

TREBALL DE RECERCA

DEL RESIDU AL BIOPLÀSTIC

ESTUDI DE LA IMPLANTACIÓ D'UN PROCÉS
DE PRODUCCIÓ DE BIOMATERIAL PLÀSTIC
A LA DEPURADORA DE TARRAGONA

VÍCTOR NADAL MARTÍNEZ

 Ematsa

 La
Salle
Tarragona

 VEnvirotech

AGRAÏMENTS

Abans de començar, m'agradaria agrair a totes les persones que han fet possible la realització d'aquest treball de recerca.

Començant per la meva tutora, Josepa Baz Vidal, a qui li agraeixo molt el seguiment que ha fet durant tot el procés d'elaboració i sobretot per la confiança que em va donar des del primer moment per tirar endavant aquest projecte.

En segon lloc, vull agrair també a EMATSA (Empresa municipal d'aigües de Tarragona S.A.) per oferir-me l'oportunitat de poder realitzar tota la part pràctica del meu estudi a les seves instal·lacions.

En especial, dono les gràcies a l'equip de microbiologia, Joan Bové i Toni Oliver, per ajudar-me a consolidar els coneixements sobre el món dels bacteris.

I també, gràcies a l'equip del laboratori físico-químic, particularment a Dolors Martínez, per ensenyar-me els diferents mètodes emprats en les pràctiques d'aquest treball.

Per altra banda, també vull agrair a Patricia Aymà Maldonado, *Co-founder* de Venvirotech Biotechnology, per haver-me atès i orientat en el món de la biotecnologia, sobretot pel que fa als biopolímers.

Finalment, voldria donar les gràcies a tots els que han dedicat el seu temps a ajudar-me i que han aportat el seu granet de sorra en aquest treball.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	5
1.1. HIPÒTESIS.....	5
1.2. OBJECTIUS PERSONALS	6
1.3. METODOLOGIA.....	6
2. MARC TEÒRIC	7
2.1. ELS PLÀSTICS.....	7
2.1.1. Situació actual dels plàstics.....	7
2.1.2. Tipus de plàstics	8
2.1.2.1. Plàstics d'origen petroquímic.....	8
2.1.2.2. Els bioplàstics.....	8
2.2. POLIHIDROXIALCANOATS	10
2.2.1. Propietats químiques dels PHA.....	11
2.2.2. Propietats físiques-mecàniques dels PHA.....	12
2.2.3. Aplicacions dels PHA.....	13
2.3. PRODUCCIÓ DE POLIHIDROXIALCANOATS.....	16
2.3.1. Principals bacteris productors de PHA.....	16
2.3.2.1. Bacteris gram-negatius.....	16
2.3.2.2. Bacteris gram-positius	16
2.3.2. Estructura i característiques del grànul de PHA	17
2.3.2.1. Proteïnes associades al grànul de PHA	17
2.3.3. Gens implicats en la síntesi de PHA	20
2.3.3.1. Informació genètica <i>Cupriavidus necator</i> (scl-PHA)	20
2.3.3.2. Informació genètica <i>Pseudomonas putida</i> (mcl-PHA)	20
2.3.4. Rutes metabòliques de PHA	21
2.3.4.1. Metabolisme de scl-PHA	21
2.3.4.2. Metabolisme de mcl-PHA	22
2.3.5. Extracció del PHA	24
2.3.6. Model industrial de producció de PHA	26
2.3.6.1. Model de producció de <i>Biopolis</i>	27
2.3.6.2. Model de producció de <i>Venvirotech Biotechnology</i>	28
2.4. BIOREFINERIA A UNA EDAR	29
2.4.1. Funcionament d'una EDAR	29
2.4.2. Model de producció de bioplàstics a partir de residus.....	29
2.4.2.1. Generació d'una font de carboni mitjançant els residus	30
2.4.2.2. Selecció de bacteris productors.....	30
2.4.2.3. Acumulació i extracció de PHA.....	30

3. MARC PRÀCTIC.....	31
3.1. BLOC EXPERIMENTAL I.....	32
PRÀCTICA I: COMPROVAR L'ESTAT DE LES <i>PSEUDOMONES</i>	32
RESULTATS PRÀCTICA I.....	33
CONCLUSIONS: PRÀCTICA I.....	34
PRÀCTICA II: CREIXEMENT DE LES <i>PSEUDOMONES</i>	34
PRÀCTICA II: PART I.....	35
PRÀCTICA II: PART II.....	36
RESULTATS PRÀCTICA II.....	37
CONCLUSIONS PRÀCTICA II.....	38
PRÀCTICA III: FERMENTACIÓ DELS FANGS.....	39
3.2. BLOC EXPERIMENTAL II.....	40
PRÀCTICA I: COMPROVACIÓ QUE EL BIOPOLÍMER PRODUÏT ÉS PHA.....	40
RESULTATS PRÀCTICA I.....	42
CONCLUSIONS PRÀCTICA I.....	43
PRÀCTICA II: EXTRACCCIÓ DEL PHA.....	43
RESULTATS PRÀCTICA II.....	45
CONCLUSIONS PRÀCTICA II.....	45
PRÀCTICA III: TIPUS DE PHA PRODUÏTS.....	46
RESULTATS PRÀCTICA III.....	48
CONCLUSIONS PRÀCTICA III.....	48
4. CONCLUSIONS.....	49
5. ANNEXOS.....	51
5.1. GLOSSARI.....	51
5.2. BIBLIOGRAFIA.....	53
5.3. WEBGRAFIA.....	54
5.4. MATERIAL COMPLEMENTARI.....	55

1. INTRODUCCIÓ

Des del primer moment vaig tenir clar que volia realitzar el meu treball de recerca sobre algun **tema innovador**, que aportés idees per minimitzar la quantitat de residus plàstics que arriben a la biosfera. Per això, vaig voler aprofundir en el camp dels **bioplàstics**.

Un dia escoltant un programa científic a la radio, vaig sentir parlar sobre els **Polihidroxicanoats (PHA)**. En l'entrevista deien que el PHA era un bioplàstic biodegradable amb una versatilitat inimaginable, donat la gran quantitat de tipus que existeixen. Encara així, actualment, la fabricació d'aquest material **nature-friendly** és molt baixa en comparació amb el total de plàstics del mercat. Principalment l'alt cost de producció li genera un elevat preu i provoca que no sigui un material competitiu.

