúmulos de lípidos neutros presentes en las bacterias. La tinción se hizo siguiendo el protocolo establecido por E.Susianingsih *et al.* 2020 (61). Para el ensayo se inocularon placas de Petri con ambas cepas. El medio utilizado fue YEM con hidrolizado de orujo de uva, proveniente de la hidrólisis ácida. Las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas, hasta tener un crecimiento considerable de las bacterias. Se empleó *E.coli* como control negativo ya que, según la bibliografía consultada, no tiene la capacidad de producir bioplástico. Este ensayo se realizó por duplicado.

3.3.5. Extracción y degradación

Para obtener una identificación más directa de la producción de PHB, se llevó a cabo una metodología de extracción del biopolímero para ambas bacterias.

3.3.5.1. Extracción de PHB

La extracción de PHB se hizo a partir de un cultivo líquido de las cepas *C. necator* y *B. ginsengi* en medio YEM con hidrolizado, realizándose el mismo por duplicado. Una vez alcanzada la fase estacionaria para ambas bacterias, los cultivos se fraccionaron, de forma individual, en Falcons y se centrifugaron a 5000g durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y los pellets se secaron a 37°C durante 72 horas. Tras secarse, fueron removidos a tubos de vidrio para iniciar con el proceso de extracción. El protocolo utilizado se diseñó en base los protocolos

establecidos por V. Yellore *et al.* 1998 (62), M. López Abelairas, *et al.*, 2015 (63) y por Etxabide *et al.* 2022 (13). Luego de tener los pellets de bacteria en los tubos de vidrio se les añadió 5 mL de cloroformo concentrado y se incubaron con tapa a 37°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo, se realiza un paso de filtrado con papel Whatman N°1 hacia nuevos tubos de vidrio. En este paso se separa la biomasa del cloroformo en el que esta disuelto el PHB. Seguidamente se añaden 5 mL de metanol concentrado a los tubos y se deja evaporar a 60°C. Una vez evaporado, el biopolímero permanece seco en el tubo.

3.4. Optimización de parámetros fisicoquímicos y condiciones de cultivo

Con el objetivo de la puesta a punto del proceso de la fermentación para la obtención del producto final, se analiza la concentración inicial de sustrato óptima, la temperatura y la agitación de cultivo.

3.4.1. Determinación de la concentración de sustrato inicial

Para el estudio de la concentración de partida de sustrato se realizó placas de petri con medio YEM. En este medio se agregó diferentes concentraciones de orujo hidrolizado previo a la esterilización, siendo las concentraciones mencionadas 10, 20 y 40 g/L respectivamente, realizándose cada condición por duplicado. Luego de 72 horas de incubación en estufa de cultivo a 30°C para *C. necator* y *B. ginsengi* se analizó el crecimiento de cada placa.

3.4.2. Determinación del temperatura y agitación óptima

La determinación de la temperatura y agitación óptima para las bacterias *C. necator* y *B. ginsengi* se llevó a cabo a través de cultivos líquidos en un ensayo de matraces. Para el mismo se utilizó el medio YEM previamente mencionado. En el caso de *C. necator*, al estar disponible la información bibliográfica (13) sobre la temperatura utilizada para producción, se decidió evaluar únicamente su agitación óptima para el crecimiento. Sin embargo, para *B.ginsensi* a pesar de que su temperatura óptima de crecimiento está reportada (64), no hay datos bibliográficos sobre su crecimiento en medio líquido ni sobre su uso para producción, por lo que se evalúa tanto su agitación como su temperatura óptima. Para los cultivos de ambos microorganismos se partió de pre-inóculos con medio LB para poder lograr un OD_{600nm} inicial en el cultivo de matraces de 0,1. El ensayo se realizó en 32 horas, tomando muestras cada una

hora, mientras que el OD_{600nm} de cada muestra se midió en espectrofotómetro. Los ensayos mencionados se realizaron por duplicado y se llevó a cabo una tinción de gram de las muestras a tiempo 0, en la hora 6 y a tiempo final para corroborar que no se encuentren contaminaciones.

3.4.3. Modelado de curvas de crecimiento bacteriano

A partir de los valores de OD_{600nm} obtenidos se realizan las curvas de crecimiento microbiano utilizando el programa informático GraphPad Prism 10 Versión 10.2.0 (335). Los datos ingresados se han modelado siguiendo el ajuste de Gompertz, el cual utiliza la ecuación 3. Los parámetros incluyen Y₀, el cual se refiere a la población inicial, Y_M que corresponde a la población máxima y K indica la fase lag. Por otro lado, X corresponde al tiempo e Y a la población microbiana.

$$Y = Y_M * (Y_0 / Y_M)^{\exp(-K * X)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

3.4.4. Realización de curvas nefelométricas entre OD_{600nm} y peso seco

Con el fin de poder relacionar el OD obtenido con valores de concentración de biomasa se realizó un cultivo líquido en medio YEM para ambos microorganismos hasta un OD final de 1. Partiendo del medio de cultivo obtenido a tiempo final, se realizó diluciones seriadas del mismo hasta alcanzar la dilución -6. Para cada muestra mencionada se midió el OD_{600nm}, y posteriormente se centrifugó en tubos falcon y se mantuvo cada dilución en estufa a 37°C por 72 horas con el propósito de obtener la biomasa seca. A continuación, se pesó la biomasa previamente secada en balanza de precisión, obteniendo los valores de peso seco y por lo tanto los valores de concentración de biomasa en g/L, correspondientes a cada OD_{600nm} medido por dilución. Dicho ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Los datos obtenidos fueron ingresados al programa GraphPad Prism 10 Versión 10.2.0 (335), donde siguiendo el ajuste de regresión lineal se llegó a la ecuación 4 y 5 para *B. ginsengi* y *C. necator* respectivamente. En ambas ecuaciones el parámetro X representa el OD_{600nm}, mientras que Y corresponde a la concentración de biomasa en g/L.

$$Y = 0,01260 * X - 0,002263 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$Y = 0,02268 * X - 0,001179 \quad (\text{Ecuación 5})$$

3.5. Optimización del proceso y producto final

3.5.1. Determinación de consumo de sustrato

Con el propósito de analizar el consumo de sustrato para ambos microorganismos se plantearon distintas estrategias, para las cuáles se partió de cultivos líquidos en medio YEM, en matraces incubados a 30°C y 200 rpm, tomándose muestras dos veces por día. Cabe mencionar que se utilizó un matraz por cada muestra tomada, por duplicado, con un volumen total de 70 mL. Para el caso de *B. ginsengi* la duración fue de 54 horas, mientras que para *C. necator* el cultivo se realizó en un periodo de 72 horas.

El primer ensayo planteado se basa en la técnica de DNS. Como se mencionó anteriormente, se siguió el protocolo del laboratorio para la elaboración del reactivo y realización del ensayo. Para determinar la concentración de azúcares reductores presentes en cada muestra se utilizó una placa de 96 pocillos en donde se incubó 50 µL de la muestra, 25 µL de agua destilada y 50 µL de DNS. A la vez, fue necesario realizar una curva de calibración, la cual se realizó a partir de las siguientes concentraciones de glucosa: 20 mM, 60 mM, 100 mM, 120 mM, 160 mM y 200 mM. Este ensayo se realizó por duplicado y se utilizó medio YEM sin inocular como blanco. Por otro lado, también se realizó esta misma técnica, pero considerando el efecto matriz. Para esto, en una placa de 96 pocillos se incubó por un lado 50 µL de cada concentración de la curva de glucosa mencionada, 25 µL de agua destilada y 50 µL de DNS. Con relación a las muestras tomadas, se agregó 30 µL de cada una respectivamente junto a 50 µL de cada concentración de la curva de glucosa y 50 µL de DNS. A continuación, se midió la absorbancia a 562 nm utilizando lector de placas Thermoscientific Multiskam FC. En el caso del ensayo de efecto matriz, se grafica los datos obtenidos para cada tiempo de muestra respectivamente, donde cada punto corresponde a las distintas concentraciones de la curva de glucosa, y a partir de la fórmula $-b/a$ de la ecuación obtenida se logra conocer la concentración de azúcares reductores de cada muestra.

Por otro lado, se decidió estudiar también el consumo de sustrato para el cultivo de ambos microorganismos a través de un ensayo de HPLC asociado a un índice de refracción. Se mantuvo las condiciones de fase móvil, flujo y volumen ingresado de muestra mencionadas, al igual que los equipos de HPLC e IR que en el apartado 3.2.4. En primer lugar, se realizó dos curvas de calibración, para glucosa y fructosa respectivamente, las cuales corresponden a las

ecuaciones 1 y 2. A continuación, se corrieron las muestras en el equipo, obteniéndose para cada una, un pico característico para cada azúcar con su respectiva área. Al igual que lo descrito en la sección 3.2.4, se utilizó el programa LabSolutions V: 5.111 para la determinación de las áreas, para posteriormente interpolar estos valores en las ecuaciones mencionadas.

Por último, se realizó la medición de glucosa mediante un sistema de glucómetro con tiras *Accu-Chek*. Para cada muestra obtenida, se colocó un volumen de 20 μ L sobre cada tirilla, la cual se coloca dentro del aparato medidor. Posteriormente se registra el valor obtenido de glucosa en unidades de g/L, o si en caso contrario el dato obtenido resulta por debajo del límite de sensibilidad del equipo, de 0,1 g/L.

3.5.2. Determinación de la formación de producto

Para el análisis de la producción de PHB se partió de cultivos líquidos en matraces para *C. necator* y *B. ginsengi* respectivamente. Al igual que como se mencionó para el estudio de consumo de sustrato, se utilizó un matraz por muestra con un volumen de 70 mL, siendo el ensayo por duplicado. De igual forma, se incubo los matraces a 30°C y 200 rpm, y el tiempo de duración fue de 54 horas para *B. ginsengi* y 72 horas para *C. necator*.

La cantidad de producto presente en cada muestra se determina por análisis gravimétrico y siguiendo el protocolo previamente detallado en el apartado 3.3.5.1.

Debido a que el PHB puede ser digerido en ácido sulfúrico hasta obtener ácido crotónico, se decidió utilizar esta característica del producto con el propósito de realizar una curva de calibración en la cual se relacione la concentración indirecta de PHB con la absorbancia característica del ácido crotónico, a 240 nm. Siguiendo el protocolo establecido por Mojaverzadi *et al.* 2013 (36), y a partir de un estándar de PHB industrial, se llevó a cabo la digestión de este estándar en 10 mL H₂SO₄ 18M por 15 minutos en baño térmico a 100°C. A continuación, se realizaron diluciones de tal forma de llegar a las siguientes concentraciones: 0,010 mg/mL; 0,008 mg/mL; 0,006 mg/mL; 0,005 mg/mL; 0,004 mg/mL y 0,003 mg/mL. Luego, se midió la absorbancia obtenida para cada dilución en espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, a 240 nm utilizando celdas de Cuarzo. Por último, se ingresaron todos los datos registrados al programa GraphPad Prism 10 Versión 10.2.0 (335), y utilizando el análisis de la

regresión lineal simple, se llegó a la ecuación 6, donde la X corresponde a la concentración indirecta de PHB, mientras que el parámetro Y representa la absorbancia medida a 240 nm.

$$Y = 62,54 * X - 0,1790 \text{ (Ecuación 6)}$$

3.5.3. Evaluación del producto final

Para caracterizar el biopolímero obtenido, se realizó la degradación de este a ácido crotónico. Como se mencionó en la introducción, digerir el PHB con ácido sulfúrico y en altas temperaturas genera como producto el ácido crotónico, el cual puede ser detectado mediante un análisis espectrofotométrico. Para este ensayo se analizaron muestras de PHB extraídas de ambas bacterias por el método mencionado en el apartado 3.3.5.1, PHB comercial de origen sintético y PHB proporcionado por el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, de origen biológico. Los dos últimos fueron necesarios para compararlos con las muestras producidas en este trabajo, por lo que se tomaron como estándar. En primera instancia, se pesó el producto obtenido de cada muestra y se colocaron individualmente en tubos de vidrio. Luego se agregó a cada tubo ácido sulfúrico 18M, buscando una concentración final de 2,16 g/L. Se incubó los tubos en baño térmico a 100°C durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el color de la solución cambia de translucido a marrón oscuro. Por último, se deja enfriar las muestras degradadas y se realizan diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 utilizando una solución de H₂SO₄ de 0,1 M. Se colocan 2 mL de las diluciones en una celda de Cuarzo para analizarlas en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Para la caracterización se realizó un barrido de las muestras desde 200 nm a 400 nm, esperando ver un pico conciso a la altura entre 235-240 nm.

3.5.4. Crecimiento con medio nutriente

Para analizar el crecimiento de las bacterias *B. ginsengi* y *C. necator* en medio YEM suplementado con orujo en comparación con un medio nutriente tradicional, se realizó un ensayo llevado a cabo en matraces con medio LB para ambos microorganismos. Los matraces se incubaron a 30°C y 200 rpm por un periodo de 33 y 38 horas respectivamente para cada microorganismo. El ensayo se llevó a cabo por duplicado, mientras que la inocuidad de los cultivos se analizó por tinción de gram una vez por día. Se tomó una muestra de cada matraz cada 3 horas para medir OD_{600nm} en espectrofotómetro. Las curvas de crecimiento se realizaron según lo establecido en el apartado de modelado de curvas de crecimiento bacteriano.

3.5.5. Ensayo con dos pasos batch utilizando *resting cells*

Con el propósito de maximizar la formación de PHB se decidió llevar a cabo la técnica de *resting cells*. Para lograr esto, en primer lugar, se partió de matraces con medio LB inoculados con *B. ginsengi* y *C. necator* respectivamente a 30°C y 200 rpm hasta llegar a un OD_{600nm} final de 1 en ambos casos. Luego de pasado ese tiempo, se realiza una tinción de gram como control de esterilidad, y luego se centrifuga el medio de cultivo a 2000 xg por 15 minutos. Para el segundo paso del ensayo, se resuspende la biomasa obtenida en distintas condiciones de hidrolizado de orujo, siendo las mismas sin diluir, dilución al medio y dilución en un quinto. Esta incubación se realizó en matraces por duplicado a 30°C y 200 rpm, por un periodo aproximado de 50 horas para ambos microorganismos.

Durante el cultivo en hidrolizado de orujo se tomó para cada matraz una muestra dos veces por día, para el análisis de consumo de sustrato. Este ensayo se realizó mediante una corrida de HPLC, siguiendo las mismas condiciones y parámetros que las descritas anteriormente en la sección 3.5.2. Por otro lado, se determinó el PHB producido a tiempo final por cada bacteria y para cada condición mediante peso seco, realizándose el mismo procedimiento para la extracción de este que la detallada en el apartado 3.5.3.

3.5.6. Modelado de curvas de consumo de sustrato y formación de producto

Las curvas de consumo de sustrato en la modalidad Batch en dos pasos con *resting cells* se realizaron en el programa GraphPad Prism 10 Versión 10.2.0 (335). En el caso de *B. ginsengi*, para las curvas correspondientes a las tres diluciones se utilizó una regresión lineal simple. Por otro lado, con respecto a las curvas de consumo de *C. necator* se usó el ajuste “*Sigmoidal, 4PL, X is concentration*”, donde la X es la concentración, mientras que Y es la respuesta observada mientras X disminuye.

Para realizar las curvas de formación de producto de las muestras analizadas en modalidad batch se utilizó el programa GraphPad Prism 10 Versión 10.2.0 (335). Se analizaron diversos ajustes lineales y no lineales, y se observó que el ajuste de Gompertz se adaptaba mejor a los valores obtenidos según el r^2 . La ecuación de esta regresión se menciona en el apartado 3.4.3.

Por último, para la producción de PHB en *resting cells* se realizó en el mismo programa mencionado un gráfico de barras entre las concentraciones de producto de las tres diluciones

realizadas. Para comprobar si la diferencia entre las mismas es significativa se utilizó el test estadístico ordinario ANOVA.

3.6. Producción del copolímero

Como se mencionó en el apartado 3.2.2 al realizar el proceso de hidrolizado se genera como subproducto una gran cantidad de material lignocelulósico correspondiente a los restos secos del orujo. Estos constituyen el pellet generado luego de la centrifugación, que da paso a la obtención de los azúcares en forma soluble. Para cumplir con la idea de generar una tecnología de residuo cero, se prosiguió a elaborar un copolímero utilizando este material lignocelulósico generado. Tal como se explicó previamente, se necesita un material plástico para generar el copolímero. Siguiendo una ideología verde, se utilizó PHB comercial y un pellet de bioplástico de material de almidón de maíz donado por la empresa BIOPACK (65). La generación del producto se realizó en el Laboratorio de Diseño Industrial de ORT, el cual brindó los elementos necesarios para el proceso.

Para dar con la proporción correcta de orujo y bioplástico se estudiaron varios copolímeros de proporciones diferentes. Dado que teníamos gran cantidad de pellet de almidón de maíz en comparación con el PHB comercial, se utilizó este para optimizar la producción del copolímero.

En primer lugar, se descongeló el pellet de orujo hidrolizado y se secó en bandeja en un horno a 60°C, obteniendo nuevamente un polvo de orujo. Una vez seco, se realizó un proceso de hidrofobización mezclando el polvo con una solución de agua y metanol en una relación 1:1. Luego se añade a la mezcla 1% *wt* de (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilano (GLYMO) y se deja en agitación magnética durante 2 horas (43). Transcurrido el tiempo, la mezcla se lavó con acetona y se secó a temperatura ambiente.

Por otro lado, se mezcló el pellet de almidón de maíz con aceite de canola hasta lograr que los gránulos de bioplástico queden recubiertos. Este proceso se hizo para lograr una mejor integración del bioplástico y el residuo de orujo. Luego se incorporó el polvo seco generando tres mezclas de proporciones diferentes de orujo y plástico: 10:90, 20:80 y 30:70 respectivamente. Posteriormente, en una prensa térmica se fueron colocando las mezclas y se prensó cada una de ellas a 180°C durante 90 segundos, generando un copolímero en forma de

lámina. La temperatura se seleccionó en base a la temperatura de melting del PHB que es de 180°C, tal como se menciona en el apartado 1.3.

Con la proporción 20:80 se hizo un corcho utilizando un molde en horno para fundir vidrio a 180°C durante 11 minutos. El bioplástico utilizado fue almidón de maíz. A su vez, también se generó una lámina de igual proporción utilizando el PHB de origen biológico.

4. Resultados y discusión

4.1. Pretratamiento del orujo

4.1.1. Comparación de los procesos de hidrólisis

En la figura 6 se puede visualizar el resultado del crecimiento en placa de *B. ginsengi* en medio YEM con hidrólisis enzimática, hidrólisis ácida y con orujo de uva sin tratar. Como se mencionó en el apartado 3.2.2, las tres placas contaban con una concentración de orujo de 40 g/L, las cuales se crecieron a 30°C durante 72 horas. Se observa que las placas con orujo hidrolizado presentaron crecimiento, a diferencia de la placa con orujo sin tratar, en la cual no se evidenció ningún rastro de vida microbiana. Dado que los azúcares obtenidos en la hidrólisis son la única fuente de carbono que tiene la célula para crecer, queda demostrado que el proceso de extracción de azúcares es necesario. Por este motivo se justifica la ausencia de crecimiento, ya que el orujo sin tratar no deja disponibles los azúcares para que las bacterias lo consuman.

Por otro lado, observando las placas con hidrolizados se puede ver una leve diferencia en el crecimiento. Sin embargo, teniendo en cuenta el gasto económico que conlleva trabajar con enzimas, la dificultad adicional de su manipulación, sumado a que el crecimiento de *B. ginsengi* en la placa con hidrólisis ácida (A) no fue muy diferente al de la placa con hidrolizado enzimático (B), se decidió continuar todos los ensayos con el orujo tratado con hidrólisis ácida.

La coloración negra de las colonias se debe a que se les realizó una prueba de screening con Sudan Black B para la detección de bacterias potenciales productoras de biopolímeros. Esta técnica se explicará en el apartado 4.2.4.

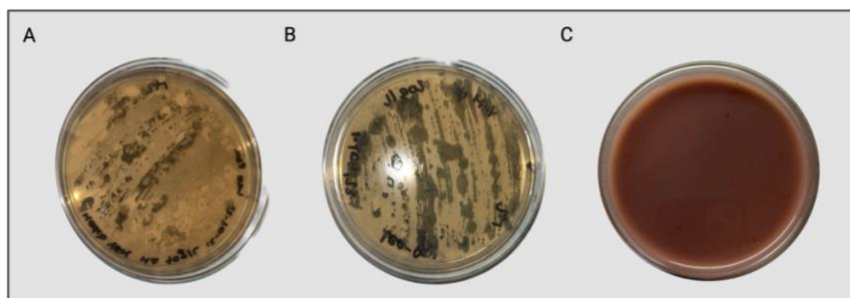


Figura 6. Comparación del crecimiento de *B.ginsengi* bajo distintas condiciones de tratamiento del orujo. En la placa A se ve crecimiento de *B.ginsengi* en medio YEM suplementado con 40g/L de hidrolizado ácido de orujo de uva. En la placa B también se vio crecimiento de la bacteria en medio YEM con la misma concentración de hidrolizado enzimático de orujo. Sin embargo, la placa C de medio YEM con 40g/L de orujo sin tratar no presenta crecimiento.

4.1.1. Evaluación de hidrólisis ácida

Los valores arrojados del ensayo de DNS para la cuantificación de azúcares en la hidrólisis ácida pueden observarse en las tablas 2 y 3. Los resultados reportados en las tablas son producto de los valores de absorbancia interpolados en la curva de calibración de glucosa. Para este ensayo se esperaba observar un aumento gradual de la concentración de azúcares reductores a medida que aumenta la temperatura, disminuye el pH y transcurre el tiempo de exposición.

Comenzando con la tabla 3, los resultados de concentración de azúcares reductores para las diferentes temperaturas, a diferentes tiempos y a pH 3 fueron parejos. Se puede observar un comportamiento creciente en la concentración a medida que pasa el tiempo en la condición de 35°C. Sin embargo, el aumento de la concentración a esta temperatura no es elevado, dado que desde el minuto 30 hasta el minuto 60 solo se vio un incremento de 22mM. Por otro lado, no fue así para la condición a temperatura ambiente, en la cual no se ve un aumento de azúcares a medida que transcurre el tiempo, desde el minuto 30 hasta el minuto 60 se registra una pérdida de 34mM. Tal y como se menciona en el apartado 3.2.4.1 el ensayo DNS presenta las ventajas de ser una técnica colorimétrica, rápida y simple. Sin embargo, el ensayo cuenta con ciertas limitaciones a la hora de procesar los resultados. El viraje de color desde el amarillo al rojo que genera la reacción redox varía en absorbancia dependiendo del azúcar reductor que participe en la reacción. También, a bajas concentraciones de azúcares, las medidas pueden ser afectadas por la presencia de oxígeno disuelto en la muestra. Además, hay muchas moléculas reductoras

que pueden reaccionar con el DNS, potenciando la no especificidad del método. Sumado a esto, cuando se realiza un ensayo DNS en sustancias producto de hidrólisis de materiales lignocelulósicos, no solo se cuenta con monosacáridos en solución, sino también con moléculas más complejas como disacáridos, oligómeros solubles y otras sustancias liberadas en la hidrólisis que pueden reaccionar con el reactivo DNS (67–69). Esto es importante ya que la curva de calibración que se realizó para medir la concentración de azúcares reductores se hizo con el monosacárido glucosa. Aunque luego del proceso de hidrólisis ácida se hizo una centrifugación, pueden existir moléculas que interfieran con la reacción. Por otro lado, también se debe tener en cuenta la calidad de la manipulación en el momento de la siembra, dado que un cambio en los volúmenes puede generar un aumento o disminución de la señal, así como también los tiempos y las temperaturas empleadas en la metodología. Además, se debe manipular cuidadosamente el reactivo, evitando exponerlo a la luz por tiempos prolongados para que el DNS no pierda sensibilidad. Teniendo en cuenta que en la condición de temperatura ambiente no se aplicó calor, por lo que se espera una extracción débil, junto con lo anteriormente mencionado, es previsible la incoherencia de los datos.

Por último, a 50°C tampoco se ve un aumento sostenido en el tiempo en los valores de concentración de azúcares. Se puede observar un pico de 727mM a los 45 minutos y luego una pérdida considerable de 226mM llegado a los 60 minutos. Ya que es la condición de mayor temperatura, y que el decaimiento en la concentración se dio a tiempo final, estos resultados podrían indicar que los azúcares de la muestra no resisten esta temperatura más de 45 minutos. Esto sugiere que la hidrólisis ácida a 50°C es muy agresiva a tiempos prolongados, y explicaría por qué la concentración decae tan drásticamente.

Por otra parte, comparando las tres condiciones, no se pudo observar una relación clara entre el aumento de la temperatura y la cantidad de azúcares obtenidos. Aunque los valores de concentración a 35°C fueron mayores que a temperatura ambiente, no fue así para la temperatura de 50°C en donde las concentraciones fueron más bajas, excluyendo el valor obtenido a 45 minutos. A los 30 minutos se registró un valor de azúcares menor a 50°C que a 35°C, con una diferencia de 24mM. Aun así, este valor es pequeño, teniendo en cuenta las desventajas que presenta la técnica. Este resultado pudo haberse dado por un error en la manipulación o por la interferencia de algunas moléculas en la sustancia. Sin embargo, para el mismo tiempo el valor de concentración de azúcares a 50°C fue mayor que el registrado para temperatura ambiente, al igual que ocurrió para el minuto 60. No obstante, a tiempo final, la

mayor concentración se registró a 35°C, con una diferencia de 29mM en comparación con la condición de 50°C.

Solamente se pudo observar una relación entre el aumento de temperatura y la cantidad de azúcares a los 45 minutos, en la cual la concentración mayor se registró a 50°C, seguida de 35°C y de temperatura ambiente.

Evaluando las condiciones trabajadas, la mayor concentración de azúcares extraídos fue de 727mM producto de la hidrólisis ácida a pH3 y a 50°C al tiempo de 45 minutos. Por esta razón se eligió esta temperatura para las distintas condiciones de pH.

Tabla 2. Concentración de azúcares obtenidas mediante el método de DNS para distintas temperaturas analizadas.

Tiempo (minutos)	Temperatura		
	50 °C	35 °C	Ambiente
30	484 mM	508 mM	345 mM
45	727 mM	527 mM	331 mM
60	501 mM	530 mM	311 mM

En la tabla 3 se registran los valores de concentración de azúcares reductores producto de la hidrólisis ácida realizadas a diferentes pH. Como puede verse, la condición a pH 3 y 50°C presenta el mayor valor de concentración. A diferencia de los valores obtenidos a diferentes temperaturas, en general, al variar el pH se obtuvieron menores concentraciones de azúcares. Además, no se logró obtener la relación esperada entre el transcurso del tiempo del ensayo y la cantidad de azúcares extraídos. Evaluando los resultados generados a pH 4, se ve un aumento en la extracción a los 45 minutos de 71mM. Sin embargo, en el minuto 60 se ve un leve decaimiento de azúcares. Se puede decir que luego de los 45 minutos no se logró extraer más azúcares. A pH 3,5 conforme transcurrió el tiempo la concentración fue disminuyendo mínimamente. Por lo tanto, se estima que entre el minuto 30 y el minuto 60 el resultado de la extracción fue nulo.

Comparando las tres condiciones, en contraste a los resultados obtenidos a diferentes temperaturas, sí se puede apreciar una relación entre la disminución de pH y el aumento de la

concentración de azúcares reductores. Para todos los tiempos evaluados se cumple que las concentraciones obtenidas a pH 3 son las mayores, seguidas de las de pH 3,5 y las de pH 4.

Teniendo presente los resultados de la tabla 2 y la tabla 3 se optó por la condición de hidrólisis ácida a 50°C y pH 3 durante 45 min para seguir adelante con el proyecto.

Tabla 3. Concentración de azúcares obtenidas mediante el método de DNS para distintos pH analizadas.

Tiempo (minutos)	pH		
	3 pH	3,5 pH	4 pH
30	484 mM	210 mM	124 mM
45	727 mM	201 mM	195 mM
60	501 mM	198 mM	189 mM

En la siguiente figura se puede apreciar el cromatograma obtenido del análisis de la muestra de hidrolizado ácido a 50°C y a pH 3 por HPLC (70). Para este ensayo se esperaba tener al menos dos picos pronunciados y definidos, uno de ellos correspondiente al tiempo de retención del minuto 9,138 correspondiente a la glucosa, y otro al minuto 11,745, correspondiente a la fructosa. Como se ve en la figura 7, la cantidad de picos revelados en el cromatograma fue mayor a 2. Este resultado es previsible dado que, como fue mencionado anteriormente, el hidrolizado es una solución compleja. Esto también contribuye a los resultados obtenidos en el DNS para cuantificación de azúcares reductores, en donde se vio incongruencias en los valores que podían explicarse con la presencia de moléculas que interfieren con la señal. Cabe destacar que como perspectiva a futuro se debería hacer una caracterización más exhaustiva de los componentes presentes en el hidrolizado, para poder identificar moléculas que puedan generar interferencia con las técnicas planteadas. En el trabajo realizado por Kourilova *et al.* 2021 (11), donde se caracterizó la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico del orujo de uva, se registró la presencia de monosacáridos, ácidos orgánicos y fenoles. Otro estudio realizado por Follonier *et al.* 2014 (55), determinó la composición del jugo de orujo de uva sin tratamiento, y se obtuvo la presencia de azúcares, etanol, ácidos y taninos.

Por otro lado, se pudo obtener dos picos correspondientes a los tiempos de retención de la glucosa y de la fructosa. Esto es importante ya que ambos azúcares son la fuente de carbono necesaria para que las bacterias puedan desarrollarse. Interpolando el área de los picos con las ecuaciones correspondientes a la curva de calibración para fructosa y glucosa se determinaron las concentraciones de los azúcares en el hidrolizado. Se obtuvo entonces 4,07 g/L de glucosa y 5,36 g/L de fructosa.

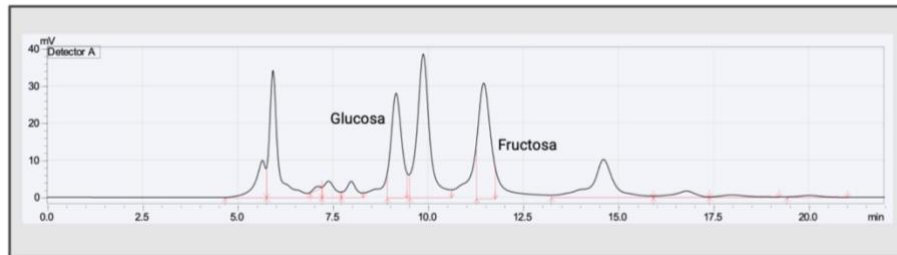


Figura 7. Cromatograma del HPLC para glucosa y fructosa obtenidas mediante hidrólisis ácida. En la imagen se ven dos picos, uno al minuto 9,138 correspondiente a la glucosa, y otro al minuto 11,745 correspondiente a la fructosa. Los demás picos corresponden a componentes sin caracterizar del hidrolizado de orujo de uva.

Comparando los resultados obtenidos para los dos ensayos, puede verse una diferencia considerable en los valores de azúcares en la muestra. En la tabla 4, se registra la concentración de azúcares en g/L para DNS y HPLC. Se observa que el resultado reportado por la técnica de DNS para azúcares reductores es mucho mayor a las concentraciones de glucosa y fructosa obtenidas por HPLC. El cromatograma registró al menos 5 picos de magnitud considerable de los cuales dos corresponden a glucosa y fructosa; el resto de los picos no están identificados. Como la cromatografía utilizada es de intercambio iónico, los picos restantes pueden corresponder a proteínas, nucleótidos, aminoácidos u otros carbohidratos (70). Por esto es razonable que el resultado de azúcares brindado por el DNS sea mayor a la suma del resultado de glucosa y fructosa obtenidos por HPLC. Sin embargo, la diferencia que hay entre las dos técnicas es muy grande, por lo que se puede interpretar que hay una sobreestimación de azúcares reductores en DNS. Como ya fue mencionado, hay muchos factores que afectan la señal colorimétrica que produce la reacción redox en este ensayo. Entre estos, es de suma importancia la complejidad de la solución hidrolizada, la cual, como se reportó en bibliografía y se mencionó anteriormente, presenta una gran variedad de componentes. Además, teniendo en cuenta que no todos los azúcares que reaccionan con el DNS presentan la misma

absorbancia, esto también influye en el resultado final. Es muy probable que algunos de esos picos, que difieren del de glucosa y fructosa, luego de participar en la reacción redox genere un viraje de color que represente una absorbancia mayor.

Tabla 4. Concentraciones de glucosa, fructosa y azúcares reductores obtenidas por HPLC y DNS.

Ensayo	Concentración (g/L)		
	Glucosa	Fructosa	Azúcares reductores
DNS	-	-	130,8600
HPLC	4,0700	5,3600	-

Para finalizar con todo lo previamente discutido y analizado sobre el pretratamiento del orujo, se plantean ciertas perspectivas a futuro con el propósito de poder optimizar las técnicas realizadas. En primer lugar, se propone un análisis más exhaustivo de las interferencias obtenidas en el ensayo de DNS, incluyendo una evaluación de los compuestos del sustrato antes y después de un autoclavado, y estudiar si están ocurriendo uniones inespecíficas de estos compuestos tanto con las azúcares como con el reactivo utilizado. Además, se propone comparar los resultados obtenidos midiendo una concentración de azúcar conocida, que haya pasado por el mismo proceso de hidrólisis y medir los azúcares por metodología HPLC, para analizar si efectivamente el azúcar de esta hidrolizando o está sufriendo otro proceso que pueda afectar el resultado.

4.2. Screening e identificación de cepas productoras de PHB

4.2.1. Tinción de gram

En la figura 8 se pueden apreciar los resultados del gram para *B. ginsengi* y *C. necator*. El resultado de la tinción de *B. ginsengi*, muestra bacilos gram positivos, coincidiendo con la morfología y características de la pared celular reportado para la bacteria. Por otro lado, *C. necator* mostró resultados de bacilos gram negativos, el cual coincide nuevamente con la referencia bibliográfica.

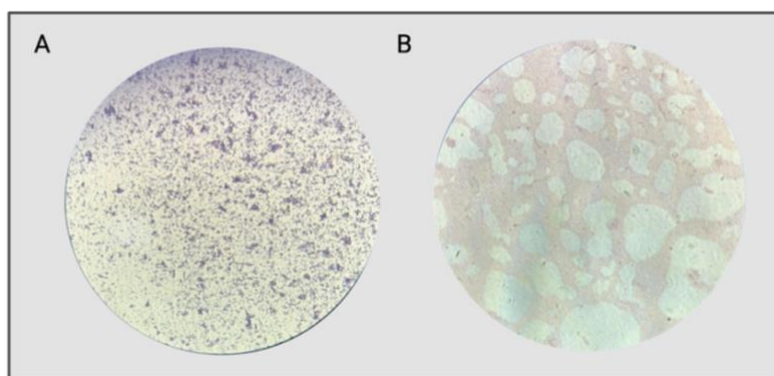


Figura 8. Tinción de gram obtenidas. *B. ginsengi* (A) mostró un resultado de bacilo gram positivo. *C. necator* (B) mostró un resultado de bacilo gram negativo. Ambos resultados coinciden con lo reportado en bibliografía.

4.2.2. Identificación molecular

En la figura 6 se observa el resultado de la corrida electroforética en gel de agarosa del producto de la PCR para las dos bacterias presuntas *C. necator*. El material genético amplificado en la PCR fue el gen 16s, que presenta un tamaño molecular de alrededor de 1500pb. Dicho esto, para este ensayo se esperaba visualizar una banda única y marcada a la altura de 1500pb correspondiente al gen amplificado, de mayor intensidad para las muestras puras, disminuyendo hacia las muestras más diluidas.

El marcador molecular reveló bandas claras y concisas que permiten correlacionar adecuadamente el mismo con el tamaño del material genético de las muestras. Los carriles correspondientes al producto de la PCR mostraron un resultado esperado. Se logró ver para ambas bacterias a las diferentes concentraciones una banda marcada y clara a 1500 pb, aunque también se vio una banda tenue a la altura de 3000 pb, junto con un leve barrido entre las dos bandas. Este resultado puede atribuirse a la elección de las condiciones de ciclado. Haciendo énfasis en la temperatura de aniling, puede que el tiempo o la temperatura no fueron los debidos y esto causara que los cebadores no se unieran correctamente, dando lugar a que el primer no se una con la especificidad adecuada. Por otro lado, no se vio una relación clara entre la intensidad de la banda del gen 16s y las diluciones de las muestras. Esto sugiere que la cantidad de ADN obtenida producto de la extracción fue muy alta.

Este ensayo se llevó a cabo para corroborar que la PCR amplificó correctamente. Dado que se evidenció la banda de interés, la muestra se mandó a secuenciar. Como resultado se obtuvo que el ADN corresponde a *B.ginsengi*.

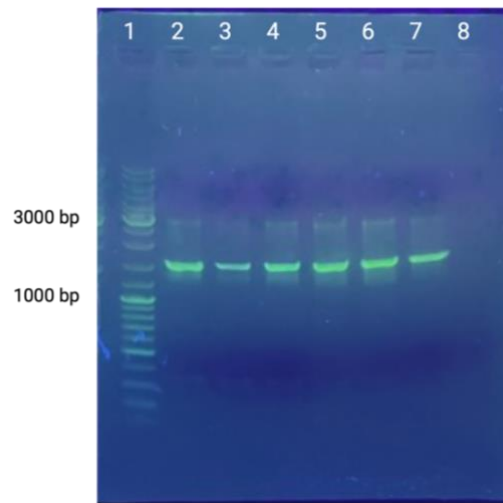


Figura 9. Gel de agarosa al 1% para el fragmento de 16S. Los carriles corresponden a:
1) Ladder. 2) Bacteria 1 sin diluir. 3) Bacteria 1 dilución 1:5. 4) Bacteria 1 dilución 1:10.
5) Bacteria 2 sin diluir. 6) Bacteria 2 dilución 1:5. 7) Bacteria 2 dilución 1:10. 8) Control
negativo.corresponden

4.2.3. Análisis filogenético

El árbol filogenético se realizó a partir de las secuencias de 16S obtenidas en NCBI para cada cepa, con excepción de la bacteria *B. ginsengi*, para la cual se utilizó la secuencia de la región obtenida en la secuenciación realizada. Se decidió analizar las secuencias 16S ya que la misma es vastamente utilizada y estudiada para identificación bacteriana, debido a que se encuentra altamente conservada para microorganismos del mismo género y especie, y que es altamente fiable para estudios filogenéticos (71). Los alineamientos y elaboración del árbol se realizaron con el *software* MEGA 11 de acuerdo a lo mencionado en metodología (60).

Para el árbol obtenido, en el caso de *C. necator*, se puede observar que la cepa que se utilizó en el presente trabajo está agrupada con las demás cepas de *C. necator* y *Cupriavidus sp.* Este resultado obtenido es coherente de acuerdo a lo esperado, ya que además de pertenecer al mismo género y especie, como se mencionó en la introducción, todas las cepas de la bacteria mencionada están reportadas bibliográficamente que poseen los genes *pha*, siendo productoras de PHB. Además, se observa que la agrupación correspondiente a *Cupriavidus* se encuentra

separada tanto a la agrupación de *Bhargavaea* y las bacterias del filo *Actinomycetota*, como del grupo externo correspondiente a *E. coli*.

Las agrupaciones obtenidas también son congruentes debido a que los microorganismos pertenecientes al género *Bhargavaea* se encuentran agrupados entre sí. Además, dentro de esta diferenciación se encuentran dos bacterias del género *Bacillus*, lo cual era parte de los resultados esperables debido a la cercana relación filogenética entre ambos grupos. Agregando a lo anterior, se reporta bibliográficamente por Verma *et al.* (2012) (42) el cambio de género de *Bacillus* a *Bhargavaea* para las especies *B. ginsengi* y *B. beijingensis*, donde se demuestra en el mismo estudio la cercana relación entre el género *Bhargavaea* y ciertas especies encontradas dentro de *Bacillus*. Por otro lado, se observa también que el grupo mencionado presenta una cercanía con los microorganismos *Caryophanon latum*, *Jeotgalibacillus Soli* y *Planomicrobium sp.*. Esto se debe a que, como se citó en la introducción, estas bacterias corresponden a la familia *Planococcaceae*, al igual que *Bhargavaea*.

Con respecto al grupo del filo *Actinomycetota*, se observa que, si bien en la división inicial se encuentra agrupado más cercanamente al filo *Planococcaceae*, en la segunda división se separa ya en otra rama del primer filo mencionado. Esto se debe que junto al filo que pertenece *Bhargavaea* son parte del grupo de las Posibacterias, por lo que la cercanía entre ambos filios es mayor en comparación al género de *Cupriavidus*. A partir de todo lo mencionado, se observa que el árbol obtenido es coherente con la información bibliográfica disponible. Además, para ambas bacterias estudiadas en este trabajo se analizó satisfactoriamente su cercanía no solo con su género correspondiente, sino también con otras bacterias con las que comparten filogenia que están reportadas como productoras de PHB. Esto es especialmente importante para *B.ginsengi*, ya que al no encontrarse información bibliográfica sobre si es capaz de formar gránulos del biopolímero, fue posible analizar su cercanía y relación filogenética con microorganismos productores.

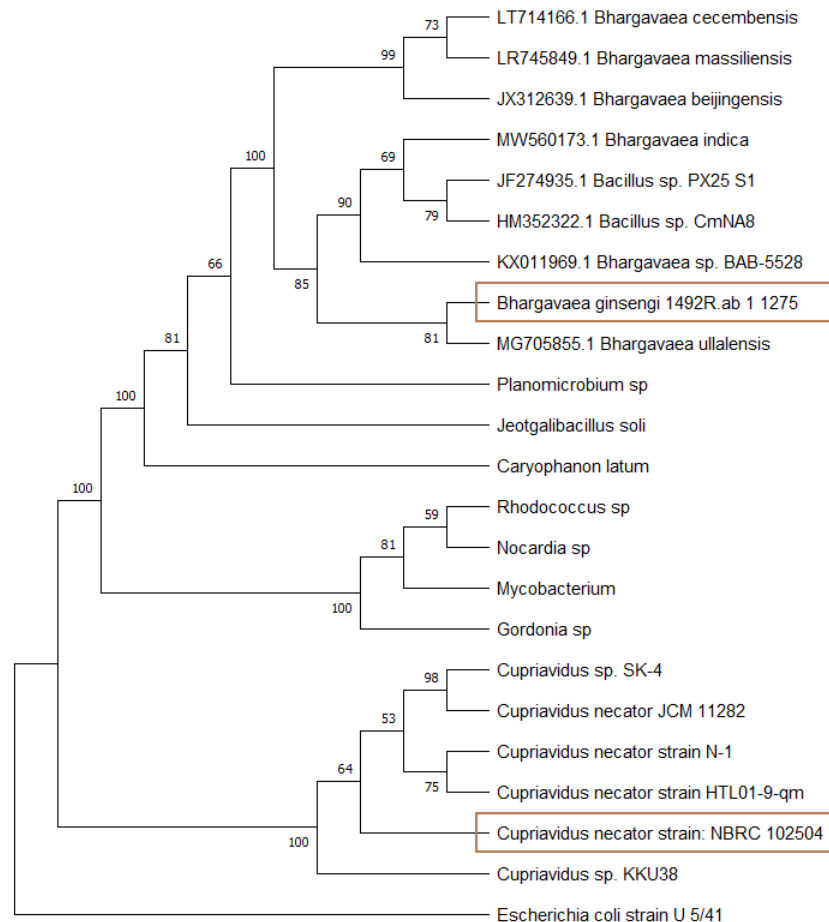


Figura 10. Árbol filogenético obtenido para el fragmento de 16S para *B. ginsengi* y *C. necator*. Se utilizó *E. coli* como grupo externo. Los microorganismos enmarcados son los utilizados en este trabajo. Los valores observados en las ramas corresponden al valor dado por el test de *Bootstrap*.

Por otra parte, se considera necesario también analizar la fiabilidad del árbol construido. Para esto se utilizó el método de *Bootstrap* y se estudió el índice de consistencia obtenido. En primer lugar, el *test* de *Bootstrap* proporciona la consistencia interna obtenida para cada rama, para lo cual se analizan 100 alineamientos con distintas modificaciones con el propósito de que se obtenga la misma división en cada una, lográndose un árbol consenso. En este árbol consenso se muestra un valor en cada división, que corresponde a la cantidad de veces dentro de las 100 analizadas que se obtuvo la misma rama, donde mientras más cercano a 100 sea el valor, más confiable es la rama obtenida (72). Como criterio general observado en bibliografía, los nodos con valores menores a 50 no se consideran para la construcción del árbol (72). En el árbol obtenido, todos los nodos presentan un valor mayor a 50. Por otro lado, el índice de consistencia obtenido para el árbol es de 0,766. Este índice se calcula teniendo en cuenta el número mínimo

de pasos del árbol, y se divide por el número mínimo de pasos que se requiere cuando no hay homoplasia (73). Se considera que para valores menores a 0,5 la homoplasia presente es significativa, por lo que el árbol no es de calidad (74).

A partir de los valores obtenidos de Bootstrap y del índice de consistencia, se considera que el árbol presenta una calidad satisfactoria y se puede confirmar la identidad de los dos microorganismos de interés. Se plantea como una perspectiva a futuro el estudio filogenético a partir de la región *pha*, la cual como se menciona en la introducción corresponde a los genes encargados de la síntesis de PHB, ya que se considera que de esta forma es posible analizar una relación más enfocada a la producción de interés.

4.2.4. Screening con Sudán Black B

La siguiente imagen, la figura 11, muestra las placas producto del ensayo de screening con Sudán Black B. La placa A es el resultado del crecimiento de *B. ginsengi* en medio YEM suplementado con 40 g/L de orujo. En la misma se pueden apreciar colonias de coloración azul oscuro, dando un resultado positivo para la producción de acúmulos lipídicos neutros. Este resultado fue de gran relevancia ya que, como se mencionó en introducción, para *B. ginsengi* no existen referencias bibliográficas de que produzca el biopolímero. El crecimiento de *C. necator* en medio YEM con 20 g/L de orujo se puede ver en la placa B. Al igual que en la anterior, se evidencia un color azul oscuro en las colonias, revelando un resultado positivo para producción de acúmulos lipídicos. Por otro lado, en la placa C se puede ver *E.coli* cultivada en medio YEM con 20 g/L de orujo. Como se esperaba, esta placa no presentó coloración, indicando un resultado negativo para producción de acúmulos lipídicos. Aunque la tinción realizada no es lo suficientemente específica para garantizar la presencia de PHB, la detección de lípidos en la biomasa es un indicio para esto.

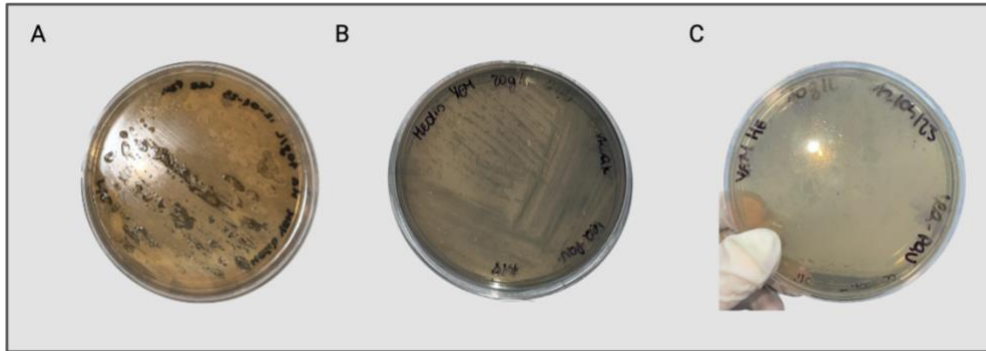


Figura 11. Crecimiento bacteriano y tinción de Sudan Black B. La placa A corresponde a *B. ginsengi*. La placa B corresponde a *C. necator*. La placa C corresponde a *E. coli*, se realizó como control negativo. Se creció las bacterias en medio YEM y la coloración azul se debe a la tinción Sudan Black B, donde se esperan ver colonias azul oscuro si se produce PHB.