Buscant més informació sobre aquest tipus de material vaig veure que hi ha dos principals problemes a l'hora de produir-lo. Per una banda, aconseguir bacteris productors de PHA i, per altra banda, tenir una matèria prima de carboni per fer de substrat alimentari.

Al pensar en el tema dels bacteris em vaig recordar d'una excursió que vaig fer a l'EDAR de Tarragona amb l'escola. Aquí ens van explicar que els principals responsables de la degradació de la matèria orgànica de les aigües residuals són els bacteris que es troben concentrats en els llots actius.

Això em va fer plantejar el següent: Si es pogués comprovar que els **bacteris** presents als **llots actius** fossin capaços de produir PHA mitjançant **residus orgànics**, seria possible reduir el seu preu i s'aconseguiria que fos un tipus de plàstic molt més comercial. A part, també es crearia una **economia circular** amb la qual es podrien obtenir molts més beneficis econòmics i mediambientals.

És per això, que el present treball de recerca planteja la possibilitat d'obtenir un material **d'alt valor afegit** com són els PHA, a partir dels residus orgànics **de les aigües residuals de Tarragona**.

1.1. HIPÒTESIS

1. Hipòtesi principal

És possible l'obtenció de bioplàstic a partir dels residus que arriben a la depuradora de Tarragona

Objectiu

- Utilitzar els llots i els residus de la depuradora de Tarragona per produir bioplàstic, en concret, polihidroxicanoats (PHA).

2. Hipòtesi secundària

Els bacteris de la depuradora de Tarragona tenen més potencial productori que un cultiu de *Pseudomonas* (bacteris productors de PHA).

Objectiu

- Comparar els avantatges i els desavantatges que té la utilització d'un cultiu pur^{*1} i un cultiu mixt* de bacteris per a un model de producció industrial de bioplàstics.

¹ Les paraules marcades amb un asterisc (*) seran definides al final del treball en l'apartat GLOSSARI.

3. Hipòtesi terciària

- El tipus de substrat amb el qual s'alimenten els bacteris influeix en la quantitat de PHA produït.
- El temps de producció pot variar depenent de com sigui el substrat.
- Un mateix bacteri pot produir diferents tipus de PHA.

Objectiu

- Comprovar dades rellevants en la producció de PHA mitjançant diferents pràctiques experimentals. Com per exemple, establir el temps de producció que es necessita i quins tipus de PHA es poden obtenir.

1.2. OBJECTIUS PERSONALS

A part de les hipòtesis que es volen comprovar en aquest treball, també m'he proposat un seguit d'objectius personals per poder aprofitar al màxim aquesta experiència.

Un dels meus principals objectius és tenir l'oportunitat d'iniciar-me en un món científic, obtenint experiència laboral en un laboratori de microbiologia. Per altra banda, m'il·lusiona el fet d'aportar nous coneixements per tal de buscar un millor futur per a la societat.

També voldria millorar les meves capacitats de síntesi i redacció d'informació, de comunicació i d'exposició d'un tema d'interès científic, com són els bioplàstics.

1.3. METODOLOGIA

A través d'una **observació** del món actual veiem que no s'estan fent les coses bé i és necessari buscar solucions, és en aquest moment que comencen a aflorar idees sobre com podria ser el món del futur.

Amb la recerca d'aquestes idees comença el treball d'investigació, on s'estableix la possible idea com **una hipòtesi**, la qual s'haurà de **comprovar experimentalment** en un treball de camp del qual s'obtindran els **resultats** que ens permetran **concloure** si l'idea és vàlida o no.

D'aquesta manera, el treball comença amb una recerca d'informació sobre els polímers, els plàstics convencionals, els bioplàstics, els polihidroxicanoats i el procés de producció de PHA, que es trobarà dins del marc teòric.

Aquesta informació ens permetrà tenir els coneixements necessaris per poder dissenyar el marc pràctic, que constarà d'un seguit de pràctiques on es realitzarà el procés de producció de PHA amb un cultiu mixt extret dels llots de la depuradora de Tarragona i un cultiu pur de *Pseudomonas putida* KT2442 (bacteri productor de PHA).

2. MARC TEÒRIC

2.1. ELS PLÀSTICS

El plàstic és un material immensament versàtil, ideal per a un ampli abast d'aplicacions industrials i de consum. La qualitat que caracteritza als plàstics és la seva baixa densitat, que aporta als productes el benefici de la lleugeresa. Poden actuar com aïllants tèrmics i elèctrics, encara que també es poden sintetitzar plàstics que condueixen la calor a baixes temperatures i l'electricitat. A part, són resistents a la corrosió que provoquen moltes substàncies i materials, el que fa que siguin duradors.

Els plàstics es poden modelar fàcilment per obtenir qualsevol forma que desitgem, propietat que els fa ideals per a infinites aplicacions i permet el reciclatge. I si tot això encara no fos suficient, es pot modificar la seva estructura amb farciments, pigments, espumes, capes ignífugues, plastificants, etc, per satisfer qualsevol aplicació específica.



*Imatge 1. Diferents tipus de plàstics amb diferent pigmentació.
Procedència: <https://www.plasticseurope.org/es>*

2.1.1. Situació actual dels plàstics

Els plàstics estan presents en la majoria d'objectes que tenim al nostre voltant, sobretot per a la fabricació d'envasos i embalatges. També els podem trobar en sectors tan diversos com el sanitari, l'agricultura i la ramaderia. La polivalència i el baix cost de fabricació han facilitat la seva implantació, i l'han convertit en un material imprescindible per als éssers humans.

Però la utilització dels plàstics convencionals presenta inconvenients importants. Un d'ells és que la majoria dels plàstics tenen un origen derivat del petroli i la seva producció en les indústries petroquímiques genera impactes mediambientals importants.