4.2.5. Producto obtenido de la extracción

Tras realizar el protocolo de extracción de PHB, se obtuvo un pellet de características visuales similares a las del biopolímero. Luego del paso de agregado de metanol se comienza a ver un precipitado blanco. Una vez que la sustancia se evapora, se obtiene en sólido seco, como se aprecia en anexos.

Para finalizar esta sección de resultados, se proponen dos perspectivas a futuro con el objetivo de mejorar la identificación de los microorganismos productores. En primer lugar, se propone una identificación molecular para *B. ginsengi* del cluster de genes *pha*, ya que como se menciona en la introducción, estos se encuentran conservados en las bacterias con capacidad de producir el bioplástico y se podría obtener más información sobre el mecanismo de producción de PHB de la bacteria mencionada. Por último, se plantea la utilización de tinción por *Nile Red* o *Nile Blue* para observar por microscopía de fluorescencia los gránulos lipídicos de los microorganismos.

4.3. Parámetros fisicoquímicos y condiciones de cultivo

4.3.1. Concentración de sustrato inicial

Pasado el periodo de incubación de las placas, se evaluó el crecimiento en medio YEM suplementado con diferentes concentraciones de orujo para ambas bacterias. Además, se analizó simultáneamente la coloración azul oscura obtenida a partir de la tinción realizada con Sudan Black B. En primer lugar, para el caso de *B. ginsensi* las placas obtenidas para 10 g/L, 20 g/L y 40 g/L de sustrato se pueden observar en la figura 12. A pesar de que el lavado con etanol realizado durante la tinción levantó cierta proporción de las colonias en la placa, se observó un mayor crecimiento de la bacteria y una coloración azul más intensa en la condición de 40 g/L. En el caso contrario, para las dos condiciones más bajas la mayor diferencia fue la tonalidad presentada al realizar la tinción, siendo en ambas no tan brillante. Debido a lo mencionado, se decidió utilizar 40 g/L para los cultivos tanto líquidos como en placa que se realizaron posteriormente.

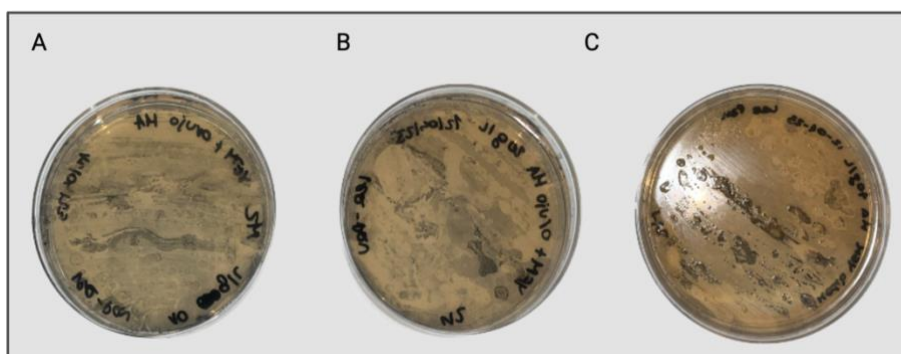


Figura 12. Crecimiento de *B. ginsensi* en medio YEM con distintas concentraciones iniciales de sustrato. A) 10 g/L de hidrolizado de orujo inicial. B) 20 g/L de hidrolizado de orujo inicial. C) 40 g/L de hidrolizado de orujo inicial. La coloración azul oscuro se debe a la tinción realizada por Sudan Black B.

Por otro lado, para el ensayo realizado con *C. necator*, se observó un crecimiento mayor para la condición de 20 g/L de sustrato inicial. Si bien se contempló un crecimiento mayor a lo esperado para 10 g/L, fue el caso contrario para la condición de más concentración. Con respecto a la coloración obtenida por el Sudan Black B, se notó un tono azul más oscuro tanto para las condiciones de 20 g/L y 40 g/L. Teniendo en cuenta el crecimiento y la coloración azul oscuro lograda, se decidió utilizar 20 g/L de hidrolizado de orujo inicial para los cultivos de *C.*

necator. El valor obtenido es coherente a lo reportado en bibliografía para la producción de PHB utilizando como fuente de carbono el hidrolizado de orujo de uva, y *C. necator* como microorganismo productor. En el trabajo realizado por Kovalcik *et al.* 2020 (75) se reporta la utilización de concentraciones de 20 a 50 g/L de hidrolizado, específicamente siendo 20 g/L la seleccionada para *C. necator*.

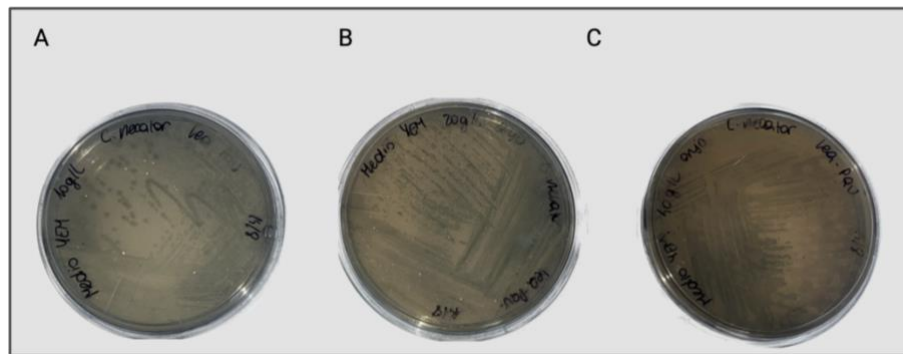


Figura 13. Crecimiento de *C. necator* en medio YEM con distintas concentraciones iniciales de sustrato. A) 10 g/L de hidrolizado de orujo inicial. B) 20 g/L de hidrolizado de orujo inicial. C) 40 g/L de hidrolizado de orujo inicial. La coloración azul oscuro se debe a la tinción realizada por Sudan Black B.

Este ensayo se realizó con el propósito de lograr adquirir un conocimiento inicial de la concentración de sustrato necesaria para cada microorganismo, para llevar a cabo ensayos posteriores donde se evalúan otras variables y parámetros del crecimiento de las bacterias. Se seleccionó una metodología cualitativa debido principalmente a reducir el tiempo del análisis. En el caso que en un futuro se desee evaluar más en detalle, o de forma cuantitativa la concentración óptima de sustrato inicial se puede plantear un ensayo de recuento en placa, o, por otro lado, realizar cultivos líquidos para cada condición estudiada y medir el OD_{600nm} de estos.

4.3.2. Temperatura y agitación óptima

Dos parámetros muy importantes al realizar una producción mediante fermentaciones líquidas son la temperatura y la agitación a la que se realiza la misma. Más específicamente, y como se mencionó anteriormente, no se cuenta con información bibliográfica sobre la utilización de *B. ginsengi* en cultivos líquidos para producción. Debido a esto, se analizó tanto la temperatura como la agitación óptima de la bacteria. En primer lugar, en relación con la temperatura, se observó que el crecimiento del microorganismo fue mayor a los 30°C, siendo coherente a lo

establecido por DSMZ para la cepa utilizada (64). Para las dos otras temperaturas analizadas, 25°C y 37°C, se obtuvo valores de OD_{600nm} menores en comparación con 30°C.

En la curva de crecimiento obtenida para la condición óptima mencionada, se observa una fase lag reducida en el tiempo, empezando a la hora 4 la fase de crecimiento exponencial. Respecto a la finalización de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria, debido a los horarios de apertura del laboratorio de biotecnología ORT, no se pudo detectar la hora exacta en la que sucedería lo mencionado. Sin embargo, a partir del análisis realizado de la curva obtenida por el ajuste de Gompertz, la fase estacionaria comenzaría alrededor de la hora 15. Considerando que el PHB es un metabolito secundario, el cual se sintetiza durante la fase estacionaria de su crecimiento, se considera positiva la mayor duración de esta fase frente a la fase de crecimiento exponencial, ya que maximiza la duración de la etapa de producción. En el caso contrario, para la curva obtenida a 37°C, en conjunto con el bajo crecimiento obtenido para *B. ginsengi*, no se observa un inicio definido de la fase estacionaria, resultando en que esta sea una condición pobre para la formación de nuestro producto de interés.

A partir de todo lo mencionado, se concluye que, si bien la temperatura de crecimiento estaba reportada, pudimos corroborar que esta temperatura óptima de 30°C se mantiene para cultivos líquidos para producción, utilizando el medio YEM. Además, se confirmó la diferencia de crecimiento bacteriano que se presenta al realizar las fermentaciones por debajo o por encima de la temperatura óptima para el caso de *B. ginsengi*.

Por otra parte, a partir de las curvas de crecimiento obtenidas para la comparación de diferentes agitaciones, se observó que la condición óptima para *B. ginsengi* se obtiene con 200 rpm. De igual forma, en el cultivo de 150 rpm, al igual que en la de mayor agitación, no se detecta una fase lag larga y la fase exponencial culmina aproximadamente a la misma hora en ambas condiciones, dando inicio a la fase estacionaria. Sin embargo, se observa que el crecimiento bacteriano a 200 rpm es mayor llegando a valores de OD_{600nm} más elevados. Por el contrario, en la condición de menor agitación, a 100 rpm, si bien tampoco se observa una fase lag, la fase exponencial posee una duración de dos horas, alcanzado un bajo OD_{600nm}, y por lo tanto un bajo crecimiento del microorganismo. Lo mencionado se puede deber a que, al haber menos agitación, no se logra que los diversos nutrientes y el O₂ disuelto en el medio estén disponibles homogéneamente, ocasionando que la bacteria no consiga un crecimiento adecuado. Debido a

lo mencionado, se decidió continuar utilizando 200 rpm para la agitación en los cultivos líquidos de *B. ginsengi*.

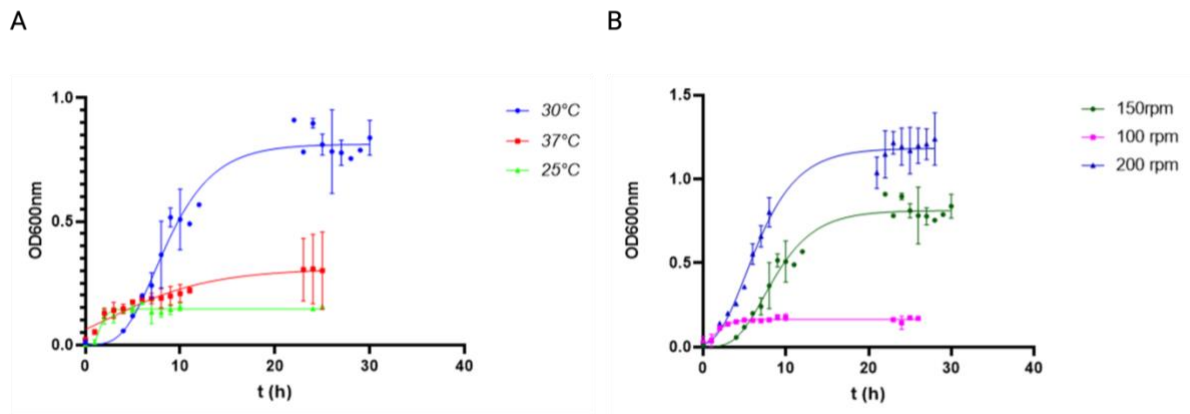


Figura 14. Curvas de crecimiento de *B. ginsengi*. A) Curvas obtenidas para las condiciones de 25°C, 30°C y 37°C a 150 rpm. B) Curvas obtenidas para las condiciones de 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm a 30°C. Se realizaron en medio YEM suplementado con 40 g/L de hidrolizado de orujo.

Con respecto a *C. necator*, como se mencionó anteriormente, se cuenta con vasta información bibliográfica sobre su uso para fermentaciones líquidas, por lo que se decidió no analizar su temperatura óptima de crecimiento. Sin embargo, los datos utilizados sobre agitación eran diversos en los recursos bibliográficos. Para la misma cepa utilizada en este trabajo, para los ensayos realizados por Haas *et al.* 2015 (40). y Nygaard *et al.* 2019 (76) se utilizó una agitación de 150 rpm para la producción de PHB, mientras que en el estudio de Baei *et al.* 2009 (77) se analizó que la agitación óptima para el cultivo era 250 rpm. A partir de esta información, se decidió realizar curvas de crecimiento del microorganismo con agitaciones de 150, 200 y 250 rpm respectivamente. Como se puede observar en la figura 15, la condición con la que se alcanzó un mayor valor de OD_{600nm} corresponde al cultivo de 200 rpm. En caso contrario, se obtuvo un crecimiento menor y similares entre sí para las otras dos condiciones. Por un lado, debido a que la fuente de carbono utilizada en el medio proviene del hidrolizado de orujo, siendo menos pura que una fuente de carbono de laboratorio puede ser posible que con 150 rpm no se logre distribuir este nutriente, ni una aireación adecuada, a toda la biomasa de forma homogénea, frenando su crecimiento. Por otra parte, dado que el medio utilizado está diseñado para estresar a la bacteria con el objetivo de la producción de PHB, la agitación a 250 rpm puede contribuir a maximizar el estrés del microorganismo, afectando el crecimiento de este.

Tomando en cuenta todo lo mencionado, se decidió utilizar una agitación de 200 rpm para las fermentaciones líquidas de *C. necator*.

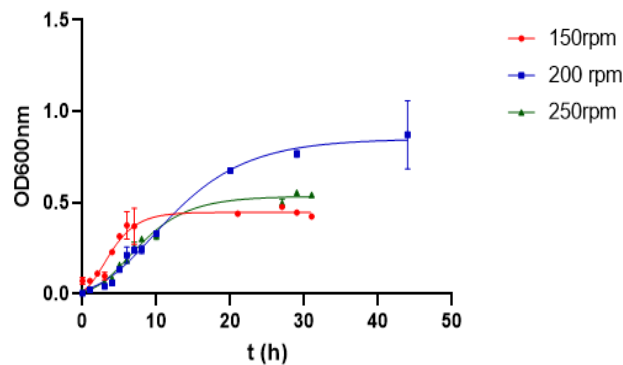


Figura 15. Curvas de crecimiento para *C. necator* correspondientes a las condiciones de 150 rpm, 200 rpm y 250 rpm a 30°C. Se realizaron en medio YEM suplementado con 40 g/L de hidrolizado de orujo.

Como se puede observar en la curva de crecimiento de *C. necator* a 200 rpm, el OD_{600nm} alcanzado fue menor al esperado, ocasionando un bajo crecimiento del microorganismo. Debido a esto se decidió evaluar la concentración de sustrato inicial en cultivos líquidos con 20 g/L y 40 g/L de hidrolizado de orujo inicial respectivamente. A partir de los resultados obtenidos, representados en la figura 16, se tomó en consideración que, si bien en la curva obtenida con la mayor concentración de sustrato inicial se obtiene una menor fase lag y la fase estacionaria comienza aproximadamente 5 horas antes, los valores de OD_{600nm} a los que se llega para ambas condiciones en fase estacionaria son muy similares. Si bien esto podría afectar a la producción de PHB, es necesario tomar en cuenta la aplicación industrial que presenta este trabajo en un futuro. A partir de esto, se decidió seguir utilizando la condición inicial de 20 g/L, al considerarse que la diferencia de horas en las que se llega a la fase estacionaria no tendría un impacto importante en la producción. Además, la utilización del doble de sustrato inicial para la formación de PHB ocasionaría un aprovechamiento menor del residuo de orujo en el proceso planteado.

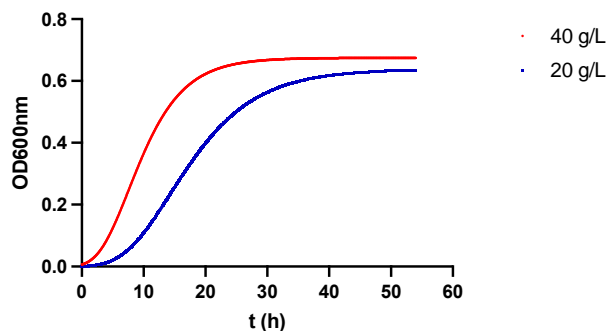


Figura 16. Curvas de crecimiento de *C. necator* para condición de sustrato inicial de 20 g/L y 40 g/L de hidrolizado de orujo en medio YEM.

A modo de perspectivas a futuro, se plantea en primera instancia un mayor análisis para la determinación de la concentración de sustrato inicial. Esto podría realizarse utilizando un medio de cultivo con concentraciones de una azúcar definidas, para establecer efectivamente la concentración óptima y realizar el cálculo de cuánto hidrolizado de orujo se precisa para llegar a la concentración óptima. Por otro lado, se propone realizar un seguimiento del pH del medio de cultivo, debido a que este parámetro fisicoquímico es sumamente importante para el estrés celular, y puede afectar tanto positiva como negativamente la producción de PHB. Por último, se propone inocular el medio de cultivo en la misma fase de crecimiento del pre-inóculo, como forma de optimizar el crecimiento del microorganismo.

4.4. Evaluación del proceso

4.4.1. Producción en formato un paso batch con crecimiento

A partir de las muestras tomadas a los diferentes tiempos de la fermentación con *B. ginsengi*, se logró obtener una curva de crecimiento bacteriano y otra de formación de producto. En primer lugar, la curva correspondiente a la biomasa presenta características similares a la observada en el apartado anterior, incluyendo la ausencia de fase lag y el final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria alrededor de la hora 15. Con relación a la curva obtenida para la producción de PHB, esta presenta una fase de latencia hasta aproximadamente la hora 22, mientras que se percibe un aumento importante en la concentración del producto a partir de la hora 30. Se puede observar que la etapa de máxima producción ocurre durante la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo, como era esperado. Además, se pudo corroborar que la formación de PHB, al ser este un metabolito secundario, corresponde a una producción no asociada al crecimiento. Mientras la biomasa se estanca, se observa la fase de

mayor producción, lo que ocurre entre la hora 22 y la hora 54, observándose una desaceleración en la formación de producto a la hora 46. Por otro lado, como se puede observar en la imagen B de la figura 17, el cultivo se realizó en su totalidad hasta la hora 147, con el propósito de observar cómo se comportaba la formación de producto en un mayor periodo de tiempo. En esta última hora se observa una disminución en la concentración de PHB, lo cual se puede deber a que el sustrato puede haberse consumido en su totalidad y la bacteria *B. ginsengi* haya utilizado el PHB como fuente de carbono. Sin embargo, no fue posible evaluar la concentración de PHB entre la hora 54 y la hora 147, por lo que se propone como una perspectiva a futuro analizar la formación de producto durante estos tiempos. A partir de los datos obtenidos, se decide utilizar el valor de concentración de PHB correspondiente a la hora 54 para analizar los parámetros de producción, ya que es cuando se obtuvo la mayor concentración del biopolímero. Además, si se tiene en cuenta la posible aplicación industrial, un menor tiempo de cultivo puede tener un impacto positivo en el costo del proceso

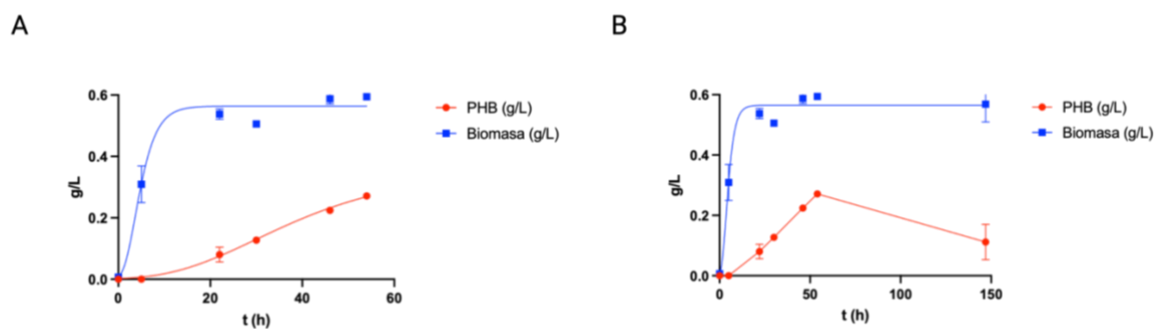


Figura 17. Curva de crecimiento y de formación de producto obtenidas para *B. ginsengi* a 30°C y 200 rpm. Se realizaron en medio YEM suplementado con 40 g/L de hidrolizado de orujo por una duración de 54 y 147 horas respectivamente.

A continuación, se evaluó la formación de producto junto al crecimiento bacterio para *C. necator*. Para el cultivo de este microorganismo también se analizó el crecimiento y producción de PHB del mismo hasta la hora 147. Sin embargo, al igual que lo observado para *B. ginsengi*, la concentración del producto disminuyó en comparación a la muestra anterior, que en este caso corresponde a la hora 72. Como se mencionó anteriormente, esto se puede deber a la utilización del PHB como fuente de carbono al consumirse el sustrato disponible en el medio. Adicionalmente, se considera que evaluar en un futuro la formación del biopolímero entre las horas 72 y 147 puede ser informativo para seguir analizando la producción, con el propósito de

estudiar si la concentración de PHB aumenta en ese periodo de tiempo. Se toma en cuenta la hora 72 como el tiempo total de cultivo para el cálculo de parámetros y los próximos ensayos.

A pesar de que la concentración máxima de PHB se haya obtenido a esta hora, se observó que es menor en comparación con lo reportado bibliográficamente. En el ensayo realizado por Haas *et al.* 2015 (40) se obtuvo 3,5 g/L de PHB. Por otro lado, Khanna *et al.* 2005 alcanzó una concentración de 21 g/L en medio mínimo suplementado con fructosa, y Nygaard *et al.* 2019 (76) obtuvo valores de hasta 4,6 g/L en la condición óptima de cultivo. En el presente trabajo la concentración máxima obtenida corresponde a 0,15 g/L. Además, en estos ensayos se reporta la formación de producto a partir de la hora 48 en el trabajo realizado por Haas *et al.* 2015 (40) y a la hora 24 según lo logrado por Nygaard *et al.* 2019 (76). Esta diferencia se puede deber en primer lugar a la baja concentración de fructosa en el medio YEM suplementado con el hidrolizado de orujo. Mientras que en los estudios bibliográficos mencionados se utilizaron concentración de sustrato entre 14 g/L a 27 g/L (40, 76), en el ensayo realizado en este trabajo la concentración de fructosa es menor a 0,5 g/L. La baja concentración del carbohidrato presente en el medio se puede deber a que la hidrólisis realizada no sea lo suficientemente eficiente. De igual forma, se plantea el uso de la metodología *resting cells* para obtener mayor cantidad del biopolímero a partir del hidrolizado de orujo. Por otro lado, otro factor que puede afectar en la baja concentración de PHB obtenida es el medio utilizado. Como se menciona en metodología, se usa el medio YEM, el cual se utiliza en ensayos de producción del bioplástico debido a que ocasiona limitación de nitrógeno, necesaria para la producción de PHB (13). Sin embargo, la concentración de nitrógeno utilizada puede no haber sido la óptima para la cepa, ya que si se encontrara mayor concentración de este elemento en el medio se limita la formación del producto, mientras que concentraciones muy bajas limitan el crecimiento de la bacteria. En la bibliografía se encuentran ensayos en los cuáles se utilizan otros elementos limitantes para la producción del biopolímero, como son el fósforo y el O₂ disuelto. Con el fin de analizar en un futuro la optimización del medio, puede ser una posibilidad estudiar la limitación de nitrógeno, fósforo y O₂ para alcanzar la condición óptima de producción (76).