Un altre inconvenient és la gran quantitat de residus plàstics que es produeixen al ser un material difícil de degradar de forma natural; una simple ampolla pot tardar uns 500 anys a descompondre's. El reciclatge és una solució a aquest problema, però segons l'organització ecologista *Greenpeace* només un 30% dels plàstics es reciclen a Espanya i un 9% a escala mundial segons *National Geographic*. Això es deu a l'alt cost que té aquest procés. Com a conseqüència, avui en dia, trobem residus plàstics en llocs inimaginables. Com per exemple, els microplàstics (residus plàstics de menys de 5 mil·límetres de llargada) ja són presents a la cadena tròfica.

No obstant això, la gran dependència que té l'espècie humana per a aquest material, fa que no ens puguem despendre d'ell tan fàcilment, i estiguem obligats a trobar alternatives sostenibles.

2.1.2. Tipus de plàstics

Avui en dia la societat s'ha acostumat a utilitzar el terme "plàstic" com si es tractés d'un únic material, però en realitat aquest terme fa referència a una gran família de materials amb propietats molt diverses. Cada plàstic està dissenyat amb unes característiques específiques que el fan òptim per l'aplicació per la qual està destinat.

Aquests plàstics poden diferenciar-se segons el seu origen, ja que poden tenir un origen petroquímic com a derivats del petroli o ser d'origen natural (bioplàstics).

2.1.2.1. Plàstics d'origen petroquímic

Aquest tipus de plàstic prové del petroli i és un dels materials més present al món. Per altra banda, té l'inconvenient que després de fer-lo servir es converteix en residu de difícil degradació natural. Però, no ens podem dependre fàcilment d'ell perquè aquest material és un dels principals pilars de la societat moderna.

Els principals plàstics d'origen petroquímic que podem trobar són:

- POLIETILÈ (PE)
- POLIPROPILÈ (PP)
- CLORUR DE POLIVINIL (PVC)
- POLIURETÀ (PUR)
- TEREFTALAT DE POLIETILÈ (PET)
- POLIESTIRÈ (PS)

Tots aquests plàstics, menys el poliuretà (PUR), pertanyen a la família dels termoplàstics, això vol dir que es poden escalfar, modelar i refredar diverses vegades, característiques que donen la possibilitat de reciclar-lo. En cas del PUR, que pertany a la família dels termoestables, una vegada s'escalfa, es modela i es refreda, no es pot tornar a escalfar per a recuperar-lo.

D'aquesta manera es pot dir que la gran majoria dels plàstics d'origen petroquímic, quasi un 80%, són reciclables. Desgraciadament, però, això no es compleix i aquests productes plàstics acaben en abocadors o en la mateixa natura sense reciclar.

2.1.2.2. Els bioplàstics

Els biomaterials plàstics (bioplàstics), es presenten com una alternativa real i necessària que solucionen els problemes dels plàstics convencionals.

Anomenen bioplàstics a tots aquells polímers que procedeixen de fonts renovables d'origen biològic, que mantenen característiques similars als plàstics produïts a partir del petroli. Aquests biomaterials s'han presentat com una solució per poder seguir produint polímers sense esgotar les reserves de petroli i evitar problemes mediambientals. Però no s'ha d'associar el terme "bioplàstic" amb la qualitat de ser biodegradables, ja que la biodegradabilitat es defineix com la propietat que tenen els materials de poder ser degradats, convertits a molècules més simples, de forma totalment natural. Per això hem

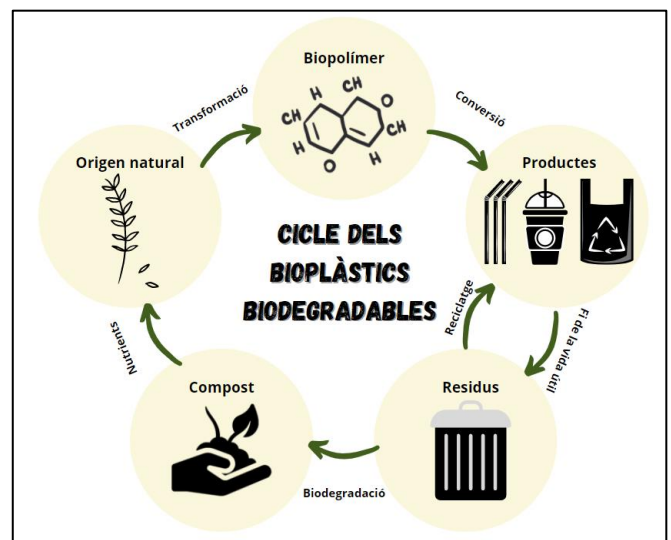


Figura 1. Diagrama del cicle dels bioplàstics biodegradables
Pàgina | 8

de fer una diferenciació entre els bioplàstics no biodegradables que són aquells que s'obtenen de forma natural, però que no es poden degradar a la natura, i els bioplàstics biodegradables que són tots els polímers que se sintetitzen i es degraden de forma 100% natural formant un cicle. Aquests últims són els únics que tenen la possibilitat de poder substituir els plàstics convencionals, establint una economia cada vegada més circular (sense residus) i eficient amb l'ús dels recursos plàstics.

El 2019 la producció de plàstic assolí un increment respecte als anys anteriors i també va ser el primer any on la producció de bioplàstics biodegradables superava a la dels no biodegradables. Aquestes xifres suposen les primeres passes cap a un futur sense tants residus plàstics, però com també es pot apreciar al gràfic (*Figura 2*), la producció total de bioplàstics el 2019 va ser de 2,11 milions de tones, el que suposa només el 0,5% de la producció anual de plàstic que és d'uns 360 milions de tones.

Aquesta xifra segurament descendeixi el 2020 a causa de la pandèmia provocada pel SARS-CoV-2, una situació que ha provocat un augment de la producció de plàstic d'origen petroquímic a causa de la necessitat d'equips de protecció com les mascaretes, els guants, material mèdic i roba d'un sol ús.

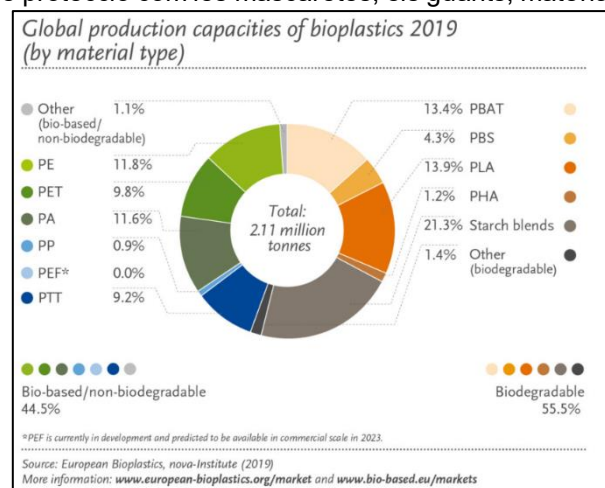


Figura 2. Gràfic de la producció de bioplàstics al 2019

Dins del grup de bioplàstic biodegradables és on trobem als Polihidroxialcanoats (PHA). Aquest tipus de biopolímer de procedència bacteriana es postula com un dels millors successors dels plàstics amb origen petroquímic. En tractar-se d'un compost polimèric que utilitzen diversos bacteris com a molècula de reserva energètica, podem trobar PHA de diferents tipus i amb característiques i propietats diferents.

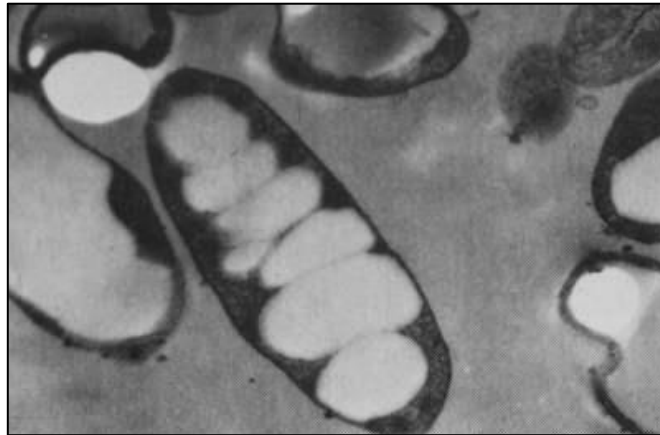
Però tal com es pot apreciar al gràfic (*Figura 2*), la producció de PHA només representa un 1,2% de la producció anual de bioplàstics, donat que la seva fabricació és més complicada que la d'altres polímers d'origen natural.

Per tal d'aprofundir en l'estudi del procés de producció de PHA, es presenten els següents apartats del marc teòric del present treball de recerca, que estan dedicats exclusivament a aquest tipus de bioplàstic biodegradable. També s'explicarà com els bacteris arriben a produir aquest bioplàstic. Finalment, es conclourà amb l'exposició d'un mètode de producció industrial de PHA, basat en la utilització dels bacteris presents en les plantes depuradores d'aigües residuals. D'aquesta manera es poden generar productes de valor afegit a la vegada que es realitza el procés de depuració de les aigües.

2.2. POLIHIDROXIALCANOATS

Tal com s'ha comentat anteriorment, els polihidroxicanoats (PHA) són una classe de polímers biodegradables sintetitzats intercel·lularment per bacteris, acumulats en grànuls al citoplasma* que poden arribar a constituir el 90% del pes sec cel·lular. Una vegada extrets, aquests biopolímers poden tenir unes propietats semblants als plàstics d'origen petroquímic (PP, PE, PET, etc.).

Encara que el seu descobriment va ser el 1888, no va ser fins al 1958 quan es van reportar les primeres funcions per aquest nou material, i no va causar un gran interès científic fins a finals del segle XX.



Imatge 2. Grànuls de PHA a l'interior d'un bacteri

Procedència: <https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/10/polihidroxicanoatos-pha.html>

Els PHA tenen un origen evolutiu, ja que els bacteris ho produeixen i ho acumulen com un dipòsit de carboni i energia. El seu significat biològic es basa en la possibilitat de tenir reserves que es poden transformar en substrat energètic per quan hi ha una manca de nutrients al medi.

La producció de PHA comença quan el bacteri es troba en condicions de limitació d'algun nutrient bàsic, com pot ser el nitrogen (N₂), magnesi (Mg), oxigen (O₂) o fòsfor (P), i té un excés de carboni (C) al seu entorn.

Fins al moment, s'han identificat més de 300 tipus de gèneres bacterians que poden formar PHA. Les diverses combinacions d'aquests monòmers (més de 150 combinacions registrades) dona com ha resultat un nombre elevat de polímers amb diverses propietats.

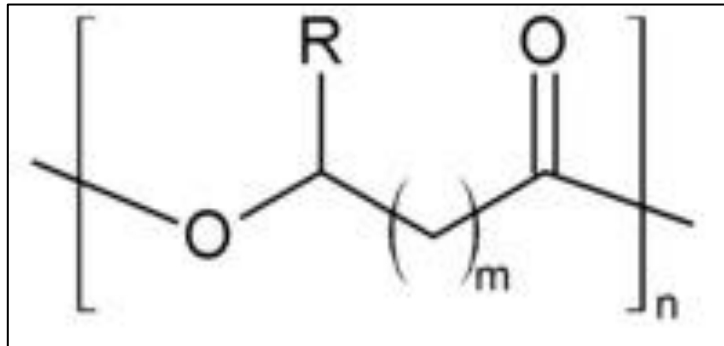
A part, s'han trobat altres microorganismes que són capaços de degradar l'estructura de PHA en la natura, per això es pot afirmar que són uns bioplàstics biodegradables.

Una de les propietats especials que fa que aquests polímers tinguin un gran interès científic, és la biocompatibilitat que tenen amb els éssers vius. Els PHA no són tòxics per l'organisme humà a diferència d'altres plàstics d'origen petroquímic, que sí que ho són. Això ofereix un gran ventall d'aplicacions en els sectors de la medicina, la biomedicina i la biotecnologia, com la fabricació de càpsules per a fàrmacs, pròtesis o material mèdic.

El seu origen 100% natural, la biodegradabilitat, la biocompatibilitat, i el fet de ser un polímer reciclable, han convertit als PHA en uns dels biopolímers més prometedors per substituir els plàstics convencionals.