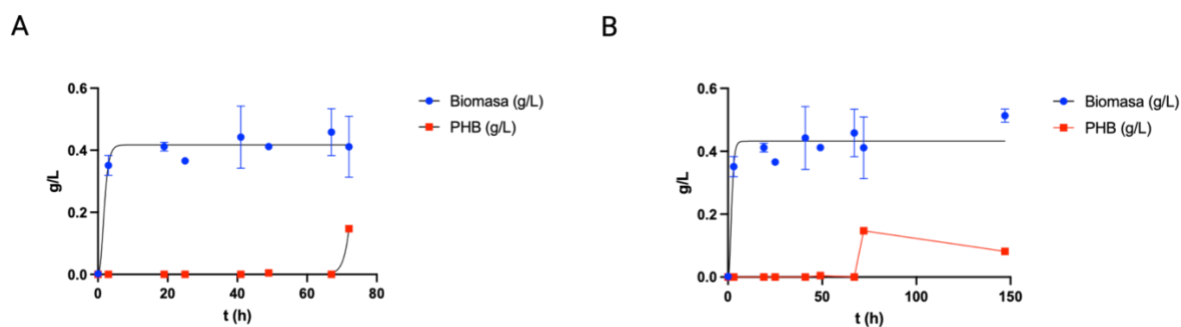


Figura 18. Curva de crecimiento y de formación de producto obtenidas para *C. necator* a 30°C y 200 rpm. Se realizaron en medio YEM suplementado con 20 g/L de hidrolizado de orujo por una duración de 72 y 147 horas respectivamente.

Además, se calculó diversos parámetros de la producción de *B. ginsengi* y *C. necator* respectivamente, como son el rendimiento de la formación de producto según el crecimiento bacteriano, la productividad volumétrica global de la biomasa y la productividad volumétrica de la formación de producto, los cuales se pueden observar en las tablas 5 y 6. El primer parámetro mencionado hace referencia a la cantidad de producto obtenida según la cantidad de biomasa generada. En el caso del presente ensayo se observa que para *B. ginsengi*, el 45,7% de la biomasa microbiana equivale a PHB producido, mientras que para *C. necator* este valor equivale a 30,6%. Si bien $Y_{p/x}$ presenta una idea de la eficiencia del proceso, un parámetro muy importante para lo mismo es $Y_{p/s}$, el rendimiento de formación de producto según el sustrato consumido. Esto se debe a que este valor indica cuánto del sustrato consumido efectivamente pudo ser utilizado para la producción de PHB. Sin embargo, no fue posible determinar el consumo de sustrato, ya que las concentraciones de azúcares en el medio se encontraban por debajo del límite de detección para los métodos utilizados, lo cual se discute más adelante.

En cuanto a las productividades volumétricas tanto de biomasa como de producto, refieren a la formación de cada uno según el volumen y tiempo de cultivo. Para *B. ginsengi* se puede observar en la tabla 5 que ambas productividades son iguales. Por otra parte, con respecto a las productividades obtenidas para *C. necator*, los valores obtenidos son menores a lo esperado, según lo observado en bibliografía. Haas *et al.* 2015 (40) obtuvo una productividad volumétrica de 0,016 g/L.h para la misma cepa utilizado en este trabajo y Nygaard *et al.* 2019 (76) logró un valor de 0,06 g/L.h. El valor obtenido para Q_p en este trabajo es coherente con la

concentración baja de PHB alcanzada. Como se discutió anteriormente para la formación de producto, realizando el cultivo en un medio con mayor concentración de fructosa o analizando la limitación de nutrientes o de O₂ disuelto, puede ser posible mejorar la productividad volumétrica para el PHB. Por último, en cuanto a la productividad volumétrica de la biomasa, para ambos microorganismos los bajos valores son congruentes con los valores de OD_{600nm} mencionados en la sección anterior.

Tabla 5. Parámetros de crecimiento y de producción obtenidos para *B. ginsengi*.

	Y p/x	Qx (g/L.h)	Qp (g/L.h)
	0,4567	0,0053	0,0050

Tabla 6. Parámetros de crecimiento y de producción obtenidos para *C. necator*.

	Y p/x	Qx (g/L.h)	Qp (g/L.h)
	0,3063	0,0008	0,0020

En cuanto al consumo de sustrato, se observó que las concentraciones de azúcares fermentables se encontraban por debajo del límite de detección del DNS y por debajo de la curva de calibración para glucosa y fructosa del HPLC. No obstante, los cromatogramas obtenidos aportan información relevante, aunque no permitan cuantificar el consumo. En primer lugar, los cromatogramas A y B de la figura 19 corresponden al tiempo inicial y a la hora 72 del cultivo de *C. necator*. En los mismos se da una disminución del área del pico correspondiente a la fructosa, mientras que para el pico correspondiente a la glucosa no se observa ningún cambio. Lo observado es coherente con lo reportado por Haas *et al.* 2015 (40), donde se menciona que, en el cultivo realizado, la cepa *C. necator* DSM 531 consume a tiempo final un 35% de la fructosa disponible y no se consume la glucosa del medio. Acerca de los cromatogramas obtenidos para el cultivo de *B. ginsengi*, se observa en la figura C, correspondiente al tiempo 0, los picos de glucosa y fructosa. Sin embargo, a la hora 22 (figura D), se puede contemplar que el pico de la fructosa desaparece por completo. Si bien no hay literatura bibliográfica en donde se reporte la preferencia de esta bacteria por algún azúcar en específico, lo observado en los cromatogramas indican una clara preferencia por parte de *B. ginsengi* hacia la fructosa. Con respecto al pico de la glucosa, se observa en la figura E, la cual

corresponde a la hora 54 del cultivo, una breve disminución del área, lo cual indica que la glucosa es consumida una vez que no se encuentra fructosa disponible

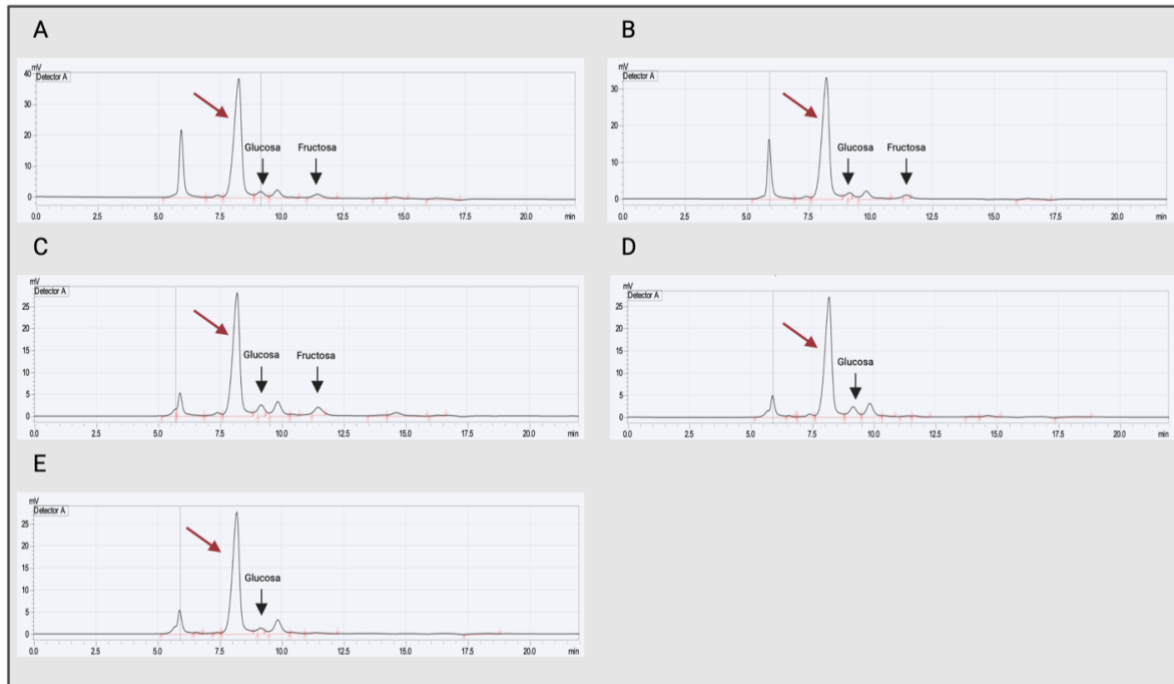


Figura 19. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC para las muestras de consumo de sustrato tomadas durante el crecimiento de *B. ginsengi* y *C. necator*. Se indica los picos de glucosa y fructosa en sus respectivos tiempos de retención. Se indica en rojo un pico correspondiente a una interferencia. A) Muestra tomada para *C. necator* a tiempo 0. B) Muestra tomada para *C. necator* a la hora 76. C) Muestra tomada para *B. ginsengi* a tiempo 0. D) Muestra tomada para *B. ginsengi* a la hora 22. E) Muestra tomada para *B. ginsengi* a la hora 54.

Debido a que no se pudo analizar las concentraciones en el medio por DNS o HPLC, se decidió analizar el consumo de glucosa a través de la utilización de un glucómetro, el cuál posee un límite de detección de 0,1 g/L. En la tabla 7 se puede observar los valores obtenidos del consumo de glucosa para el cultivo de *C. necator*. A pesar de que el microorganismo presenta una preferencia por la fructosa, si se pudo observar una disminución de la concentración de glucosa luego de la hora 22 y otra disminución a tiempo final. La hora 22 corresponde al inicio de la fase estacionaria, según lo observado en la curva de crecimiento, por lo que la disminución de glucosa observada en este tiempo puede deberse a que se haya consumido una gran proporción de la fructosa en la fase exponencial para el crecimiento de la bacteria. Por otro lado, la disminución de la concentración a tiempo final se puede deber a que la concentración de la fructosa disponible haya disminuido considerablemente, ocasionando que se consuma

mayor concentración de glucosa. Sin embargo, se toma en consideración que el valor inicial para la concentración de glucosa es bajo, por lo que se tendría que analizar más en profundidad que los cambios observados para las concentraciones correspondientes a cada tiempo no se deban al error de las medidas.

Por último, no fue posible analizar el consumo de glucosa en el cultivo de *B. ginsengi* mediante esta metodología por motivo de los tiempos establecidos para el trabajo.

Tabla 7. Consumo de glucosa obtenidos a partir de tiras de medición para *C. necator*.

T (h)	Glucosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Promedio (g/L)	Desviación estándar
5	0,1300	0,1500	0,1400	0,0140
22	0,1400	0,1200	0,1300	0,0140
30	0,1200	0,1300	0,1250	0,0070
46	0,1200	0,100	0,1100	0,0141
54	0,1300	0,1400	0,1350	0,0070
70	0,1200	0,1300	0,1250	0,0070
77	<10	<10		

4.4.2. Comparación de crecimiento con medio nutriente

Como se presentó anteriormente en las gráficas de curvas de crecimiento del apartado 4.3.2, para ambos microorganismos se logra valores de OD_{600nm} menores a lo esperado, lo que resulta en concentraciones bajas de biomasa. Debido a esto, se decidió analizar las curvas de crecimiento obtenidas para *B. ginsengi* y *C. necator* en medio sintético. Como se puede observar en la figura 20, para ambas bacterias se logró alcanzar valores de OD_{600nm} superiores al crecimiento obtenido en el medio YEM suplementado con hidrolizado de orujo. En el caso de la curva de crecimiento de *B. ginsengi*, a diferencia de lo observado con el otro medio, en LB esta bacteria presenta una fase lag hasta aproximadamente la hora 5. Además, la fase exponencial se prolonga hasta la hora 25, a diferencia del crecimiento en medio YEM donde esta fase culmina a la hora 15. Por otro lado, para *C. necator* se observan duraciones similares de cada fase en relación con su crecimiento en medio YEM. Sin embargo, mientras que en LB esta bacteria logra un OD_{600nm} superior a 3, en medio YEM el valor máximo obtenido es de 0,7.

Estos resultados se pueden deber a que haya una concentración inicial baja de azúcares en el medio YEM suplementado con el orujo. A partir del valor inicial de glucosa y fructosa obtenidos por el ensayo de HPLC, se obtuvo que el valor para el medio suplementado con 40 g/L de hidrolizado es de 0,38 g/L, mientras que al suplementarse con 20 g/L la concentración de azúcares iniciales es de 0,19 g/L. En comparación, el medio LB utilizado posee una vasta cantidad de aminoácidos catabolizables (78), ocasionando que no haya limitante en la fuente de carbono. Esta concentración insuficiente de azúcares iniciales se puede deber a una menor eficiencia en la hidrolisis ácida de la prevista inicialmente, donde se consideró los valores obtenidos por el ensayo de DNS.

Para analizar en mayor profundidad la efectividad de la hidrolisis ácida y la hidrolisis enzimática, con el propósito de ajustar el protocolo de hidrolisis para maximizar la concentración de azúcares disponibles, se puede llevar a cabo ambas hidrolisis variando el tiempo de cada una, y midiendo la glucosa y fructosa por HPLC a su finalización. Contrariamente, si se decide seguir utilizando el mecanismo de hidrolisis ácida debido al aumento de costos que implicaría la utilización de enzimas, se puede considerar la suplementación del medio YEM no solo con el hidrolizado de orujo, pero además con glucosa o fructosa pura. Por último, se evaluó también llevar a cabo la producción de PHB mediante *resting cells*, en donde se usaría el medio sintético para el crecimiento de los microorganismos y luego se transferirían las bacterias al hidrolizado de orujo como medio de producción. De esta forma se alcanzaría una mayor cantidad de biomasa al cultivarse inicialmente en un medio con abundante fuente de carbono, pero utilizando el medio con orujo para la producción ya que contribuye al estrés necesario para la formación de producto.

En particular, se observa que el crecimiento fue aún menor para *C. necator*. Al haberse realizado anteriormente el ensayo de comparación de concentración de sustrato inicial tanto en placas como en medio líquido, se descarta que se pueda deber a la concentración de azúcares iniciales. Por otra parte, en la consulta bibliográfica realizada para la cepa utilizada en este trabajo, *Cupriavidus necator* DSM 531, se reporta que este microorganismo consume 35% de la fructosa y no consume la glucosa del medio de la fermentación de PHB (40). Lo mencionado, en conjunto con la poca concentración de ambas azúcares en el medio inicial puede explicar el poco crecimiento de este microorganismo en el medio YEM suplementado con el hidrolizado de orujo.

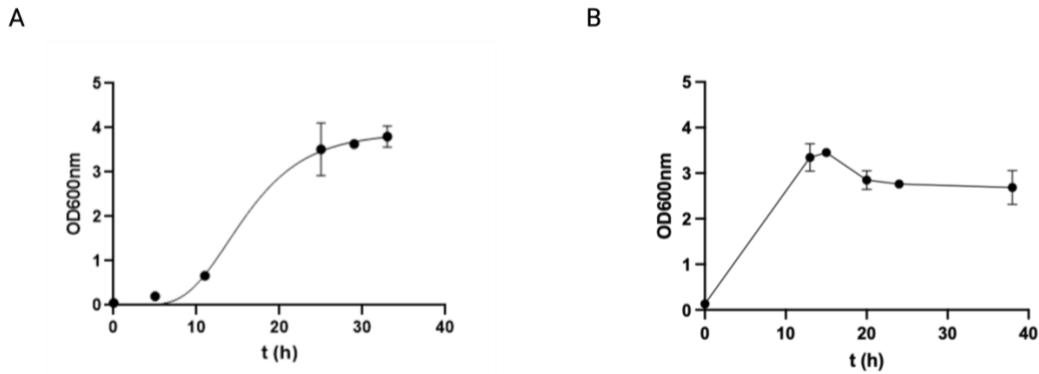


Figura 20. Curvas de crecimiento en medio LB. A) *B. ginsengi*. B) *C. necator*. La duración de estas fue de 33 y 38 horas respectivamente.

Se proponen a continuación ciertas perspectivas a futuro, con el propósito de optimizar la producción en un paso batch con crecimiento. En primera instancia, se plantea una mejora de la relación entre carbono y nitrógeno en el medio, con el objetivo de llegar a un exceso de fuente de carbono y que el nitrógeno se encuentre como sustrato limitante, a diferencia de lo observado en los resultados, donde el carbono fue el nutriente limitante. Ambas cosas son imprescindibles para mejorar la producción de PHB. A la vez, se plantea la realización del cultivo por una metodología de fed-batch, ya que se observa una posible inhibición por sustrato, lo cual causa un bajo crecimiento de la bacteria y bajo rendimiento de producción del biopolímero. Por último, se plantea una evaluación de distintas limitantes, como podrían ser la concentración de nitrógeno, de fósforo, la aireación del medio o el pH del mismo.

4.4.3. Ensayo con dos pasos batch utilizando resting cells

Debido a los bajos rendimientos y productividades obtenidas en la modalidad de producción en batch para ambas bacterias, se decidió probar la metodología de *resting cells*. Para ambos microorganismos se creció un cultivo líquido hasta llegar a un OD_{600nm} final de 1,282 para *B. ginsengi* y 0,8210 para *C. necator*. A continuación, se transfirió la biomasa al hidrolizado de orujo en las diferentes condiciones. Al no encontrarse disponible información bibliográfica sobre la utilización de esta metodología para producciones con estas bacterias, se optó por realizar tres diluciones distintas, las cuáles son sin diluir, al medio y al quinto.

En primer lugar, por gravimetría se logró medir la producción a tiempo final de PHB para *B. ginsengi*. Como se puede observar en la figura 21 se obtuvo para las tres condiciones estudiadas

valores entre 0,3 g/L y 0,4 g/L del biopolímero. Para corroborar si existía una diferencia significativa entre las condiciones, se realizó el *test* ANOVA en el programa GraphPad, en el mismo se obtuvo un valor $P > 0,05$, por lo que las diferencias entre las medias de los tres valores de producto de PHB demostró no ser significativa. A diferencia de lo mencionado, para *C. necator* no se pudo analizar la concentración obtenida de PHB debido a que en el proceso de extracción se obtuvo un producto extracelular. A partir de la búsqueda bibliográfica realizada, se constató que *C. necator* es capaz de producir exopolímeros de distintas naturalezas bajo condiciones de estrés. Ribeiro *et al.* 2016 (79) observó que *C. necator* produce un exopolisacárido, el cual está compuesto principalmente de carbohidratos y en menor concentración de aminoácidos y lípidos, bajo condiciones de estrés al ser la bacteria cultivada en glicerol crudo. A la vez, Vicentin *et al.* 2018 (80) reporta la producción de un exopolisacárido para la misma bacteria cuando se utiliza para remoción de Cadmio, Cobre y Zinc. Por el contrario, en el estudio realizado por Assis *et al.* 2016 (81) se reportó la presencia de un exopolímero compuesto de ácido glutámico mientras se producía PHA a partir de glicerol crudo. Al igual que los medios utilizados en los ensayos mencionados, el hidrolizado de orujo de uva puede causarle un estrés al microorganismo, ocasionando que se produzca el exopolímero, ya que este actúa como protección en condiciones duras de crecimiento (80).

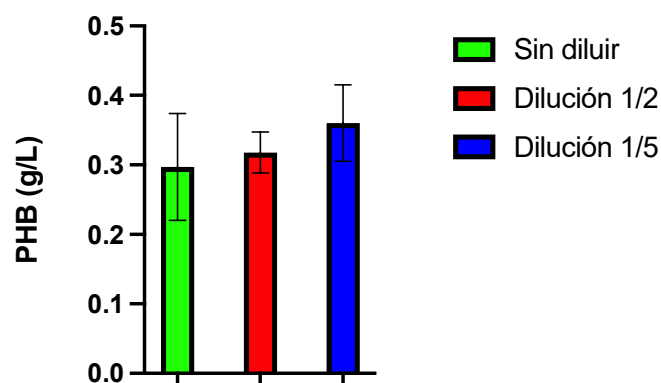


Figura 21. Concentración de PHB obtenida en *resting cells* para *B. ginsengi* en condiciones del hidrolizado sin diluir, en dilución al medio y en dilución al quinto.

Por otra parte, también se estudió los resultados de consumo de glucosa y fructosa para ambas bacterias. La figura 22 corresponde a las curvas de consumo obtenidas para *B. ginsengi* correspondiendo a las condiciones de sin diluir, dilución al medio y al quinto. Para las mismas se realizó un ajuste lineal, por lo que se logró obtener pendientes para las tres rectas realizadas. En coherencia con lo observado en las curvas, la menor pendiente obtenida corresponde a la

condición sin diluir, siendo el valor -0,004. Sin embargo, para los casos de diluciones al 1:2 y al 1:5 se obtuvo pendientes de -0,013 y -0,014 respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el hidrolizado de orujo puede considerarse un medio de producción que genera un estrés a los microorganismos, debido a los diversos compuestos que se pueden encontrar en el mismo. Por esta razón, se considera que en la condición de hidrolizado sin diluir puede haberle generado a *B. ginsengi* un estrés importante y haber inhibido la producción de PHB. En específico, se puede realizar en un plazo futuro una caracterización más detallada de los componentes del orujo utilizado en este trabajo, con el propósito de analizar que compuesto puede ser el que esté inhibiendo en mayor proporción la producción. Contrariamente, se observó una pendiente mayor para las dos diluciones realizadas, lo cual indica un mayor consumo de sustrato. Al estar presente los componentes en menor concentración en el medio se permite el mejor aprovechamiento de la glucosa y fructosa para la producción de PHB.

No obstante, si bien se consideró la suma de glucosa y fructosa para la realización de las curvas, cabe destacar el consumo diferenciado de cada azúcar. Para todas las condiciones se logró un mayor consumo de fructosa en comparación a un consumo mínimo de glucosa, siendo el de la primera azúcar mencionada entre 80% a 95% del consumo total. Estos valores indican una clara preferencia por la fructosa para *B. ginsengi*. Estos valores se encuentran en anexos.

A continuación, se analizan los balances de masa para las tres condiciones. Para esto, se toma en cuenta como masa molar de la glucosa y fructosa 180 g/mol, mientras que para el PHB se considera el valor de 100 g/mol. Cabe destacar que la masa molar del biopolímero depende de distintos factores como son las condiciones de cultivo, la fuente de carbono, la temperatura de extracción y los elementos traza del medio (82). El valor de 100 g/mol se seleccionó como un promedio a partir de rangos mencionados en reportes bibliográficos (12, 83). En primer lugar, para la producción realizada en el hidrolizado sin diluir se obtuvo que se consumían $3,66 \times 10^{-3}$ mol de azúcares, de los cuáles $3,07 \times 10^{-3}$ corresponden a fructosa, y se formaban $2,97 \times 10^{-3}$ mol de producto. Por otro lado, para la dilución 1:2 el consumo fue de $3,69 \times 10^{-3}$ mol de azúcares totales y $3,5 \times 10^{-3}$ mol para fructosa, y para producto obtenido $3,18 \times 10^{-3}$ mol. Por último, para la dilución 1:5 se consumió $3,75 \times 10^{-3}$ mol, de los cuales $3,03 \times 10^{-3}$ mol pertenecen a fructosa, y se alcanzó $3,60 \times 10^{-3}$ mol de PHB. Para los tres casos estudiados se observa que la diferencia entre la entrada de masa, definida por la concentración de azúcares, equivale a la salida, correspondiente a la formación del biopolímero. Si bien se observan mínimas diferencias entre los valores, estas se pueden deber a los errores obtenidos para la medición del producto.

Además, analizando el balance de masa solo para el consumo de fructosa, se observa no solo que esta azúcar es la más consumida, corroborando lo mencionado anteriormente, sino que también se logra establecer la relación entre el consumo de fructosa y la producción de PHB.

Los resultados obtenidos permitieron analizar que la concentración disponible de fructosa puede ser la limitante para la producción de PHB. A pesar de que no se observa un consumo total de azúcares, esto se puede deber a que el tiempo de cultivo no haya sido suficiente. Para estudiar si la concentración de azúcares alcanza a ser cero se podría intentar llevar a cabo el cultivo de *resting cells* por un periodo de tiempo más extenso. Lo mismo no fue posible de realizarse por falta de tiempo.