2.2.1. Propietats químiques dels PHA

Tots els PHA que s'han identificat són polièsters lineals compostos majoritàriament per monòmers d'àcid 3-hidroxicarboxílic, encara que també hi ha casos menys freqüents compostos per àcids 4-, 5- o 6-hidroxicarboxílics. D'aquesta manera, tots els monòmers que constitueixen els PHA són enantiòmers* de R, amb el centre quiral* al carboni 3, excepte aquells casos especials on està al carboni 4, 5 o 6.



Imatge 3. Estructura dels polihidroxiàlcànòats (PHA)

Procedència: <https://es.wikipedia.org/wiki/Polihidroxiàlcànòato>

La unió dels monòmers de PHA es produeix gràcies a la formació d'un enllaç èster* entre el grup carboxil (-COOH) d'un monòmer i el grup hidroxil (-OH) del següent. Els monòmers tenen una cadena lateral que es troba al carboni 3 (o 4, 5, 6 en els casos menys freqüents), un radical* molt variable que normalment té una llargada entre C₁ i C₁₃ i que pot ser alquil, aromàtic, halogenat, ramificats, etc. Aquesta variabilitat és la que proporciona als polímers de PHA la seva àmplia gamma d'aplicacions.

Amb un nombre tan gran de tipus de polímers, és necessari fer una classificació. Actualment la classificació més acceptada és la referent a la llargada dels monòmers, on es pot trobar els PHA de cadena curta (scl-PHA), constituïts per monòmers de 3 a 5 carbonis, els de cadena mitjana (mcl-PHA), on els seus monòmers tenen de 6 a 14 carbonis, els de cadena llarga (lcl-PHA), que tenen més de 14 carbonis, i també podem trobar híbrids que tinguin monòmers de cadenes de diverses llargades (scl-mcl-PHA).

Símbolo	Nombre del monómero	Tamaño de la cadena (# de carbonos)	Posición del grupo hidroxilo
3HP	Ácido 3-hidroxi-propiónico	3	3
3HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	4	3
3HV	Ácido 3-hidroxi-valérico	5	3
3HHx	Ácido 3-hidroxi-hexanoico	6	3
3HHp	Ácido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Ácido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Ácido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Ácido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Ácido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Ácido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Ácido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Ácido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Ácido 4-hidroxi-butírico	4	4
4HV	Ácido 4-hidroxi-valérico	5	4
4HHx	Ácido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Ácido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Ácido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Ácido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Ácido 5-hidroxi-valérico	5	5
5HHx	Ácido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Ácido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

Figura 3. Taula dels principals monòmers que conformen els PHA produïts per bacteris

Procedència: Y. González García et al., Rev. Int. Contam. Ambie., 2013 Pàgina | 11

2.2.2. Propietats físiques-mecàniques dels PHA

Per exposar les diferents propietats físiques-mecàniques dels PHA s'utilitzarà la classificació exposada a l'apartat anterior, donat que aquestes propietats depenen majoritàriament de la llargada que tinguin els monòmers i per tant, de la quantitat de carbonis que té.

- **Scl-PHA:** Els PHA de cadena curta es caracteritzen per tenir un alt grau de cristal·lització, una alta transició vítria* (entre -13 i 4 °C), una alta temperatura de fusió (180 °C) i un alt pes molecular (200.000-3.000.000 Daltons, Da). Els scl-PHA també tenen una força de tensió* que varia entre 30 i 40 MPa (Megapascals) i un baix allargament previ a la ruptura. Cal destacar com a excepció el poli-(4HB), l'únic scl-PHA natural sense quiralitat als seus monòmers, que arriba a tenir un allargament previ a la ruptura del 1000%, el que fa que sigui el més elàstic de tots els PHA.
- **Mcl-PHA:** Al contrari que els scl-PHA, els mcl-PHA tenen baix grau de cristal·lització, una baixa transició vítria (entre -25 i -40 °C), una baixa temperatura de fusió (entre 45 i 60 °C) i una massa molecular inferior (entre 160.000 i 360.000 Da). Els mcl-PHA també tenen una força de tensió més baixa que els scl-PHA (10 MPa), però són més elàstics i el seu allargament previ a la ruptura és del 100%. A part, els mcl-PHA permeten incorporar grups funcionals que confereixen a aquests polímers altres propietats.
- **Lcl-PHA:** Aquest tipus de PHA són els menys freqüents, quasi cap bacteri estudiat fins a l'actualitat produeix PHA de cadena llarga, com a conseqüència, no s'han pogut arribar a estudiar molt les seves propietats.

Els PHA també presenten la possibilitat de formar copolímers, una característica que ens permet fusionar diferents PHA per crear altres amb unes millors propietats per l'ús que se li vulgui donar.

Per exemple, el poli (3-hidroxibutirat) P3HB que és rígid, però no resisteix molta tensió i la seva alta temperatura de fusió és una temperatura molt propera a la descomposició tèrmica del polímer.

Per aquestes raons els científics s'han centrat en la recerca de diversos copolímers amb millors propietats com el poli (3-hidroxibutirat-co-4-hidroxibutirat) [P(3HB-4HB)], que té una temperatura de fusió més baixa, un major allargament previ a la ruptura i no és tan trencadís. En aquesta recerca de copolímers, també destaca el poli (3-hidroxibutirat-co-3-hidroxi valerat) [P(3HB-3HV)], que té unes propietats que el fan òptim per a la fabricació d'envasos per líquids i gasos, al ser menys rígid i més resistent.