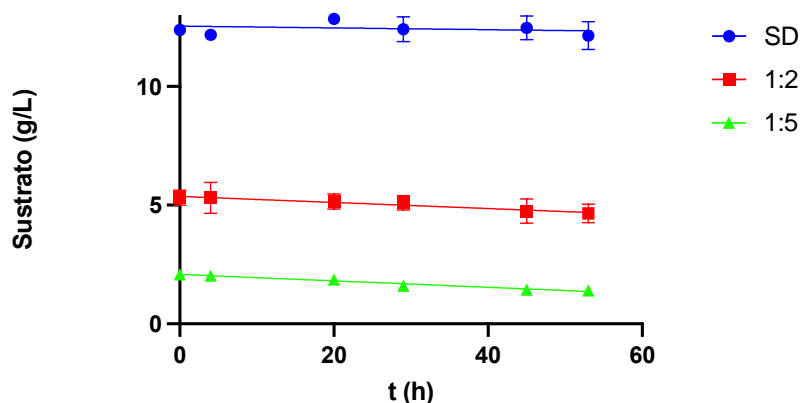


Figura 22. Curvas para el consumo de sustrato de *B. ginsengi* en resting cells para las condiciones de sin diluir, dilución al medio y dilución al quinto.

A partir de los valores obtenidos de consumo de sustrato y formación de producto, se procedió a analizar los parámetros de producción, los cuales corresponden a las productividades volumétricas de formación de producto y de consumo de sustrato, y el rendimiento de formación de producto según el consumo. Las productividades volumétricas para la formación de producto, o Q_p nos indica la cantidad de producto formado tomando en cuenta el volumen y tiempo del cultivo. En la tabla 8 se pueden observar los resultados de los mismos para las tres condiciones estudiadas en resting cells para *B. ginsengi*. A pesar de que la diferencia observada entre los tres valores es mínima, si se obtuvo una productividad ligeramente mayor para la condición más diluida. Con respecto a Q_s , también se observan mínimas diferencias entre las tres condiciones. Estos resultados indican que la concentración de azúcares disponibles en el hidrolizado de orujo no afecta la productividad del consumo en el tiempo dado. Además, la similitud entre los valores se puede deber a que los demás componentes del hidrolizado se

encuentran en menor concentración mientras mayor sea la dilución estudiada, lo cual puede ocasionar un estrés en la bacteria que no le permita consumir la fructosa disponible. Lo mencionado es coherente con que Q_p sea mayor para la dilución de 1:5. Además, en comparación con el resultado obtenido para *B. ginsengi* para producción en batch, se observa un ligero aumento en la Q_p lograda. Adicionalmente, puede ser una buena opción evaluar en un futuro si aumenta tanto la concentración de PHB como los parámetros obtenidos al realizar el cultivo de *resting cells* durante un periodo de tiempo mayor.

Por otro lado, el coeficiente de rendimiento de formación de producto según el consumo de sustrato es un parámetro utilizado para medir la eficiencia del proceso. En este caso, se evalúa la producción de PHB según el consumo de fructosa y glucosa, utilizando los valores de concentración en g/L. Como se puede observar en la tabla 8, si bien los valores obtenidos son similares entre las tres condiciones, el rendimiento correspondiente a la dilución 1:5 es ligeramente superior. Este resultado es coherente con lo obtenido y analizado para las productividades, ya que al ser el medio de producción más diluido disminuye la concentración de compuestos inhibitorios. Con respecto al uso de la concentración para el cálculo del rendimiento, se decidió no utilizar los datos en moles mencionados para los balances de masa por el margen de error que pueden presentar los mismos. Sin embargo, cabe destacar que debido a que el PHB se obtiene a través de numerosos pasos de reacciones enzimáticas, el peso de los azúcares consumidos y el producto formado no tiene por qué mantenerse constante, mientras que los moles si se mantienen.

Tabla 8. Parámetros de producción obtenidos para *B. ginsengi* en las condiciones SD, 1:2 y 1:5 de *resting cells*.

	Q_p (g/L.h)	Q_s (g/L.h)	Y p/s
SD	0,0056	0,0124	0,4515
1:2	0,0060	0,0126	0,4779
1:5	0,0068	0,0127	0,5339

A pesar de que no fue posible medir el PHB para *C. necator* debido a la presencia del exopolímero, se analizó el consumo de sustrato para las tres diluciones estudiadas. Para las curvas obtenidas se utilizó el ajuste “*Sigmoidal, 4PL, X is concentration*”. En primer lugar, para la condición sin diluir se observó una bajada en la concentración de azúcares inicial, donde luego se estabilizó. Por otro lado, para los primeros tiempos pertenecientes a las curvas de las

diluciones al 1:2 y 1:5 no se observa una disminución importante de la concentración de azúcares. A partir de la hora 22 comienza a consumirse el sustrato en la curva de dilución al medio, mientras se llegan a valores mínimos en la hora 35. Para la dilución 1:5, se observa que en la hora 22 se consume las azúcares disponibles. Cabe destacar que los valores graficados como 0 g/L corresponden a áreas de los cromatogramas cuyos valores están por debajo de la curva de calibración. A partir de lo observado, la diferencia en el comienzo del consumo entre el cultivo sin diluir y de las dos condiciones diluidas, puede ser el estrés que le genera el medio al microorganismo. Como se mencionó anteriormente, *C. necator* produce el exopolimero, el cual está reportado como un mecanismo de defensa frente a condiciones difíciles para el microorganismo. Dado que la condición sin diluir es la más dura para la bacteria, la producción de esta sustancia extracelular comenzaría antes que para los cultivos más diluidos.

Con respecto a la diferencia de consumo entre glucosa y fructosa para *C. necator*, se observó una clara preferencia por la fructosa para las condiciones de 1:2 y 1:5. Para esta azúcar se lograron valores por debajo de 0,5 g/L, en la hora 44 para la dilución al medio y en la hora 22 para la dilución al quinto. A partir de los tiempos mencionados se observa una disminución de la concentración de glucosa disponible. Los valores de concentración de glucosa y fructosa están disponibles en anexos. Lo observado es congruente con distintos estudios bibliográfico, donde se analiza la preferencia por la fructosa para *C. necator*. Para la misma cepa utilizada, Haas *et al.* 2015 (40) reporta un mayor consumo de fructosa frente a la glucosa, mientras que Nygaard *et al.* 2019 (76) establece la fructosa como la principal fuente de carbono de esta bacteria.

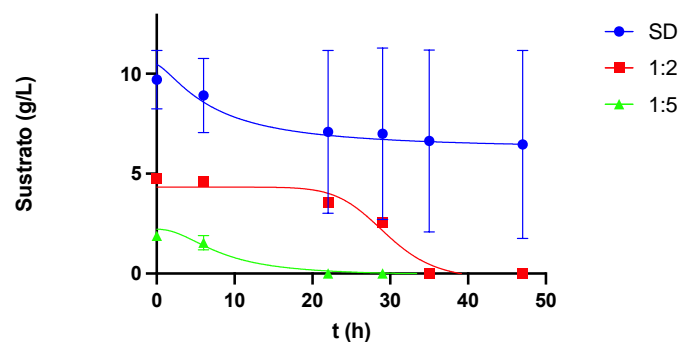


Figura 23. Curvas para el consumo de sustrato de *C. necator* en resting cells. Las condiciones son sin diluir, dilución al medio y dilución al quinto. Los valores que se muestran como 0 g/L corresponden a valores obtenidos por debajo de la curva de

glucosa y fructosa.

Como se observó que ambas bacterias prefieren un consumo inicial fructosa por encima de la glucosa, se prosiguió a estudiar el comportamiento de la curva de crecimiento de ambas bacterias con medio YEM suplementado con orujo y fructosa en comparación con medio YEM suplementado únicamente con el hidrolizado de orujo. Para los medios suplementados con fructosa se añadió la misma concentración que presentaba este azúcar en el hidrolizado de orujo de uva, 0,5 g/L, generando una relación del doble de concentración del azúcar en comparación al otro medio.

Como puede apreciarse en la figura 24, para ambas bacterias se ve una diferencia notoria entre el medio suplementado con fructosa (BGF y CNF) y los medios sin el suplemento de fructosa (BG y CN). Los valores de OD reportados en las dos condiciones de medio llegaron a presentar una diferencia aproximada de 0,4nm en ambas bacterias. Si bien este valor no es muy grande, se debe de tener en cuenta que no se agregó gran cantidad de fructosa al medio. Por otro lado, tanto para la curva de *B. ginsengi* como para la de *C. necator*, los tiempos en los cuales transcurren las fases de crecimiento fueron muy similares en ambas condiciones de medio. Pese al gran tamaño de la desviación estándar de los puntos graficados en ambas imágenes, no se vio una fase lag más estrecha en el medio suplementado con fructosa, ni una fase exponencial más prolongada. Sin embargo, esto es subjetivo ya que solo se registró un punto correspondiente a cada fase, uno a tiempo 0 y el otro a las 22 horas. El registro de más puntos en el periodo de tiempo correspondiente a estas fases podría revelar con mayor exactitud si existe o no un corrimiento de la curva. Por otro lado, además de la diferencia en las medidas de absorbancia, también se ve para ambas bacterias, que su velocidad de crecimiento aumenta cuando se encuentra frente a mayores concentraciones de fructosa. Sin embargo, esto podría variar si se contara con mayor cantidad de puntos.

Estos resultados coinciden con lo reportado por HPLC en donde se ve una clara preferencia de *B. ginsengi* y *C. necator* por la fructosa sobre la glucosa. Ambas bacterias responden positivamente a la adición de este azúcar al medio. También, estos resultados coinciden con los valores obtenidos con el glucómetro, en el que se ve el consumo de glucosa para el cultivo de *C. necator*. Los valores registran que la glucosa comienza a consumirse luego de transcurrida la hora 22, tiempo de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria.

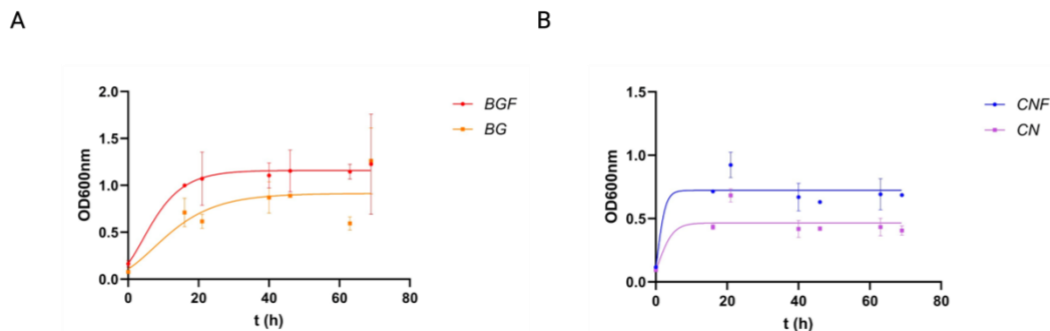


Figura 24. Comparación del crecimiento entre medio YEM con y sin suplemento de 0,5 g/L de fructosa. La figura A corresponde a las curvas para *B. ginsengi*, donde BGF es el medio suplementando y BG es el medio no suplementando. La figura B corresponde a las curvas para *C. necator*, donde CNF es el medio suplementando y CN es el medio no suplementando.

Para finalizar lo discutido de la utilización del método de dos pasos batch con *resting cells*, se plantean ciertas perspectivas a futuro para poder optimizar la producción a largo plazo. Primeramente, se plantea el agregado de otro residuo o subproducto industrial que sea rico en azúcares, como por ejemplo las melazas o bagazo de caña de azúcar. Lo mencionado se realizaría con el objetivo de llegar a un excedente de la fuente de carbono y que esta no se encuentre en un estado limitante, y a la vez en relación el nitrógeno funcione como el sustrato limitante para la producción de PHB. Además, se plantea una caracterización más exhaustiva del hidrolizado de orujo. Lo mencionado, en primera instancia se podría determinar la concentración presente de nitrógeno y fósforo, y evaluar si efectivamente el hidrolizado de orujo puede servir como un medio de producción para *resting cells*. Por otro lado, con una caracterización se podrían determinar que posibles compuestos inhibitorios contiene.

A modo de conclusión para las dos metodologías realizadas, se cree que el ensayo realizado en dos pasos batch y utilizando *resting cells* presenta un mayor potencial para la producción de PHB. Esto se debe a que al utilizarse en primer lugar un medio nutriente, se puede obtener una mayor biomasa, y luego el medio de producción puede generar el estrés suficiente requerido para la formación del producto. No obstante, cabe descartar que es de suma importancia analizar las estrategias mencionadas en perspectivas a futuro para aumentar la concentración de fuente de carbono y mejorar la producción.

4.4.4. Evaluación del producto final

Con el propósito de corroborar que efectivamente el producto obtenido es PHB, se realizó la degradación característica de este biopolímero a ácido crotonico. Se analizó el compuesto final obtenido por ambos microorganismos, como también los dos estándares mencionados en la metodología, uno proveniente de una síntesis industrial y otro de síntesis biológica, producido y caracterizado por el IIBCE. A partir de la digestión llevada a cabo, con una duración final de 15 minutos, se tomó muestras cada 5 minutos, con el fin de evaluar los cambios ocurridos durante la misma. Los espectros de absorbancia obtenidos corresponden a diluciones del compuesto final de la degradación. Para el caso de los estándares se realizó diluciones 1:100, mientras que para la degradación del producto final de *B. ginsengi* y *C. necator* la dilución realizada fue 1:10.

Tomando en cuenta lo reportado en la bibliografía, se esperaba un pico característico perteneciente al ácido crotonico entre 235 nm a 240 nm (36). Sin embargo, como se puede observar en la figura 24, solo se obtiene el pico a 240 nm en el caso de PHB industrial. Por otro lado, para el estándar de síntesis biológica se observa un pico en 210 nm. El mismo caso se obtuvo para *B. ginsengi* y *C. necator*, donde también se vio un pico alrededor de 210 nm. Si bien para ninguno de los productos producidos por los microorganismos utilizados se logró el pico característico deseado, se destaca principalmente que para el estándar de origen bacteriano no se haya observado un pico a 235 nm. A partir de este resultado, no se puede confirmar únicamente con este ensayo que el producto obtenido es PHB. En la figura 24 se observa los espectros obtenidos a tiempo final de la degradación para las cuatro muestras, mientras que los espectros obtenidos para cada tiempo se encuentran en anexos.

Una posible justificación sobre el corrimiento de los picos, tanto del estándar biológico como de las muestras obtenidas en este trabajo es que se encuentren compuestos residuales en los productos, para los cuales se daría un proceso de digestión a la par y puedan resultar en compuestos que logren una interferencia. Como se mencionó en la introducción, la degradación térmica del biopolímero de interés resulta principalmente en ácido crotonico. No obstante, en la vía de degradación del PHB bajo este método, se observa que un posible producto adicional pueden ser oligómeros (35). En el ensayo realizado por Mamat *et al.* 2013 (38) se reporta un porcentaje de dímeros y trímeros luego de llevada a cabo la pirolisis del PHB, junto con una baja concentración de 3-HB que no se logra degradar. Por otro lado, en este estudio también se

menciona que en una muestra de PHB con inclusiones celulares, la concentración del ácido crotonico sobre el total de los compuestos obtenidos de la degradación fue inferior en comparación con los datos del biopolímero puro. Esto se debe a que el ácido crotonico puede interactuar con otros productos de degradación provenientes de la biomasa bacteriana, resultando en otro compuesto que serían las crotonamidas (38). Las amidas también presentan un rango de absorción en el espectro ultravioleta, entre 180 nm a 230 nm (84). Lo mencionado es coherente con que el proceso de extracción realizado posee solo un paso de purificación, la filtración con Papel Watman 1, el cual tiene un tamaño de poro de 11 μm (85). Si bien se logra retener gran parte de la biomasa bacteriana, partículas del debris celular pueden migrar al permeado, ocasionando que se encuentren otros productos en la degradación que puedan generar las crotonamidas.

Para confirmar tanto que el producto presente sea PHB, como también la presencia de crotonamidas y diferentes compuestos que puedan hacer interferencias, es necesario realizar otros ensayos, como un FTIR o NMR.

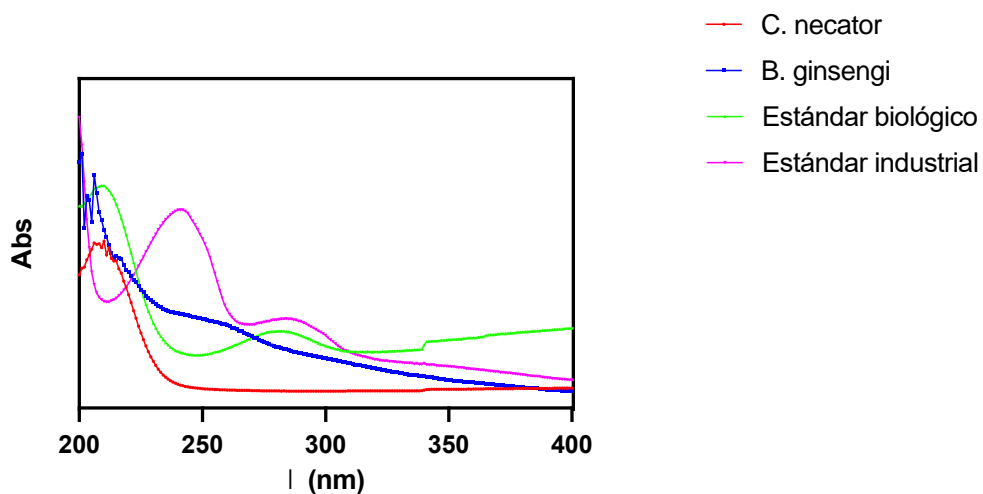


Figura 25. Espectros obtenidos para ácido crotonicos. Las muestras corresponden a *B. ginsengi* (1:10), *C. necator* (1:10), estándar industrial (1:100) y estándar de síntesis biológica (1:100).

4.5. Producción del copolímero

En la figura 25, se observan las láminas obtenidas de la elaboración de un copolímero. En la misma pueden apreciarse las tres relaciones de orujo y almidón de maíz tratadas; 10:90, 20:80 y 30:70. El producto obtenido con 10% de pellet de hidrolizado de orujo mantuvo una consistencia estable. La integración del orujo al pellet de almidón de maíz fue buena, el polvillo queda retenido en la lámina y no se pierde. Además, logró mantener cierta flexibilidad ya que es posible doblarla sin que se produzcan quiebres o fisuras. Por otro lado, al aumentar el porcentaje de orujo al 20%, la integración de éste al bioplástico fue muy similar. El polvo de orujo se unió al pellet de almidón de maíz adecuadamente, por lo que no genera pérdidas al tocarlo, rasparlo o doblarlo. También se obtuvo una flexibilidad considerable, ya que como en el caso anterior, se puede doblar la lámina sin que se generen fisuras. Sin embargo, al aumentar la concentración de orujo al 30%, los resultados discernieron. El orujo de uva no se integró de igual modo que en las láminas anteriores. El polvo se desprende de la misma al tocarla o doblarla, y, además, la lámina presenta pequeñas fisuras.

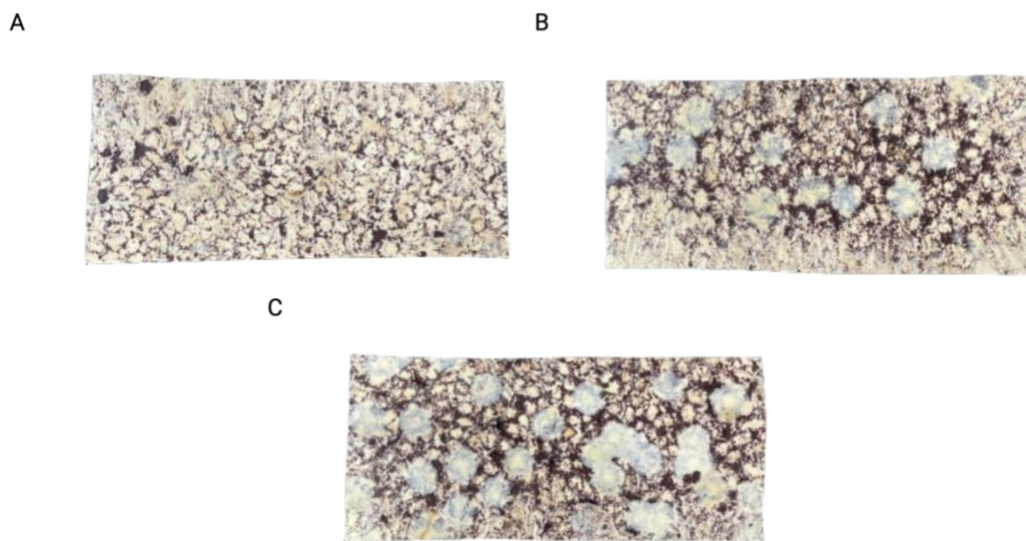


Figura 26. Láminas de copolímero de almidón de maíz y restos lignocelulósicos del orujo. Las imágenes corresponden a las siguientes proporciones: A) 90:10, B) 80:20 y C) 70:30.

Pese a los resultados obtenidos, se estima que pueden mejorar si se cuenta con equipos más adecuados para tratar dicho material. Como se puede ver en la figura 25, la disposición del orujo en las láminas no es uniforme, hay zonas en las que se concentra más que en otras. Si se

lograra distribuir los dos materiales de forma homogénea es muy probable que la resistencia y la flexibilidad mejoren. Este fenómeno se repite en las tres condiciones trabajadas. Teniendo esto en cuenta, si se lograra obtener una mejor distribución de los materiales en el copolímero, seguramente las proporciones en la lámina podrían aumentarse. Permitiendo de esta forma utilizar más orujo y reduciendo así la cantidad de plástico.

Es necesario agregar que no se contó con el equipo ni tiempo necesario para realizar una correcta caracterización de los productos. Existen diversos parámetros a estudiar para caracterizar el copolímero que se repiten en varios trabajos de investigación. Algunos de estos son la absorción de agua, la cristalinidad, la dureza, la elasticidad, el comportamiento térmico de las partículas estudiado por TGA, así como también su distribución y dispersión por SEM, la biodegradabilidad, entre otros (13, 21, 66).

Dado los resultados obtenidos, se optó por seguir con la condición de 20:80 para la generación de un corcho y una lámina con PHB de origen sintético.

La figura 27 muestra el resultado del corcho a partir de orujo y pellet de almidón de maíz. Al igual que en las láminas, se puede ver que el material presenta parches del polvo de orujo. Como se mencionó anteriormente, al no contar con el material adecuado no se logró obtener un resultado más homogéneo, pese a que previo a esto, se añadió aceite a la mezcla de bioplástico y polvo de orujo hidrofobizado para integrar mejor ambos componentes. A pesar de esto, se obtuvo una buena integración del material biológico ya que el mismo no se desprende del material. Este resultado muestra que, además de un producto flexible como lo es una etiqueta, también es posible realizar productos más rígidos como un corcho, una tapa o hasta incluso podría generarse algo de tamaño mayor como un cajón.

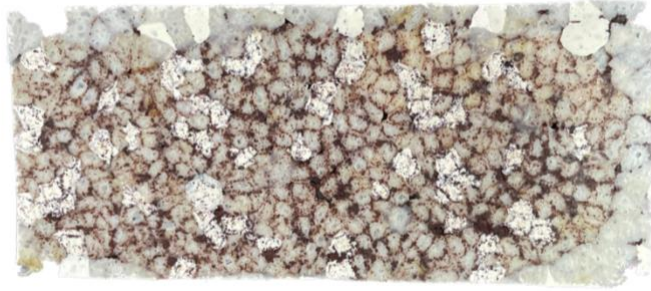


Figura 27. Lámina de copolímero obtenida para la proporción de 80:20 de PHB industrial y restos lignocelulósicos del orujo.

Esto es importante ya que la idea principal de este proyecto es revalorizar el orujo de uva de modo que la técnica utilizada genere residuo cero. Por lo tanto, el poder generar laminas con cierta flexibilidad y corchos, hace que sea posible la idea de incorporar una economía circular en la que estos productos vuelvan a integrarse en la industria vitivinícola.