Polímero	Temperatura de fusió (°C)	Mòdul de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transició (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1.5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0.7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1.7	34.5	400	45
Polietileno-terafalato	262	2.2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3.1	50	*	21
Nylon- 6,6	265	2.8	83	60	*

Figura 4. Taula amb propietats físiques de diferents tipus de PHA i la seva comparació amb les propietats físiques de plàstics derivats del petroli

Procedència: Y. González García et al., Rev. Int. Contam. Ambie., 2013

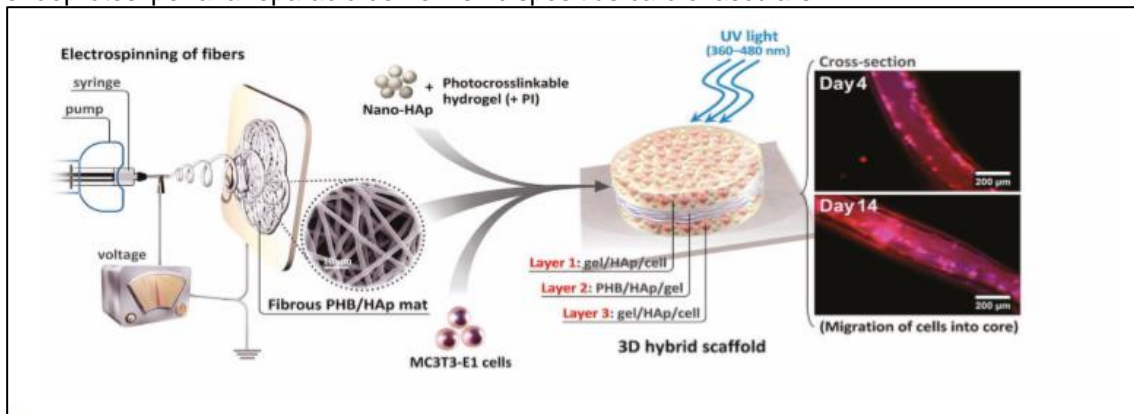
2.2.3. Aplicacions dels PHA

Com s'ha vist en l'apartat anterior, els PHA són polièsters naturals amb un pes molecular relativament alt, amb característiques termoplàstiques o elastomèriques que els permet posicionar-se com a substituïts d'una gran varietat de plàstics convencionals amb un origen petroquímic.

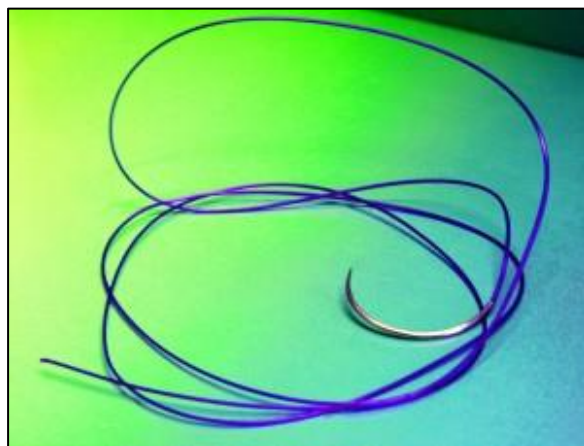
A les primeres investigacions, amb el P3HB com polímer principal, les aplicacions dels PHA es van centrar en la indústria de l'embalatge de consum, com ampolles i envasos cosmètics. Però donat l'alt preu de producció comparat amb els plàstics convencionals i la difícil producció i extracció de PHA pur, van fer que no s'arribés a comercialitzar a una gran escala.

Avui en dia, amb la millora dels processos de síntesi i els avenços en el camp de la biotecnologia i l'enginyeria genètica, s'ha aconseguit obtenir un ampli abast de PHA amb propietats potencials per a diversos àmbits:

Medicina i biomedicina: Aquestes aplicacions es basen en la propietat de biocompatibilitat que els PHA tenen amb el teixit humà. D'aquesta manera, quan s'implanta PHA al nostre cos, s'hidrolitza* en metabòlites biocompatibles i acaba desapareixent al cap de 6-12 mesos sense deixar cap resta tòxica. Per això les aplicacions biomèdiques del PHA són molt prometedores, ja que es podria utilitzar com fil de sutura i vàlvules per a intervencions internes sense necessitat d'una operació posterior per a la seva extracció. També es pot utilitzar com a substituïts d'empelts de teixits ossi i cartilaginós, endopròtesi per a la reparació de nervis i dispositius cardiovasculars.



Imatge 4. Esquema de la formació d'una xarxa amb molècules de PHA per a millorar la regeneració òssia *in vivo*
Precedència: A. Rodríguez-Conteras, *bioengineering*, 2020



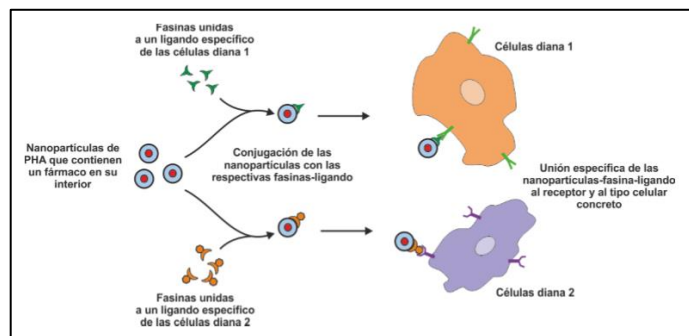
Imatge 5. TephaFLEX™, un fil de sutura fabricat amb P4HB que va ser aprovat per la FDA (Administració d'Aliments i Medicaments dels Estats Units) a l'any 2007

Precedència: <https://www.tepha.com/products/monofilament-suture/>

Administració de fàrmacs: De la mà de l'aplicació dels PHA en la medicina, s'ha passat a l'aplicació d'aquests biopolímers en el camp de desenvolupament de fàrmacs. Gràcies a les propietats de la biocompatibilitat i la impermeabilitat, els PHA s'han convertit en un material ideal per al sistema d'administració de fàrmacs. Un gran nombre de microorganismes secreten enzims* hidrolítics de PHA extracel·lulars (despolimerases de PHA i altres enzims) per a degradar els polímers de PHA en oligòmers i monòmers, que després actuen com nutrients dins de les cèl·lules. Aquesta degradació sol durar unes 52 setmanes, però el temps varia depenent de la composició del biopolímer, la cristallinització (la degradabilitat disminueix a mesura que augmenta la cristallinització general), la massa molecular (els biopolímers generalment es biodegraden més ràpidament quan la seva massa molecular és més baixa) i condicions ambientals (temperatura, nivell d'humitat, pH i subministrament de nutrients). La possibilitat de modificar el temps d'aquesta degradació fa dels PHA un material encara més interessant per properes innovacions en aquest camp.