En la figura 26 puede apreciarse el resultado de combinar el PHB de origen sintético con el orujo de uva en una relación de 20:80. Al igual que en los casos anteriores, se ve parches de orujo de uva en el producto. Sin embargo, a simple vista se ve una mejor integración de los dos materiales que en las láminas trabajadas con pellet de almidón de maíz. Sumado a esto, al doblar la lámina se ve que cuenta con una buena flexibilidad ya que no se producen quebraduras ni fisuras. Estos resultados son muy prometedores ya que en un caso ideal se espera poder trabajar con el PHB sintetizado biológicamente. En nuestro caso, inicialmente se esperaba poder desarrollar un producto de estas características con el PHB extraídos de las dos bacterias trabajadas. Sin embargo, no contamos con el tiempo necesario para poder producir la cantidad de biopolímero requerido para elaborar el copolímero.



Figura 28. Corcho de copolímero obtenida para la proporción de 80:20 de pellet de almidón de maíz y restos lignocelulósicos del orujo.

Para finalizar, como perspectivas a futuro se plantea en primer lugar poder elaborar el copolímero con el bioplástico producido con las bacterias utilizadas en este trabajo, ya que características como el peso molar pueden variar al ser un biopolímero de síntesis biológica, afectando las propiedades del copolímero. Por otro lado, se propone caracterizar el copolímero para determinar su TGA, absorción de agua, dureza y elasticidad. Por último, se plantea una molienda de los gránulos de los bioplásticos utilizados, con el propósito de mejorar la integridad y homogeneidad.

5. Diseño del proceso industrial y análisis económico

5.1. Diseño de planta

Dado que el trabajo se planteó con el propósito de tener una aplicación industrial del mismo, se procedió a diagramar tanto el flujo del proceso como el flujo de los equipos.

En primer lugar, el diagrama de bloques se realizó a partir de la producción de PHB llevada a cabo a escala laboratorio. En función de esto, el primer paso especificado es el secado del orujo, el cual es a 60°C por 24 horas, el cuál es el tiempo que se observó que el orujo pierde su humedad. Luego, se procede a la molienda del orujo y a su mezclado con H₂O y HCl 12M. A partir de los cálculos presentados en anexos, y tomando en consideración un 10% del orujo total producido por la bodega para la utilización de este como sustrato en el proceso, se obtuvo que se procesarían 168 kg de orujo por día. A la vez, se tomó los tiempos y valores de producción de *B. ginsengi*, ya que se observó que presenta mejores parámetros de producción. Tomando lo mencionado en consideración, el batch tendría una duración de 54 horas y se tratarían 378 kilos de orujo por batch. Pasados los 45 minutos de la hidrólisis, se realiza una centrifugación de 5000 rpm por 30 minutos, donde por un lado el sobrenadante se utiliza para el medio de cultivo, y por el otro el pellet se almacena para la posterior formulación de un copolímero. Luego de la esterilización del medio de cultivo y del aire inyectado, se genera el inóculo necesario a distintas escalas en medio LB, el cual se describe en profundidad en la siguiente sección. Al obtenerse la biomasa necesaria para inocular el medio de producción con una concentración de 0,1 g/L, se comienza la fermentación. El medio de producción corresponde a medio YEM suplementado con hidrolizado de orujo de uva.

Como se mencionó, el batch presenta una duración total de 54 horas, en donde se obtiene 6,7 kg totales del biopolímero. Una vez pasado este tiempo, se procede a la centrifugación del medio de cultivo y al secado del pellet obtenido por 72 horas a 37°C. A continuación, se le agrega a la biomasa seca en cada batch 126 L de cloroformo y se deja incubando por 48 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se filtra el cloroformo y se agrega el mismo volumen de metanol a una temperatura de 60°C hasta que evapore el líquido y se obtenga el PHB seco. Al obtenerse el PHB seco y los restos lignocelulósicos obtenidos de la hidrólisis, se puede proceder a producir el copolímero. Los cálculos correspondientes a la producción a escala industrial se presentan en anexos.

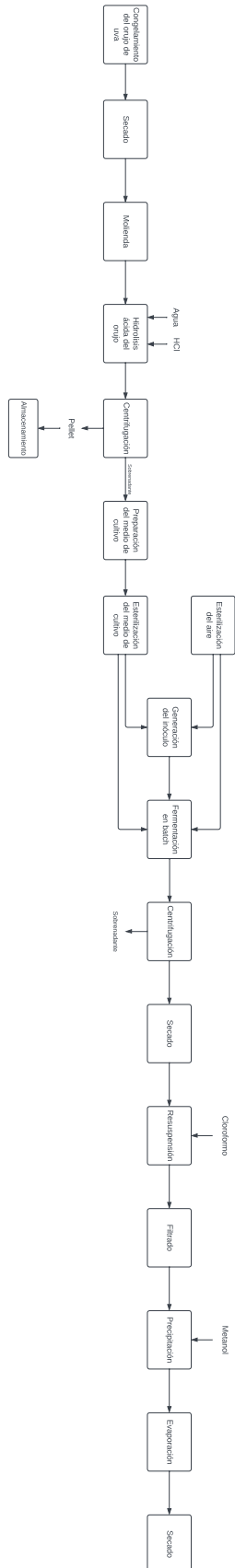


Figura 29. Diagrama de bloques para el proceso de producción y extracción del PHB.

Por otro lado, a partir de las diferentes etapas del proceso, se realiza un diagrama de flujo de equipos. Este esquema permite visualizar de forma clara y concisa los equipos que se utilizan en todas las etapas del proceso, al igual que las líneas que conectan a cada uno. El diagrama puede ser visualizado en la figura 24 y el detalle de cada equipo y las líneas de conexión se visualizan en tablas a continuación.

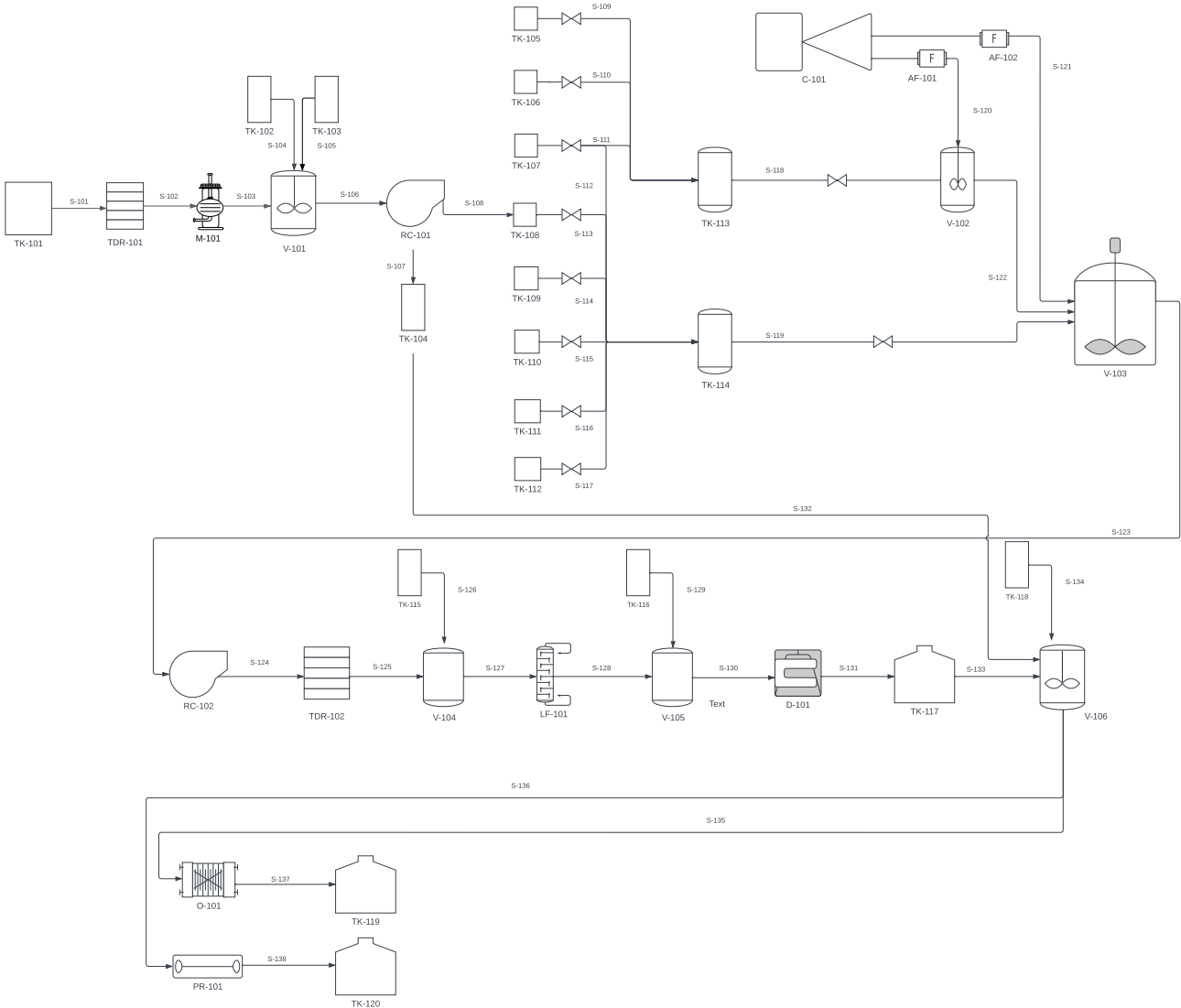


Figura 30. Diagrama de flujo de equipos para la producción y extracción de PHB.

Tabla 9. Descripción de los equipos mencionados en el Diagrama de flujo de equipos.

Código	Equipo	Descripción
TK-101	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de orujo.
TDR-101	Estufa de secado en bandejas (87)	Capacidad hasta 240 kg y 27 kW por calefacción eléctrica. Secado de 168 kg de orujo por día a 60°C.
M-101	Molienda (88)	Capacidad hasta 300 kg. Tamaño de entrada >10mm y tamaño de salida malla 120. Molienda de 168 kg de orujo por día.
V-101	Tanque con agitación (89)	Capacidad para 700 L, acero inoxidable 316 y chaqueta de almacenamiento. Mezcla de orujo con H ₂ O y agregado de HCl para hidrólisis.
TK-102	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de H ₂ O.
TK-103	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de HCl.
RC-101	Tanque de almacenamiento. (86)	Capacidad de 200 L/h y hasta 3000 rpm. 504 kg/ batch de hidrolizado de orujo.
TK-104	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de restos lignocelulósicos de orujo.
TK-105	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de triptona.
TK-106	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de NaCl.

TK-107	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de Extracto de levadura.
TK-108	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de sobrenadante de la hidrolisis de orujo.
TK-109	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
TK-110	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
TK-111	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
TK-112	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de H_2O .
TK-113	Tanque de almacenamiento (86)	Se almacena el medio LB esterilizado.
TK-114	Tanque de almacenamiento (86)	Se almacena el medio YEM esterilizado.
V-102	Tanque con agitación (89, 90)	Corresponde a una simplificación de los pasos de escalado. Se consideran tanques para los siguientes volúmenes: 50 L, 100 L, 300 L, 600 L, 2000 L y 5000
V-103	Tanque con agitación (90)	Fermentación para la producción de PHB.
C-101	Inyector de aire	
AF-101	Filtro (91)	Esterilización del aire para generación de pre-inóculo.
AF-103	Filtro (91)	Esterilización del aire para fermentación.
RC-102	Centrífuga de tornillo (92)	Capacidad de 1 T/h y 6000rpm.

		25208 L de medio de cultivo por batch.
TDR-102	Estufa de secado en bandejas (87)	Capacidad hasta 240 kg y 27 kW por calefacción eléctrica. Secado de 14 kg de orujo por batch a 37°C.
TK-105	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de cloroformo.
V-104	Tanque con agitación (89)	Mezcla del pellet con cloroformo a 37°C.
LF-101	Filtro de tambor rotatorio. (93)	Malla 226.
TK-116	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de metanol.
V-105	Tanque con agitación (89)	Mezcla del cloroformo filtrado y metanol.
D-101	Evaporador (94)	Capacidad para 252 L/batch correspondientes a la mezcla de cloroformo y metanol.
TK-117	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento del PHB obtenido
TK-118	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento de aceite.
V-106	Tanque con agitación (89)	Mezcla del PHB con aceite y restos lignocelulósicos del orujo.
O-101	Horno para vidrio. (95)	Capacidad para 7L y hasta 1100°C. Copolímero se fabrica a 180°C.
PR-101	Prensa de calor (96)	Hasta 399°C. Copolímero se fabrica a 180°C.

TK-119	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento del copolímero.
TK-120	Tanque de almacenamiento. (86)	Almacenamiento del copolímero.

Tabla 10. Descripción de las líneas entre los equipos correspondientes al diagrama de flujo de equipos.

Código	Línea
S-101	Transporte del orujo almacenado a estufa de secado.
S-102	Transporte del orujo seco a equipos de molienda.
S-103	Transporte del orujo molido a tanque y agitación para hidrólisis.
S-104	Transporte H ₂ O
S-105	Transporte HCl
S-106	Transporte de orujo hidrolizado a centrifuga.
S-107	Transporte para el almacenamiento del pellet.
S-108	Transporte del sobrenadante.
S-109	Transporte de triptona.
S-110	Transporte de NaCl.
S-111	Transporte de Extracto de levadura.
S-112	Transporte de Extracto de levadura.
S-113	Transporte de sobrenadante de la hidrolisis de orujo.
S-114	Transporte de (NH ₄) ₂ SO ₄ .
S-115	Transporte de Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O.
S-116	Transporte de MgSO ₄ ·7H ₂ O 4.
S-117	Transporte de H ₂ O.
S-118	Transporte medio LB esterilizado para generación de inóculo.
S-119	Transporte medio YEM para fermentación.
S-120	Transporte aire estéril para generación de inóculo.
S-121	Transporte aire estéril para fermentación.
S-122	Transporte de pre-inóculo al fermentador.
S-123	Transporte del medio de cultivo a centrífuga.
S-124	Transporte del pellet a estufa de secado.

S-125	Transporte de biomasa seca a tanque de agitación.
S-126	Transporte de cloroformo.
S-127	Transporte del cloroformo + la biomasa al equipo de filtrado.
S-128	Transporte de cloroformo filtrado a tanque de agitación.
S-129	Transporte de metanol.
S-130	Transporte de la mezcla de cloroformo y metanol a evaporador.
S-131	Transporte de PHB a tanque de almacenamiento.
S-132	Transporte de restos lignocelulósicos a tanque de agitación.
S-133	Transporte de PHB a tanque de agitación.
S-134	Transporte de aceite a tanque de agitación.
S-135	Transporte de mezcla para copolímero a horno para vidrio.
S-136	Transporte de mezcla para copolímero a prensa de calor.
S-137	Transporte de copolímero para almacenar.
S-138	Transporte de copolímero para almacenar.

Los diagramas presentados sirven como una primera base para el escalado del proyecto, lo cual se plantea como una perspectiva a futuro. Es importante destacar que se decidió utilizar el 10% del orujo total producido por los siguientes motivos. En primer lugar, como se puede observar en los cálculos realizados, se obtendría con esta cantidad 113 kg de PHB. Dado que el objetivo es reutilizarlo dentro de la misma industria, se podría utilizar el copolímero producido para ciertas líneas de vinos ya previamente alineadas con una producción más sostenible (2). Por otra parte, orujo se utiliza como fertilizante para los cultivos de vid de la bodega, luego de mezclarlo con cal para regular el pH. Si se plantea la utilización de todo el orujo para la producción del PHB y copolímero le podría generar a la empresa un gasto extra en la compra de fertilizante. Sin embargo, no se encontró datos si efectivamente el orujo producido se le da la función mencionada o si una proporción del mismo permanece como residuo. Por esta razón se decidió en primera instancia proponer que se utilice el 10% del residuo total para la elaboración de las etiquetas del envase, con una posibilidad de aumentar el porcentaje según la cantidad de orujo producido no utilizado.

5.2. Generación del inóculo

En un bioproceso, la elaboración del inóculo es igual de importante que el desarrollo de los escalados. Es crucial conocer las condiciones óptimas del microorganismo a trabajar para poder potenciar su velocidad de crecimiento. Esto se debe a que, en esta primera etapa, el objetivo es generar la mayor cantidad de biomasa posible en el menor tiempo, buscando reducir al máximo la fase lag. La velocidad de crecimiento de un microorganismo depende en gran parte de los parámetros fisicoquímicos, como la temperatura, pH, agitación, aireación, entre otros. A su vez, también es importante considerar la disponibilidad de nutrientes que se le da al microorganismo en el medio de cultivo. En conclusión, si el material biológico cuenta con todos los nutrientes necesarios para su crecimiento, en las cantidades y proporciones adecuadas, en consecuencia, aumentará la biomasa.

Para la preparación del inóculo en el diseño del proceso industrial se utilizaron los valores óptimos de los parámetros fisicoquímicos reportados para *B. ginsengi*. El medio utilizado fue LB el cual cuenta con todos los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. El proceso de escalado se diseñó con el fin de procesar todo el orujo de uva generado por la bodega Spinoglio en un período de 375 días. Este proceso se realizó utilizando una relación del 10 % de volumen, la cual dio como resultado 5 etapas de escalado, llegando a un fermentador de 12500 L, con un volumen de trabajo final de 8750 L. Además, para reducir la fase lag se realizó el pasaje de estos volúmenes durante el periodo de fase exponencial. Esto es crucial ya que durante esta etapa las bacterias experimentan un rápido aumento en el número de células. Esto significa que están en un estado metabólico activo y por lo tanto son capaces de adaptarse velozmente a un nuevo medio de cultivo. Por el contrario, si la transferencia se diera durante la fase estacionaria, en donde las bacterias ya han ajustado su metabolismo para dejar de proliferar y producir diversos productos secundarios, su adaptación a un nuevo medio se desarrollaría a una velocidad más lenta ya que debería reajustar su metabolismo para crecer nuevamente. En consecuencia, se generaría una fase lag más extensa.

Pese a que el método de escalado utilizando el 10% de volumen nos da una idea representativa de las etapas de este proceso, no es el más preciso. A futuro, se debería tener en cuenta otros factores como las dimensiones de los equipos, para lo cual se podría utilizar el criterio de similitud geométrica, manteniendo la relación de potencia por unidad de volumen. También se debería utilizar el modelo de ajuste Gompertz dado que, como se mencionó anteriormente se

adaptaba mejor a los valores obtenidos de crecimiento bacteriano, así como también tener en cuenta las vvm para evitar que el oxígeno disuelto en el medio sea una limitante de crecimiento.

En lo que refiere a escala laboratorio, se partió de matraces de 2 L, el cual fue escalado a una escala piloto de fermentadores de 5 L de capacidad. Luego, a partir de estos, se inocularon fermentadores de 70 L. A escala industrial se tomó como objetivo trabajar con 8750 L de medio en fermentadores de 12500 L. Para llegar a este volumen fue necesario realizar un escalado de escala industrial, utilizando un fermentador de 1500 L. En total se realizaron 5 pasos de escalado desde la escala laboratorio, pasando por la escala piloto y finalizando en escala industrial. Cabe aclarar que este diseño se llevó a cabo solo para la bacteria *B.ginsengi*, sin embargo, dado la semejanza de los parámetros de producción de las dos bacterias, el mismo diseño podría emplearse para la producción con *C.necator*.

5.3. Análisis preliminar de viabilidad económica

A nivel económico, los rendimientos de producción y equipos utilizados juegan un rol crucial para determinar la viabilidad de un bioproceso. Teniendo en cuenta que se trabaja con magnitudes mucho mayores a las utilizadas en el laboratorio, se debe tomar en consideración la inversión de estos proyectos. Sumado a esto, si no se obtiene buena remuneración con el producto final, ya sea por su valor o por la cantidad producida, el proceso se vuelve inviable. Por esto es importante realizar un análisis económico para poder proyectar un trabajo piloto a un trabajo industrial. A efectos del alcance de este trabajo, se realiza una primera aproximación al análisis económico, tomando en consideración cálculos preliminares para los costos de inversión, costos de operación y ganancias generadas. El propósito de lo mencionado es brindar un primer avance, de forma que a largo plazo se pueda profundizar sobre lo realizado hasta el momento.

En primer lugar, se toma en cuenta la inversión para los equipos mencionados en la sección 5.1. El desglose del costo para cada equipo se puede observar en anexos. En su totalidad, el coste de equipos sería de US\$253.000. Además, se debe considerar otros costos de inversión como la cepa utilizada y los componentes del medio de cultivo. Para los mismos se calculó US\$1300 para el medio de cultivo y US\$75 para la compra de la cepa. Los costos tanto de los equipos y de los componentes del medio son los observados en la página “*Made-in-China*” y el del microorganismo en el sitio “*Nite biological resource centre*”. Dentro de los costos de inversión,

se tomó en cuenta lo establecido por el MTSS para el personal calificado, y se calculó el costo aproximado de los salarios en US\$3000 para el periodo de producción. Por último, se considera la tarifa industrial especificada por OSE, la cual incluye los siguientes servicios: OSE, UTE, ANTEL, ANP y ANCAP, y el cargo fijo de la misma equivale a US\$379. Tomando en cuenta un 10% de imprevistos, el costo de inversión estipulado es de US\$309.254.

Por otro lado, se consideran para el análisis económico los costos de operación del proceso. En primer lugar, se toma en cuenta un cargo variable de los servicios incluidos en la tarifa industrial, el cual se aproximó a US\$1000. Se toman como costos totales de operación US\$1100, considerando un 10% de imprevistos.

Adicionalmente, se debe tomar en cuenta también la ganancia que puede generar el proyecto. Si bien se propuso la utilización de PHB dentro de la industria vinícola, dentro del objetivo del trabajo de la obtención de residuo cero, el mismo también puede tener otras aplicaciones. En primer lugar, se considera la utilización de PHB para la elaboración de etiquetas y corchos para botellas de vino, donde el residuo de orujo se revaloriza dentro de la misma industria. Se observó que el costo del bioplástico para uso industrial es de US\$28 por kilo (97). Contrariamente, el PHB se puede utilizar para aplicaciones médicas. En este caso, se precisa el biopolímero con un nivel de pureza mayor, por lo que su costo en el mercado es mayor. Se observó que el PHB 99,5% puro posee un valor de US\$730 el kilo (98).

Es importante destacar, que como ya se menciona, estos son los primeros valores de costos propuestos tomando en cuenta la inversión y las operaciones a largo plazo. En una futura instancia si es de interés la profundización de este análisis, se deberá tener en cuenta otros valores como son el consumo de energía y agua y los aranceles de importaciones. Esto se decidió realizar para sentar una base para la realización de análisis económicos exhaustivos, de los cuáles se podría estudiar la viabilidad del proyecto, como son el cálculos de los márgenes y el periodo de repago.

Como se puede apreciar, la aplicación del biopolímero en la industria biomédica posee un mayor valor agregado, ya que las características que presenta son muy beneficiosas para su utilización. Contrariamente, se debe tomar en cuenta que en este caso no se estaría dando un uso al resto lignocelulósico del residuo y no se generaría la meta de residuo cero planteada, la cuál es el objetivo de este trabajo como se planteó anteriormente. En relación a esto, utilizar el

copolímero para la elaboración de las etiquetas puede disminuir los costos. Sin embargo, no se encontró disponibles precios de mercado para copolímeros de características similares, por lo que no se puede calcular los beneficios.

A pesar de que debido a que los valores obtenidos son muy preliminares y no se pudo determinar la viabilidad del proyecto, se plantean distintas estrategias que se podrían utilizar en un futuro para mejorar la aplicación y viabilidad del proyecto. En primera opción, al tratarse de un proyecto con el objetivo de revalorizar un contaminante y generar un residuo cero del mismo, hay distintos fondos y beneficios disponibles los cuáles se podrían obtener. Algunas posibilidades pueden ser el programa de apoyo a inversiones con impacto ambiental positivo, propuesto por ANDE (99), o los incentivos fiscales con impacto ambiental de parte del gobierno nacional (100). Otra alternativa es utilizar otro plástico o bioplástico para la producción de etiquetas, mientras que el PHB obtenido sería exclusivamente de uso médico. Como se observó en los resultados para la elaboración del copolímero, con la utilización de pellets de almidón de maíz se obtuvo resultados satisfactorios. Al ser este un bioplástico degradable ya utilizado para diferentes usos industriales, como bolsas de supermercado (65), puede ser una buena opción para la producción de etiquetas, disminuyendo el costo.

Por último, se decidió como parte del análisis preliminar económica desarrollar una búsqueda inicial del mercado, con el objetivo de estudiar si efectivamente hay empresas que produzcan el PHB a escala industrial. Se encontraron tres empresas con características interesantes que producen el biopolímero a gran escala y dentro de la región. En primer lugar, este año comenzó a operar la empresa Bionbax en Santa Fe, Argentina. Esta empresa utiliza fermentaciones para obtener el PHB partiendo de sustratos como son el lactosuero y los desxhechos de la caña de azúcar y glicero (101, 102). Por otro lado, en Brasil opera la empresa PHB Industrial SA, donde producen PHB y PHBV a partir de bagaso proveniente de la caña de azúcar y de residuos de la elaboración de biocombustibles, y utilizando la bacteria *C.necator* DSM 545 en una fermentación (103). Por último, la empresa de Estados Unidos Damimer Scientifics produce PHA por fermentación bacteriana partiendo de aceite de canola y soja (104). Una particularidad importante de esta compañía es que en conjunto con la empresa de bebidas alcoholicas Bacardi, producen botellas 100% de PHA (105). Para finalizar, analizando la producción de las compañías mencionadas se observó que es posible y económicamente viable producir el bioplástico a nivel industrial, y específicamente con usos a la industria de interés.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y las técnicas realizadas en este trabajo, se concluye que fue posible desarrollar una tecnología para la obtención de un biopolímero, obteniéndose a la misma vez residuo cero partiendo del sustrato inicial, el orujo de uva. Además, se logró producir un copolímero de PHB y los restos lignocelulósicos del orujo el cuál presenta un potencial industrial.

Se consiguió proponer un tratamiento para el orujo de uva con el propósito de maximizar las azúcares disponibles para la producción deseada. Si bien las concentraciones de carbohidratos obtenidas fueron menores a lo esperado, se logro analizar los resultados de la extracción de azúcares mediante dos metodologías distintas. Se considera necesario optimizar el proceso de hidrolisis en un futuro para poder lograr mejores condiciones para el crecimiento de la bacteria y la formación de PHB.

En relación a la identificación de microorganismos productores, se logró corroborar la producción de PHB por parte de *C. necator*. Además, se consiguió estudiar la capacidad de *B. ginsengi* para la formación del biopolímero, la cuál no se observó que se hubiese reportado anteriormente en bibliografía. Esto se consiguió mediante el análisis no solo por el método de coloración de Sudan Black B, sino que también al estudiar su cercanía filogenética con otras especies de bacterias reportadas como productoras del bioplástico. En función de esto, se cree imprescindible que se pueda analizar en más profundidad las características del biopolímero obtenido para confirmar si es PHB u otro polímero.

Por otro lado, se pudo analizar las condiciones óptimas de crecimiento para las dos bacterias con las que se trabajó. Esto fue especialmente relevante para *B. ginsengi*, ya que no se encontró otros estudios en los que se haya utilizado para producciones en fermentaciones líquidas. Se pudo analizar la concentración de sustrato inicial, la temperatura y la agitación tal como se había propuesto en un inicio.

Los ensayos en batch y en *resting cells* permitieron estudiar la producción de PHB. Al realizar estas técnicas se pudo analizar la concentración de producto obtenida y parámetros claves asociados a la producción. Para *resting cells* se obtuvo el consumo de sustrato por HPLC, donde se identificó la preferencia de ambos microorganismos por la fructosa. Sin embargo, se observó

que el crecimiento en medio YEM con hidrolizado de uva fue menos en comparación a medio LB y medio suplementado con fructosa. Es necesario seguir evaluando diversas formas en las que se podría optimizar la producción de PHB. Adicionalmente, se realizó una técnica espectrofotométrica para analizar la identidad producto. Si bien no se obtuvo los resultados esperados para las muestras, tampoco se vio lo deseado para el estándar biológico. Se considera pertinente realizar otro ensayo para lograr identificar que los productos obtenidos sean verdaderamente PHB.

Adicionalmente, se logró producir un copolímero en la forma de etiqueta y de corcho. A pesar de que se analizó las proporciones entre bioplástico y material lignocelulósico con pellets de almidón de maíz, se pudo corroborar que el mismo se puede realizar con PHB de síntesis industrial tras realizar una etiqueta. No fue posible evaluar ni la producción del copolímero con el PHB sintetizado por las bacterias utilizadas, ni tampoco se pudo caracterizar este material.

Por último, se analizó un posible camino para la realización del proyecto a escala industrial. Para esto se pudo diseñar los diagramas de flujos del proceso y de equipo, estudiar la generación de inóculo necesaria y analizar la viabilidad económica a grandes rasgos. Se contempló distintas opciones para lograr la disminución de costos asociados a la producción y que el proyecto resulte atractivo desde un punto de vista ambiental, resaltando la importancia de un proceso en el cual es posible alcanzar un residuo final cero.

7. Referencias bibliográficas

1. Uruguay XXI. Un productor de vinos de clase mundial [Internet]. Montevideo, Uruguay. 2020 [accessed 2023 Apr 15]. <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/noticias/articulo/un-productor-de-vinos-de-clase-mundial/>
2. INAVI. Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2023:73. <https://www.inavi.com.uy/uploads/vinedo/b001699f9585532cfd1fa06a35756544f917eda5.pdf>
3. Ministerio de Turismo. Vendimia 2022 cargada de sabor y nuevas cepas [Internet]. Montevideo, Uruguay. 2022 [accessed 2024 Mar 4]. <https://www.gub.uy/ministerio-turismo/comunicacion/noticias/vendimia-2022-cargada-sabor-nuevas-cepas>
4. EL PAÍS Uruguay. El negocio con desechos del vino en Uruguay que surgió gracias a la pandemia y que apunta a crecer [Internet]. Uruguay. 2022 Oct 7 [accessed 2024 Mar 2]. <https://www.elpais.com.uy/negocios/noticias/el-negocio-con-desechos-del-vino-en-uruguay-que-surgio-gracias-a-la-pandemia-y-que-apunta-a-crecer>
5. Nanni A, Parisi M, Colonna M. Wine By-Products as Raw Materials for the Production of Biopolymers and of Natural Reinforcing Fillers: A Critical Review. *Polymers*. 2021;13(3):1–29. doi:10.3390/POLYM13030381
6. Madelina LA, Caludia Celeste MD, Maribel OM, Marcos LB. Orujo de Uva: Más que un Residuo, una Fuente de Compuestos Bioactivos. *EPISTEMUS*. 2023;16(33):2007–8196. doi:10.36790/EPISTEMUS.V16I33.283
7. Reyes Reyna RM, Segura Ceniceros EP, Iliná A, Ascacio Valdés JA, Rodríguez Herrera R, Vargas Segura A, Ruelas Chacón X, Flores Gallegos AC. Determinación del contenido polifenólico en orujo de uva de diferentes variedades procedentes de la región de Coahuila. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2020;5(2020):687–691.
8. Privado Irala A. Aprovechamiento de los subproductos de la industria vitivinícola. 2020. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALICIA PRIVADO IRALA.pdf>
9. Cotacallapa Sucapuca M, Vilca Curo R, Coaguila M. El orujo de uva italia como fuente de compuestos bioactivos y su aprovechamiento en la obtención de etanol y compost. *Revista FAVE-Ciencias Agrarias*. 2020;19(1):2346–9129.
10. Dubarry D, Machado A. Vitanna, alimentación consciente [Internet]. Uruguay: Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Agencia Nacional de Desarrollo.

- 2024 [accessed 2024 Mar 2]. <https://vitanna.com.uy/>
11. Kourilova X, Pernicova I, Vidlakova M, Krejcirik R, Mrazova K, Hrubanova K, Krzyzanek V, Nebesarova J, Obruca S. Biotechnological Conversion of Grape Pomace to Poly(3-hydroxybutyrate) by Moderately Thermophilic Bacterium *Tepidimonas taiwanensis*. *Bioengineering* (Basel, Switzerland). 2021;8(10). doi:10.3390/BIOENGINEERING8100141
 12. Andler R, Pino V, Moya F, Soto E, Valdés C, Andreeßen C. Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source. *International Journal of Biobased Plastics*. 2021;3(1):98–111. doi:10.1080/24759651.2021.1882049
 13. Etxabide A, Kilmartin PA, Guerrero P, de la Caba K, Hooks D, West M, Singh T. Polyhydroxybutyrate (PHB) produced from red grape pomace: Effect of purification processes on structural, thermal and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;217:449–456. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2022.07.072
 14. Devesa Rey R, Vecino X, Varela Alende JL, Barral MT, Cruz JM, Moldes AB. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*. 2011;31(11):2327–2335. doi:10.1016/J.WASMAN.2011.06.001
 15. Parker L, National Geographic. The World’s Plastic Pollution Crisis Explained [Internet]. Washington, United States: National Geographic. 2024 [accessed 2024 Mar 4]. <https://education.nationalgeographic.org/resource/worlds-plastic-pollution-crisis-explained/>
 16. Naciones Unidas. Sin contaminación por plásticos [Internet]. Estados Unidos. 2024 [accessed 2024 Mar 4]. <https://www.un.org/es/observances/environment-day>
 17. United Nations Development Programme. Una marea de plástico [Internet]. Estados Unidos. 2024 [accessed 2024 Mar 2]. <https://featured.undp.org/una-marea-de-plastico/>
 18. ONU Medio Ambiente. Plásticos De Un Solo Uso: Una hoja de ruta para la sostenibilidad. *Technology for Environment*. 2018;227(5):327.
 19. Parker L. Los microplásticos ya están en nuestros cuerpos. ¿Cuánto nos dañan? [Internet]. National Geographic. 2022 Apr 27 [accessed 2024 Mar 2]. <https://www.nationalgeographic.com/medio-ambiente/2022/04/los-microplasticos-ya-estan-en-nuestros-cuerpos-cuanto-nos-danan>
 20. Espert A. Natural fibres/polypropylene composites from residual and recycled materials: surface modification of cellulose fiber, properties and environmental

- degradation. 2003.
https://www.researchgate.net/publication/279652425_Natural_fibrespolypropylene_composites_from_residual_and_recycled_materials
21. Essabir H, Raji M, Laaziz SA, Rodrique D, Bouhfid R, Qaiss A el kacem. Thermo-mechanical performances of polypropylene biocomposites based on untreated, treated and compatibilized spent coffee grounds. *Composites Part B: Engineering*. 2018;149:1–11. doi:10.1016/J.COMPOSITESB.2018.05.020
 22. Seidi F, Salimi H, Shamsabadi AA, Shabanian M. Synthesis of hybrid materials using graft copolymerization on non-cellulosic polysaccharides via homogenous ATRP. *Progress in Polymer Science*. 2018;76:1–39. doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2017.07.006
 23. Ministerio de Ambiente. Bioplásticos [Internet]. Uruguay. 2020 [accessed 2024 Mar 2]. <https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/politicas-y-gestion/bioplasticos>
 24. Rowell R, Field P, Jacobson R. Utilization of Natural Fibers in Plastic Composites : Problems and Opportunities. Semantic Scholar. 1998.
 25. Majewski T, Błędzki A. Desarrollo y aplicaciones actuales de los plásticos reforzados por fibras naturales. 2013.
 26. Yang J, Ching YC, Chuah CH. Applications of Lignocellulosic Fibers and Lignin in Bioplastics: A Review. *Polymers* 2019, Vol. 11, Page 751. 2019;11(5):751. <https://www.mdpi.com/2073-4360/11/5/751/htm>. doi:10.3390/POLYM11050751
 27. McAdam B, Brennan Fournet M, McDonald P, Mojicevic M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*. 2020;12(12):1–20.
 28. Roohi, Rehan Zaheer M, Kuddus M. PHB (poly-β-hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polym Adv Technol*. 2017:1–11.
 29. Carpine R, Olivieri G, Hellingwerf KJ, Pollio A, Marzocchella A. Industrial production of poly-β-hydroxybutyrate from CO₂: Can cyanobacteria meet this challenge? *Processes*. 2020;8(3). https://www.researchgate.net/publication/339924942_Industrial_Production_of_Poly-b-hydroxybutyrate_from_CO2_Can_Cyanobacteria_Meet_this_Challenge. doi:10.3390/PR8030323
 30. Urtuvia V, Villegas P, González M, Seeger M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;70(2014):208–213.

31. Reinecke F, Steinbüchel A. *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2009;16(1–2):91–108.
32. Prados E, Maicas S. Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Universal Journal of Microbiology Research*. 2016;4(1):23–30.
doi:10.13189/UJMR.2016.040104
33. Lee YH, Kim TW, Park JS, Huh TL. Effect of the supplement of metabolites on cell growth and poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes latus*. *Journal of microbiology and biotechnology*. 1996;6(2):120–127.
[https://pure.korea.ac.kr/en/publications/effect-of-the-supplement-of-metabolites-on-cell-growth-and-poly- \$\beta\$](https://pure.korea.ac.kr/en/publications/effect-of-the-supplement-of-metabolites-on-cell-growth-and-poly-beta)
34. Dey S, Tribedi P. Microbial functional diversity plays an important role in the degradation of polyhydroxybutyrate (PHB) in soil. *3 Biotech*. 2018;8(3):8–171.
35. Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. 2014;8(11):791–808.
doi:10.3144/EXPRESSPOLYMLETT.2014.82
36. Sabbagh Mojaveryazdia F, Idayu Muhamada I, Rezaniab S, Benhamc H. Importance of Glucose and *Pseudomonas* to produce degradable plastics. *Journal Teknologi*. 2013;69(5):7–10.
37. Markovic MD, Panic V V., Savic SI, Ugrinovic VD, Pjanovic R V., Spasojevic MM, Spasojevic PM. Biobased thermo/pH sensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-crotonic acid) hydrogels for targeted drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2022;335:111817. doi:10.1016/J.MICROMESO.2022.111817
38. Mamat MRZ, Ariffin H, Hassan MA, Mohd Zahari MAK. Bio-based production of crotonic acid by pyrolysis of poly(3-hydroxybutyrate) inclusions. *Journal of Cleaner Production*. 2014;83:463–472. doi:10.1016/J.JCLEPRO.2014.07.064
39. Ariffin H, Nishida H, Shirai Y, Hassan MA. Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*. 2008;93(8):1433–1439. doi:10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2008.05.020
40. Haas C, Steinwandter V, Diaz De Apodaca E, Maestro Madurga B, Smerilli M, Dietrich T, Neureitera M. Production of PHB from Chicory Roots – Comparison of Three *Cupriavidus necator* Strains. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*.

- 2015;29(2):99–112.
41. Morlino MS, Serna García R, Savio F, Zampieri G, Morosinotto T, Treu L, Campanaro S. *Cupriavidus necator* as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. *Biotechnology Advances*. 2023;69:108264. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108264
 42. Verma P, Pandey PK, Gupta AK, Seong CN, Park SC, Choe HN, Baik KS, Patole MS, Shouche YS. Reclassification of *Bacillus beijingensis* Qiu et al. 2009 and *Bacillus ginsengi* Qiu et al. 2009 as *Bhargavaea beijingensis* comb. nov. and *Bhargavaea ginsengi* comb. nov. and emended description of the genus *Bhargavaea*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2012;62(10):2495–2504. doi:10.1099/IJS.0.034850-0
 43. Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hottton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, McVeigh R, O’Neill K, Robbertse B, et al. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools [Internet]. Database. 2020;2020. doi:10.1093/DATABASE/BAAA062
 44. Posibacteria Cavalier-Smith [Internet]. ITIS, Integrated Taxonomic Information System. 2024 [accessed 2024 Mar 2]. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&anchorLocation=SubordinateTaxa&credibilitySort=SubordinateTaxa&rankName=Class&search_value=956097&print_version=SCR&source=from_print#SubordinateTaxa
 45. Cavalier Smith T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52(1):7–76. doi:10.1099/00207713-52-1-7/CITE/REFWORKS
 46. Jendrossek D, Selchow O, Hoppert M. Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(2):586–593. doi:10.1128/AEM.01839-06
 47. Facundo Martínez LV, Emiliano U, Castrejón R, Álvarez Vargas A, Cano Canchola C, Serafin Muñoz AH, Mx GS. Guanajuato Rumbo al Desarrollo Sustentable, Etapa 2.0: Análisis de bacterias productoras de polihidroxibutirato (PHB) dentro del rol de bioplásticos. *XXVII Verano De la Ciencia*. 2022;16(1):2395–9797.
 48. Martínez Gutiérrez CA, Latisnere Barragán H, García Maldonado JQ, López Cortés A.

- Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *PeerJ*. 2018;6(5):1–19. doi:10.7717/PEERJ.4780
49. McAdam B, Brennan Fournet M, McDonald P, Mojicevic M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908 | 10.3390/polym12122908. MDPI. 2020 Nov 7 [accessed 2023 Apr 15]:1–20. <https://sci-hub.ru/https://doi.org/10.3390/polym12122908>
 50. Altaee N, El-Hiti GA, Fahdil A, Sudesh K, Yousif E. Screening and Evaluation of Poly(3-hydroxybutyrate) with *Rhodococcus equi* Using Different Carbon Sources. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2017;42(6):2371–2379. https://www.researchgate.net/publication/309331336_Screening_and_Evaluation_of_Poly3-hydroxybutyrate_with_Rhodococcus_equi_Using_Different_Carbon_Sources. doi:10.1007/S13369-016-2327-8
 51. Müller Santos M, Koskimäki JJ, Alves LPS, De Souza EM, Jendrossek D, Pirttilä AM. The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 2021;45(3). doi:10.1093/FEMSRE/FUAA058
 52. Burniol Figols A, Varrone C, Daugaard AE, Le SB, Skiadas I V., Gavala HN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented crude glycerol: Study on the conversion of 1,3-propanediol to PHA in mixed microbial consortia. *Water Research*. 2018;128:255–266. doi:10.1016/J.WATRES.2017.10.046
 53. Suttle A, Sha M. A beginner’s guide to CHO Cell Bioprocessing: Bioprocess Modes - Batch, Fed-batch, and Perfusion. *ependorf*. 2022;1(456):1–12. <https://www.eppendorf.com/ar-es/lab-academy/applied-industries/bioprocessing/introduction-to-bioprocessing/batch-fed-batch-and-continuous-culture/>
 54. Moens E, Bolca S, Possemiers S, Verstraete W. A Wake-Up Call for the Efficient Use of the Bacterial Resting Cell Process, with Focus on Low Solubility Products. *Current microbiology*. 2020 [accessed 2024 Mar 10];77(8):1349–1362. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32270205/>. doi:10.1007/S00284-020-01959-8
 55. Follonier S, Goyder MS, Silvestri AC, Crelier S, Kalman F, Riesen R, Zinn M. Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;71:42–52. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2014.05.061

56. Dalsasso RR, Pavan FA, Bordignon SE, Aragão GMF de, Poletto P. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*. 2019;85:12–18. doi:10.1016/J.PROCBIO.2019.07.007
57. Hijosa Valsero M, Garita Cambronero J, Paniagua García AI, Díez Antolínez R. By-products of sugar factories and wineries as feedstocks for erythritol generation. *Food and Bioproducts Processing*. 2021;126:345–355. doi:10.1016/J.FBP.2021.02.001
58. Cantwell MI, Hong G, Albornoz K, Berlanga M. Fresh grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves: Postharvest biology and handling recommendations. *Scientia Horticulturae*. 2022;292:110627. doi:10.1016/J.SCIENTA.2021.110627
59. Genexa - Adn evolutivo [Internet]. Uruguay: Genexa. 2024 [accessed 2024 Mar 2]. <https://www.genexa.com.uy/quienes-somos>
60. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38(7):3022–3027. <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>. doi:10.1093/MOLBEV/MSAB120
61. Susianingsih E, Kadriah IAK, Nurhidayah. Screening and isolation of PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) producing bacteria as an alternative material for disease prevention on the shrimp culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;564(1). doi:10.1088/1755-1315/564/1/012053
62. Yellore V, Desai A. Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Letters in applied microbiology*. 1998;26(6):391–394. doi:10.1046/J.1472-765X.1998.00362.X
63. López-Abelairas M, García-Torreiro M, Lú-Chau T, Lema JM, Steinbüchel A. Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 2015;93:250–259. doi:10.1016/J.BEJ.2014.10.018
64. DSMZ. *Bhargavaea ginsengi* [Internet]. Braunschweig, Alemania: DSMZ. [accessed 2024 Mar 2]. <https://webshop.dsmz.de/en/bacteria/Bhargavaea-ginsengi.html>
65. Biopack, bolsas compostables y biodegradables [Internet]. Por un consumo responsable. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. <http://www.biopack.uy/sitio/>
66. García-García D, Carbonell A, Samper MD, García-Sanoguera D, Balart R. Green composites based on polypropylene matrix and hydrophobized spend coffee ground (SCG) powder. *Composites Part B: Engineering*. 2015;78:256–265. doi:10.1016/J.COMPOSITESB.2015.03.080

67. Marsden W, Gray PP, Nippard GJ, Quinlan MR. Evaluation of the DNS Method for Analysing Lignocellulosic Hydrolysates. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 1982;32(11):1016–1022. doi:10.1002/JCTB.5030320744
68. Aldana G, Vasquez G. Influencia del tiempo, temperatura y dosis de reactivo en la concentración de glucosa en el pretratamiento ácido y alcalino de los residuos sólidos orgánicos. *Universidad Nacional del Centro del Perú*. 2019:116.
69. Sánchez NL, Ugalde Álvarez J. Determinación de azúcares reductores por DNS. [accessed 2024 Mar 11]. <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-nacional/biquimica-teoria/100-determinacion-de-azucars-reductores-por-dns/3711714>
70. BIO RAD. Aminex HPLC columns. 2012:4. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6333.pdf
71. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(10):908–934. doi:10.1111/J.1469-0691.2008.02070.X
72. De Moraes Russo CA, Selvatti AP. Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(9):2327–2333. doi:10.1093/MOLBEV/MSY118
73. Archie JW. Homoplasy Excess Ratios: New Indices for Measuring Levels of Homoplasy in Phylogenetic Systematics and a Critique of the Consistency Index. *Systematic Zoology*. 1989;38(3):253. doi:10.2307/2992286
74. Oxford University press. Consistency index [Internet]. Oxford, Inglaterra: Oxford University. 2024 [accessed 2024 Mar 12]:1. <https://www.oxfordreference.com/display/10.1093/oi/authority.20110803095633403>
75. Kovalcik A, Pernicova I, Obruca S, Szotkowski M, Enev V, Kalina M, Marova I. Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. *Food and Bioproducts Processing*. 2020;124:1–10. doi:10.1016/J.FBP.2020.08.003
76. Nygaard D, Yashchuk O, Hermida ÉB. Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: application of the response surface methodology. *Heliyon*. 2019;5(3):e01374. doi:10.1016/J.HELIYON.2019.E01374
77. Sharifzadeh Baei M, Najafpour G., Younesi H, Tabandeh F, Eisazadeh H. Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis by *Cupriavidus necator* DSMZ 545 Utilizing Various

- Carbon Sources. *World Applied Sciences Journal*. 2009;7(2):157–161.
https://www.researchgate.net/publication/242247725_Poly3-hydroxybutyrate_Synthesis_by_Cupriavidus_necator_DSMZ_545_Utilizing_Various_Carbon_Sources
78. Sezonov G, Joseleau Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(23):8746.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168924/>. doi:10.1128/JB.01368-07
 79. Ribeiro PLL, Campos MI, Druzian JI. Novel extracellular polymeric substances produced by *Cupriavidus necator* IPT 027 grown on glucose and crude glycerol originated from biodiesel. *Polymers for Advanced Technologies*. 2017;28(4):549–556.
 doi:10.1002/PAT.3957
 80. Vicentin RP, DOS Santos JV, Labory CRG, DA Costa AM, Moreira FM de S, Alves E. Tolerance to and accumulation of cadmium, copper, and zinc by *Cupriavidus necator*. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 2018;42. doi:10.1590/18069657RBCS20170080
 81. de Jesus Assis D, Gomes GVP, da Cunha Pascoal DR, Pinho LS, Chaves LBO, Druzian JI. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2016;180(6):1110–1127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27357823/>.
 doi:10.1007/S12010-016-2155-Z
 82. Arikawa H, Sato S, Fujiki T, Matsumoto K. A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Biotechnology*. 2016;227:94–102. doi:10.1016/J.JBIOTEC.2016.04.004
 83. Fiorese ML, Freitas F, Pais J, Ramos AM, De Aragão GMF, Reis MAM. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*. 2009;9(6):454–461.
https://www.researchgate.net/publication/230083239_Recovery_of_polyhydroxybutyrate_PHB_from_Cupriavidus_necator_biomass_by_solvent_extraction_with_12-propylene_carbonate. doi:10.1002/ELSC.200900034
 84. Nielsen EB, Schellman JA. The absorption spectra of simple amides and peptides. *The Journal of physical chemistry*. 1967;71(7):2297–2304. doi:10.1021/J100866A051
 85. I.C.T S.L. Filtro cualitativo grado 1, whatman® [Internet]. Madrid, España: Instrumentación Científica Técnica, S.L. 2024 [accessed 2024 Mar 2].