Per aquests motius, actualment hi ha bastants estudis sobre la possibilitat de la fabricació de nanovehicles transportadors de fàrmacs fets amb PHA, en formes de partícules, esferes, micelles, liposomes, vesícules o càpsules, de manera que es pugui dirigir amb precisió el fàrmac al lloc on s'ha d'administrar.

Recentment, i com aplicació més important i innovadora per al futur, s'ha publicat una patent sobre la fabricació d'un sistema d'administració que comprèn nanopartícules de scl-PHA amb un fàrmac en forma de pastilla per erradicar el càncer.



Imatge 6. Representació esquemàtica de la utilització de nanopartícules de PHA per al transport de fàrmacs a tipus cel·lulars concrets

Precedència: José Ignacio Obeso Rodríguez, Tesis doctoral, 2017

Agricultura: En aquest camp s'utilitzen els scl-PHA com material per a fabricar recipients biodegradables per plantes i tubs d'irrigació per al reg. A part, utilitzant la degradació controlada que s'aplica a l'administració de fàrmacs, es poden dissenyar models per a l'alliberament controlat de factors de creixement, pesticides i plaguicides. D'aquesta forma, s'evita un desequilibri químic del sòl de conreu, perquè no hi haurà substàncies en excés.

Un avantatge de la producció de PHA per a l'agricultura és que no és necessari una alta purificació dels biopolímers, fet que facilita el procés d'extracció i el fa més econòmic.

Indústria alimentària: En els últims anys, els PHA s'han postulat com un dels millors candidats per substituir els plàstics no biodegradables que s'utilitzen per als envasos, gràcies a les seves propietats com la impermeabilitat, la no-toxicitat i la resistència que pot oferir. Per això ha sorgit el

projecte *BioBarr*, impulsat per la Unió Europea, que se centra a donar una resposta als reptes industrials i tecnològics de desenvolupar un nou envàs alimentari, totalment biodegradable amb prestacions òptimes. (<https://www.biobarr.eu>)

En aquest sector també es podrien utilitzar els PHA per a cobertures d'aliments, com per exemple pel cas dels formatges, ja que actualment moltes d'aquestes cobertures estan fetes de materials plàstics d'origen petroquímic.

Altres aplicacions: S'ha vist que els PHA es podrien utilitzar per a la fabricació de pintura, que incorporaria la propietat d'impermeabilitat. Aquesta pintura no només es faria servir per pintar superfícies d'obra, també serviria per a recobrir materials com el paper, el cartó i la fusta. D'aquesta manera, s'evitaria el deteriorament causat per la humitat d'aquests materials.

Els PHA també poden entrar al camp dels cosmètics, ja que tenen la propietat d'absorbir i retenir olis. Aquestes propietats aportarien una millor aplicació que les cremes i olis cosmètics que es troben al mercat avui en dia.

Com s'ha vist, els PHA tenen un gran potencial per poder-los aplicar en una diversitat de camps on substituirien els plàstics d'origen petroquímic no biodegradable. L'únic inconvenient que tenen per entrar en molts d'aquests camps, és el cost de producció. El preu de producció del polipropilè (PP) i el polietilè (PE) és d'uns 1,11-1,6 €/Kg, mentre que un quilo de PHA pot arribar a ser 3-4 vegades més car, entre 4,15-5,07 €/Kg (Martin Koller, 2020). Per això, encara que s'han fet molts avenços, avui en dia, el PHA no pot competir amb els plàstics convencionals en camps on el preu del material és important, com per exemple la indústria dels envasos alimentaris. Serà necessària més investigació per aconseguir una forma més econòmica de producció dels PHA.

Per altra banda, en un futur pròxim els PHA començaran a formar part de la medicina, la biomedicina o les farmacèutiques, on les prestacions del material es valoren més que el seu preu.

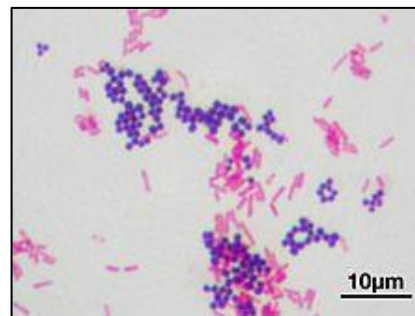
2.3. PRODUCCIÓ DE POLIHIDROXIALCANOATS

La producció i acumulació de PHA és un mètode natural que millora la supervivència dels bacteris productors. La possibilitat d'emmagatzemar aquest polímer els permet tenir un avantatge ecològic davant situacions d'estrès. El PHA dins la cèl·lula incrementa la resistència a l'osmosi* i als canvis de temperatura, a part permet mantenir activitats fisiològiques que necessiten altes dosis d'energia. D'aquesta manera els bacteris productors de PHA poden arribar a viure en indrets on altres no podrien fer-ho.

2.3.1. Principals bacteris productors de PHA

Actualment es troben més de 300 espècies bacterianes capaces de produir diferents tipus de PHA. Però, no qualsevol bacteri és vàlid per obtenir un bon model industrial de producció de PHA.

Es poden distingir dos grans grups de bacteris productors de PHA, en funció del seu resultat en la prova de tinció de Gram. Aquesta prova consisteix a tenyir-los amb violeta de metil i observar el resultat al microscopi òptic. Els bacteris que retenen el tint apareixen de color blau-violeta i es coneixen amb el nom de bacteris Gram-positiu. Per altra banda, els bacteris que no retenen el tint apareixen de color rosa i són coneguts com a bacteris Gram-negatiu.



Imatge 7. Tinció de Gram

Procedència: https://es.wikipedia.org/wiki/Tinción_de_Gram

2.3.2.1. Bacteris gram-negatius

Aquest tipus de bacteris han sigut els més estudiats per a la producció de PHA ja que són els que produeixen major quantitat. Cal destacar la *Cupriavidus necator*, un dels bacteris amb major potencial per a la producció de PHA, que pot utilitzar diversos substrats de carboni com els sucres, els àcids n-alcanoics i els olis vegetals arribant a un interval de 67 - 88,9% respecte a la seva massa seca cel·lular (%CDM) de PHA.