- <https://www.ictsl.net/productos/papelfiltracion/0000009f3a1310b68.html>
86. Wenzhou Lihong Machinery Technology Co.Ltd. Acero inoxidable calefacción eléctrica y vapor sanitario doble de refrigeración del reactor de la fermentación el envejecimiento de la camisa de equilibrio de mezcla de tanque de almacenamiento Fermentor fermentador Buffer [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_wzlihong/product_Stainless-Steel-Sanitary-Steam-Electric-Heating-and-Cooling-Double-Jacketed-Aging-Fermentation-Reactor-Mixing-Balance-Buffer-Fermenter-Fermentor-Storage-Tank_hnrsuneeg.html
 87. Zhengzhou aslan Machinery Co.Ltd. Las tuercas de Verdura Fruta industrial eléctrico de Gas Horno de secado de la circulación de aire caliente del secador de bandeja de equipos médicos [Internet]. Las tuercas de Verdura Fruta industrial eléctrico de Gas Horno de secado de la circulación de aire caliente del secador de bandeja de equipos médicos. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_aslan2019/product_Industrial-Vegetables-Fruit-Nuts-Gas-Electric-Hot-Air-Circulating-Drying-Oven-Medical-Equipment-Tray-Dryer_rergheohg.html
 88. Wuxi Wiscon equipos mecánicos y eléctricos Co.Ltd. Alimentaria Industrial polvo fino molino de martillo de impacto Pulverizador de molienda de pin de la máquina para la yuca La cúrcuma de ajo sal la soja de hierbas y especias de la planta de cereales [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_powder-equipment/product_Industrial-Food-Fine-Powder-Grinder-Hammer-Pin-Impact-Grinding-Pulverizer-Machine-for-Garlic-Turmeric-Cassava-Salt-Soybean-Cereal-Herbal-Plant-and-Spices_uoghgyyiy.html
 89. Shanghai Kaiquan válvula máquina Co.Ltd. Tanque de chaqueta depósito mezclador de calentamiento de vapor con agitador de mezcla [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_sh-kaiquan/product_Steam-Heating-Mixing-Tank-Jacket-Tank-with-Mixing-Agitator_esrgyiurg.html
 90. Shanghai Bailun Biological Technology Co.Ltd. Industrial Fermentation Fermenter Price Bioreactor 100L [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. <https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/NdpTtHqrbMUh/China-Industrial-Fermentation-Fermenter-Price-Bioreactor-100L.html>

91. Hangzhou Lyshinar Machinery Co.Ltd. Filtros de cartucho plisados de PTFE hidrófobo de 0,22 micras para aire comprimido / nitrógeno filtration, 5"/10", código 7 [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_filtervessel/product_Hydrophobic-PTFE-0-22-Micron-Pleated-Cartridge-Filters-for-Compressed-Air-Nitrogen-Filtraion-5-10-Code-7_yuusesigin.html
92. Nanjing FiveMen Machine Co.Ltd. Lw tornillo horizontal decantador continuo Industrial Precio máquina separadora centrífuga [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_fivemen/product_Lw-Horizontal-Screw-Industrial-Continuous-Decanter-Centrifuge-Separator-Machine-Price_oysuyioeg.html
93. Qingdao Oyang Maquinaria Co.Ltd. Filtro de disco de acero inoxidable para la pantalla de agua residual de Acuicultura automática, filtro de tambor rotativo micro fino industrial para el tratamiento de aguas residuales [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_oyangtrade/product_Automatic-Aquaculture-Wastewater-Screen-Stainless-Steel-Disc-Filter-Industrial-Micro-Fine-Rotary-Drum-Filter-for-Sewage-Water-Treatment_uogurysngy.html
94. Henan Lanphan Industry Co.Ltd. Laboratorio de vacío Precio Rotovap Equipo con destilación de vidrio Industrial Mini Para Rotavap evaporador unidad China evaporador rotatorio [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_henanlanphan/product_Vacuum-Lab-Price-Rotovap-Equipment-with-Glass-Distillation-Industrial-Mini-for-Rotavap-Evaporation-China-Unit-Rotary-Evaporator_uosoysyog.html
95. NANBEI Instrument Limited. 1200C Alfarería de alta temperatura vidrio Calefacción Horno de cerámica [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_nanbei-china/product_1200c-High-Temperature-Pottery-Glass-Heating-Ceramic-Kiln-Lab-Muffle-Furnace-Electric-Chamber-Heating-Furnace_eyeinnyny.html
96. Suntek Print Company Limited. Prensa de calor de transferencia de sublimación de concha plana para impresión de camisetas [Internet]. Made-in-China, Connecting Buyers with Chinese Suppliers. 2024 [accessed 2024 Mar 18]. https://es.made-in-china.com/co_szsuntek/product_Flat-Clamshell-Sublimation-Transfer-Heat-Press-for-

- T-Shirt-Printing_euunsgooy.html
97. T&T Industry (Shenzhen) Co.Ltd. Gránulos De Phb Biodegradables,100% Virgen,Puro,Phb [Internet]. Alibaba. 2024 [accessed 2024 Mar 18].
<https://spanish.alibaba.com/product-detail/100-Virgin-Biodegradable-PHB-granules-PURE-1600454509526.html>
 98. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate], MW ~10,000 [Internet]. Pensilvania, EEUU: Polysciences, Chemistry beyond the ordinary. 2024 [accessed 2024 Mar 18].
<https://www.polysciences.com/india/polyr-3-hydroxybutyrate-mw-10000>
 99. Programa de apoyo a inversiones con impacto ambiental positivo - Financiamiento Verde [Internet]. Montevideo, Uruguay: ANDE. 2021 [accessed 2024 Mar 18].
<https://www.ande.org.uy/grupos-asistidos/item/linea-de-financiamiento-verde-sector-de-gestion-de-residuos.html>
 100. Metre J, Sorhuet V. Incentivos Fiscales con Impacto Ambiental. 2021.
 101. Punto Biz. Montan en el Gran Rosario la primera planta de bioplástico de Latinoamérica [Internet]. Argentina. 2022 [accessed 2024 May 5].
<https://puntobiz.com.ar/negocios/montan-en-el-gran-rosario-la-primera-planta-de-bioplastico-de-latinoamerica-20221130600>
 102. Sociedad Rural de Rosario. El caso Bionbax: Empresarios argentinos comenzarán a producir bioplásticos a escala industrial en Roldán desde el primer trimestre de 2024. [Internet]. Córdoba 1826. 2024 [accessed 2024 May 5].
<https://ruralrosario.org/detalle/18678/El-caso-Bionbax-Empresarios-argentinos-comenzaran-a-producir-bioplasticos-a-escala-industrial-en-Roldan-desde-el-primer-trimestre-de-2024.html>
 103. Koller M, Salerno A, Reiterer A, Malli H, Malli K, Kettl K-H, Narodslawsky M, Schnitzer H, Chiellini E, Braunegg G. Sugarcane as Feedstock for Biomediated Polymer Production. Chapter. 2012.
https://www.researchgate.net/publication/231182807_Sugarcane_as_Feedstock_for_Biomediated_Polymer_Production
 104. Danimer Scientific. PHA: Beginning of Life [Internet]. Estados Unidos. 2024 [accessed 2024 May 5]. <https://danimerscientific.com/pha-beginning-of-life/>
 105. BioCycle. 100% Biopolymer Rum Bottle [Internet]. Estados Unidos. 2020 [accessed 2024 May 5]. <https://www.biocycle.net/100-biopolymer-rum-bottle/>

8. Anexos

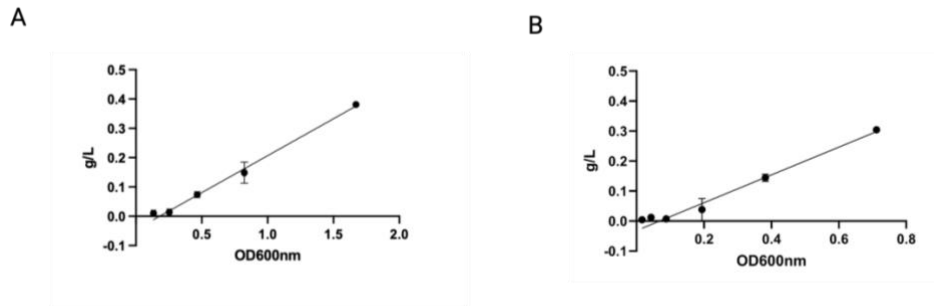


Figura A1. Curva de correlación entre concentración de OD_{600nm} y concentración en g/L de biomasa. La imagen A corresponde a *B. ginsengi* y la imagen B a *C. necator*.

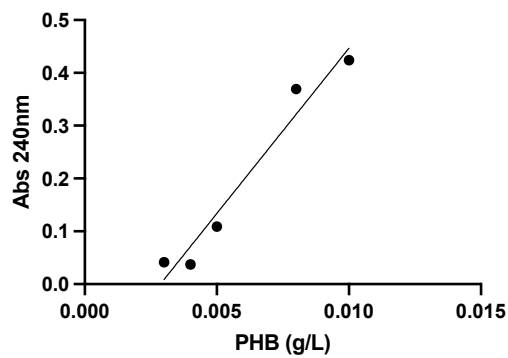


Figura A2. Curva de correlación entre concentración de PHB en g/L y Abs a 240 nm ácido crotonico.

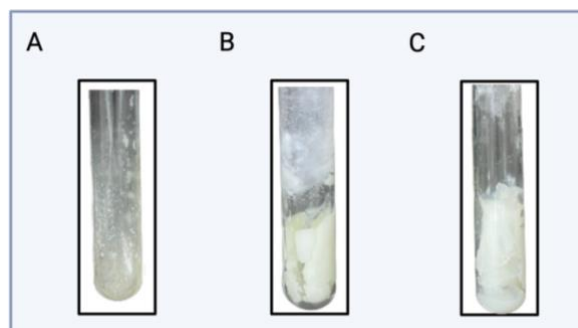


Figura A3. Exopolímero obtenido a partir del cultivo de resting cells de *C. necator*. (A) corresponde a la condición sin diluir. (B) corresponde a la dilución 1:2. (C) corresponde a la dilución 1:5.

Tabla A1. Valores obtenidos por duplicado de glucosa (g/L) y fructosa (g/L) de *resting cells* para *B. ginsengi* (BG) y *C. necator* (CN) por HPLC. SD corresponde a la condición sin diluir, 1:2 a dilución al medio y 1:5 dilución al quinto.

	Glucosa (g/L)		Fructosa (g/L)	
BG SD 0	5,06290127	4,23012214	7,31677304	5,9686777
BG SD 4	2,83457196	5,06349065	3,19130435	7,10721978
BG SD 20	5,18911637	5,30109872	7,6366075	7,56174711
BG SD 29	4,87598791	5,21202257	7,16260471	7,56463901
BG SD 45	5,14314467	5,37216689	6,9716793	7,4444655
BG SD F	4,95874812	5,2008562	6,76274432	7,35137615
BG 1:2 0	2,33990984	2,16892171	3,20200937	2,92050259
BG 1:2 4	2,40560589	2,09379557	3,35440267	2,74954128
BG 1:2 20	2,37898021	2,17036331	3,00005983	2,75949342
BG 1:2 29	2,48501698	2,12295797	2,83036996	2,76420523
BG 1:2 45	2,40011031	2,00604952	2,71196151	2,38749003
BG 1:2 F	2,43895369	2,00385925	2,49004288	2,36812425
BG 1:5 0	1,03097475	1,09304292	1,02038293	1,03057439
BG 1:5 4	0,99346146	1,07133937	0,97996111	1,00713502
BG 1:5 20	1,00929907	1,03913847	0,83312724	0,85829677
BG 1:5 29	0,99445703	0,90709726	0,72954727	0,58484244
BG 1:5 45	0,97660437	0,92672205	0,50908955	0,47054248
BG 1:5 F	0,95094639	0,91558753	0,54168827	0,41694256
CN SD 0	3,69204933	4,26599472	4,97552852	4,26599472
CN SD 6	3,33910581	4,13542298	4,26352214	4,13542298
CN SD 22	0	4,02946984	4,19985042	4,02946984
CN SD 29	0	4,0889734	3,96132828	4,0889734
CN SD 35	0	4,06280171	3,40895493	4,06280171
CN SD F	0	4,07601499	3,13888113	4,07601499
CN 1:2 0	2,02234112	2,03234864	2,77080674	2,72669027

CN 1:2 4	1,86995034	2,03538316	2,67918827	2,5900728
CN 1:2 21	1,91983266	1,93533975	1,71538692	1,49899282
CN 1:2 27	1,85208175	1,83024678	0,6495363	0,78833765
CN 1:2 44	0,78100959	1,77324012	0	0
CN 1:2 F	1,53910462	1,73200338	0	0
CN 1:5 0	0,88644106	0,90391938	1,07380834	0,91586059
CN 1:5 6	0,71080956	0,92516098	0,57424212	0,86698744
CN 1:5 22	0,46836698	0,46132228	0	0
CN 1:5 29	0,27021556	0,31028151	0	0
CN 1:5 35	0	0	0	0
CN 1:5 F	0	0	0	0

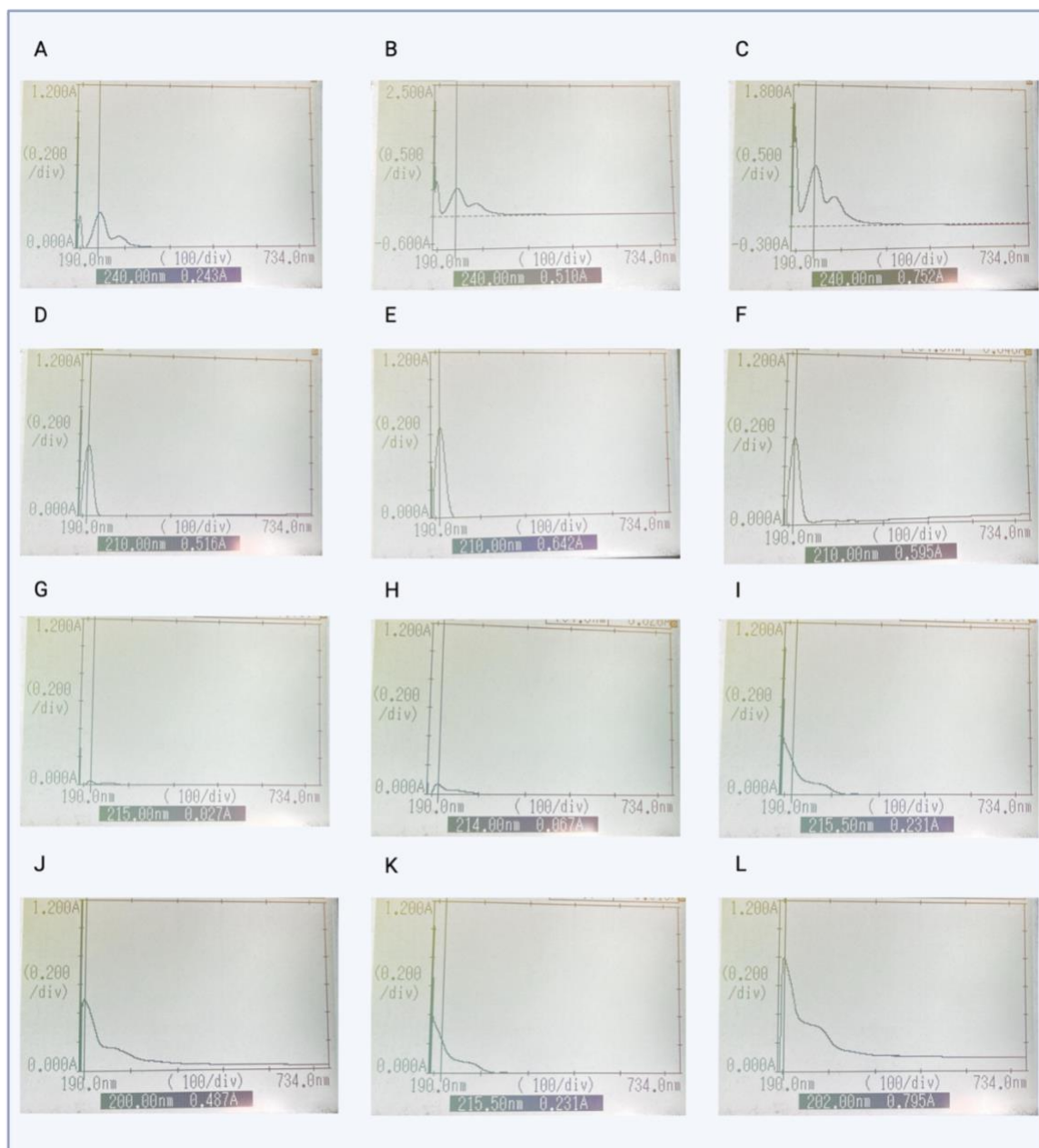


Figura A4. Espectros obtenidos para la medición de ácido crotonico. A) Estándar industrial a 5 minutos. B) Estándar industrial a 10 minutos. C) Estándar industrial a 15 minutos. D) Estándar biológico a 5 minutos. E) Estándar biológico a 10 minutos. F) Estándar biológico a 15 minutos. G) Muestra de *B. ginsengi* a 5 minutos. H) Muestra de *B. ginsengi* a 10 minutos. I) Muestra de *B. ginsengi* a 15 minutos. J) Muestra de *C. necator* a 5 minutos. K) Muestra de *C. necator* a 10 minutos. L) Muestra de *C. necator* a 15 minutos.

**Tabla A2 Cálculos de producción de PHB a nivel industrial utilizando la bacteria
*B.ginsengi***

Relación orujo generado por uva procesada	Cálculos	
Duración de la temporada de vendimia (días)		
50		
Uva procesada (%)	Orujo de uva (%)	
100	12	
Uva procesada por temporada en la bodega (Kg)		
700000	Dato brindado por la bodega	
Orujo generado por temporada en bodega (Kg)		
84000	$700000 \cdot 0,12$	
Producción de PHB con <i>Bhargavaea ginsengi</i>		
Sustrato inicial (g/L)	0,38	

Sustrato final (g/L)	0	
Producto inicial (g/L)	0	
Producto final (g/L)	0,27143	
Biomasa (g/L)	0,59429	
$Y_{p/x}$ (g/L)	0,456730769	$\frac{(0,27143 - 0)}{(0,38 - 0)}$
Datos de la hidrólisis		
Masa de orujo (g)	150	Fracción de orujo de uva en polvo usada en hidrólisis ácida
Volumen de hidrolizado (mL)	300	Fracción de agua utilizada en hidrólisis ácida
Relación azúcar extraído por orujo hidrolizado		
Orujo (Kg)	Azúcar (Kg)	
0,15	0,00283	
Azúcar en hidrolizado (g/L)		
9,43333	$\frac{(2,83 * 1000)}{(300)}$ $\frac{((1000 \text{ mL}) \cdot (\text{azúcar extraído en 300 mL de hidrolizado}))}{(300 \text{ mL de hidrolizado})}$	
Azúcar obtenido por		

temporada (Kg)		
1584,8	$\frac{(84000 \cdot 0,00283)}{(0,15)}$ $\frac{((Orujo procesado por temporada) \cdot (azúcar extraído en 0,15 kg))}{(0,15 kg de orujo)}$	
Volumen de hidrolizado por temporada (L)		
168000	$\frac{((1584,8 \cdot 1000))}{(9,43333)}$ $\frac{(msa de azúcar obtenida por temporada)}{(concentración de azúcar en hidrolizado)}$	
Volumen de medio por temporada (L)		
4200000	$\left(\frac{168000 \cdot 1000}{40} \right)$ $\left(\frac{Volumen de hidrolizado por temporada \cdot 1000 mL}{Concentración de hidrolizado en el medio de cultivo} \right)$ <p>Densidad de hidrolizado = 1g/mL</p>	
Proceso Batch		
Tiempo (h)	54	
Tiempo aproximado (días)	3 El producto de la división da 2,25 días, redondeamos a 3 días.	$\frac{54}{24}$
Se trabajó con un volumen de 25200 L por Batch		
Nº de Batch	166,66666	$\frac{4200000 \cdot 1}{25200}$

Nº de horas de producción		
9000	$166,66666 \cdot 54$ <i>Nº de Batch · horas de producción por Batch</i>	
Nº de días de producción		
375	$\frac{9000}{24}$ $\frac{Nº \text{ de horas de producción}}{\text{Horas en un día}}$	
Proporción de medio en el fermentador (%)		
70		
Volumen de fermentador (L)		
36000	$\frac{25200 \cdot 100}{70}$	
Volumen de 3 fermentadores (L)		
12000	$\frac{36000}{3}$	
<i>Downstream</i>		
Biomasa generada por Batch (g)	14976	$\frac{(25200 \cdot 0,594291)}{1}$ <i>Volumen de medio acumulado por Batch · Biomasa</i>
Biomasa generada en 375 días (g)	2496000	$14976 \cdot 166,66666$ <i>Biomasa generada por Batch · Nº de Batch en 365 días</i>

Relación entre biomasa y cloroformo		
Biomasa (g/L)	Cloroformo (mL)	
0,59429	5	
Volumen total de cloroformo por Batch (L)		
126	$\frac{14976 * 5}{0,59429 * 1000}$	
Volumen total de metanol (L)		
126		
PHB final en 375 días (Kg)		
1140	$\frac{0,456730769 * 2496000}{1000}$ $Y_P \cdot \frac{Biomasa\ generada\ por\ año}{\bar{x}}$	

Tabla A3. Listado de precios de equipos involucrados en la producción de PHB

Equipo	Precio (USD)	Cantidad	Precio total (USD)
Tanques con agitador hasta 700L	2000	7	14000
Tanque con agitador 12000L	30000	5	150000
Tanques de almacenamiento	1000	20	20000

Secadoras en bandeja	6500	2	13000
Molienda	350	1	350
Filtros de aire	49	7	343
Centrifuga hidrolisis		1	30000
Centrifuga batch		1	18000
Equipo filtrado		1	2000
Evaporador	2500	1	2500
Horno para vidrio		1	700
Prensa		1	99
Total			250992

Tabla A4. Listado de precios de componentes del medio YEM.

Medio	Precio (USD)
Triptona	50
NaCl	80
Extracto de levadura	500
(NH ₄) ₂ SO ₄ .	100
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O.	400
MgSO ₄ ·7H ₂ O 4.	200
Total	1330