Com a principal espècie productora de mcl-PHA trobem les *Pseudomonas*, una espècie que és coneguda pel gran potencial bioremediador que té. Les *Pseudomonas* són capaces de degradar els àcids n-alcanoics, com la *P. Putida* mt-2 que produeix un 77% CDM de PHA utilitzant d'àcid octanoic i la *P. Putida* KT2440 que produeix un 75% CDM de PHA a partir d'àcid nonanoic. Aquest fet, permet transformar carbonis aromàtics tòxics contaminants com els BTEX (benzè, toluè, etilbenzè i xilens) i l'estirè en PHA.

2.3.2.2. Bacteris gram-positius

S'ha observat que diverses espècies bacterianes Gram-positiu també són capaces de produir PHA. Algunes d'elles són les espècies: *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* i *Streptomyces*.

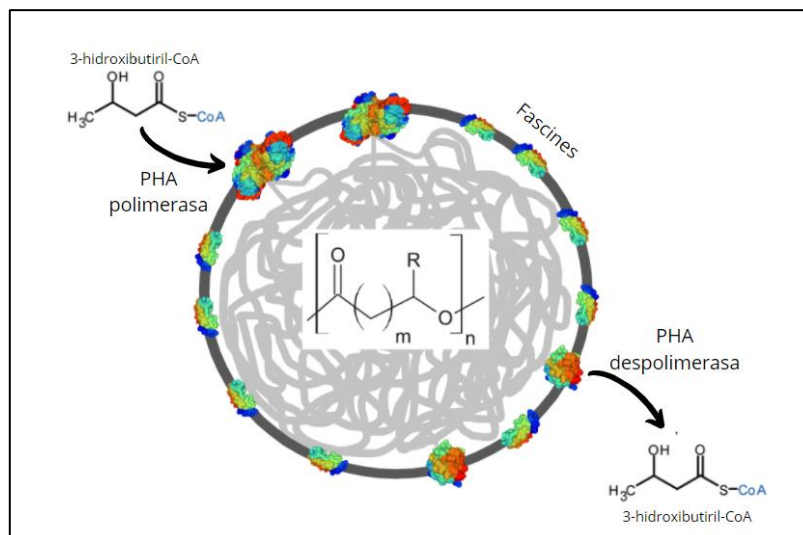
Però, aquests bacteris han estat menys estudiats, donada la seva menor producció de PHA, en comparació amb els bacteris Gram-negatius.

2.3.2. Estructura i característiques del grànul de PHA

Els PHA s'acumulen en forma de grànuls a l'interior del citoplasma cel·lular, d'aquesta manera no hi ha una alteració de la pressió osmòtica. Aquests grànuls, també anomenats carbosomes, tenen una mida d'uns 100 a 500 nm (nanòmetres) i poden arribar a suposar el 90% del pes sec de la cèl·lula.

Quan es va veure que aquest polímer s'emmagatzemava en grànuls es va pensar que la seva capa seria semblant a la membrana cel·lular, una bicapa fosfolipídica*. En estudis posteriors es va aconseguir aïllar el grànul de PHA, i la seva observació en un microscopi electrònic de transmissió (MET) va permetre calcular el gruix d'aquesta capa. El resultat va ser uns 4 nm, fet que descarta la bicapa perquè aquestes normalment tenen un gruix de 8 nm. Més recentment també s'ha descartat la presència de fosfolípids, i s'ha citat que seria una monocapa constituïda exclusivament per proteïnes. Donada la dificultat que té l'estudi d'aquests grànuls encara no es pot donar cap conclusió final, però molts científics ja han catalogat aquests carbosomes com uns orgànuls cel·lulars complexos en lloc de simples grànuls.

En el següent apartat, s'explicaran detalladament les proteïnes que s'han trobat associades a la capa externa del grànul i que, per tant, tenen una funció estructural important per al grànul de PHA. Dins del carbosoma també es troben altres proteïnes, però aquestes només tenen un caràcter enzimàtic i seran mencionades més endavant.



Imatge 8. Esquema representatiu d'un grànul de PHA

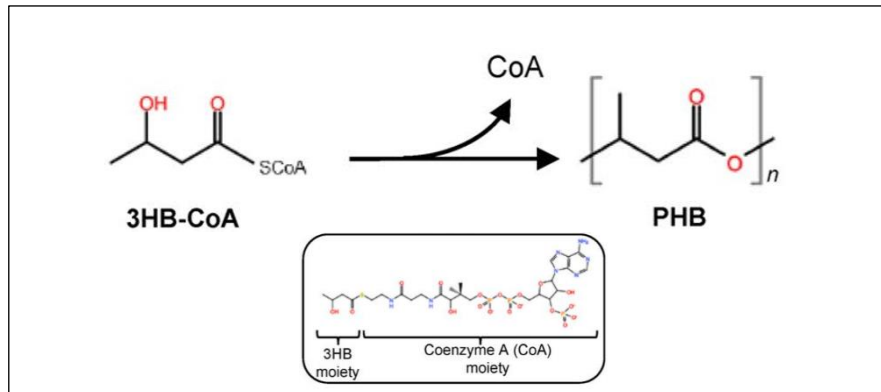
2.3.2.1. Proteïnes associades al grànul de PHA

Les proteïnes que constitueixen la capa exterior del grànul són les que han estat més estudiades. Actualment, se sap quines són les principals i també quines són les seves funcions. Per altra banda, també s'han notificat altres proteïnes amb funcions que encara són desconegudes.

A continuació es descriuran els principals tipus de proteïnes que es troben associades al grànul.

- **PHA sintasa:**

Són les responsables de la síntesi de les cadenes polimèriques que procedeixen dels monòmers, els quals són obtinguts mitjançant la font de carboni a través de les rutes metabòliques. Per aquesta raó, són uns enzims clau en el procés de la síntesi de PHA. A banda d'aquest caràcter enzimàtic, també formen part de la capa del grànul, per això també tenen una funció estructural.



Imatge 9. Esquema de la polimerització dels monòmers de PHA

Procedència: Chek et al, Scientific reports, NATURE, 2017

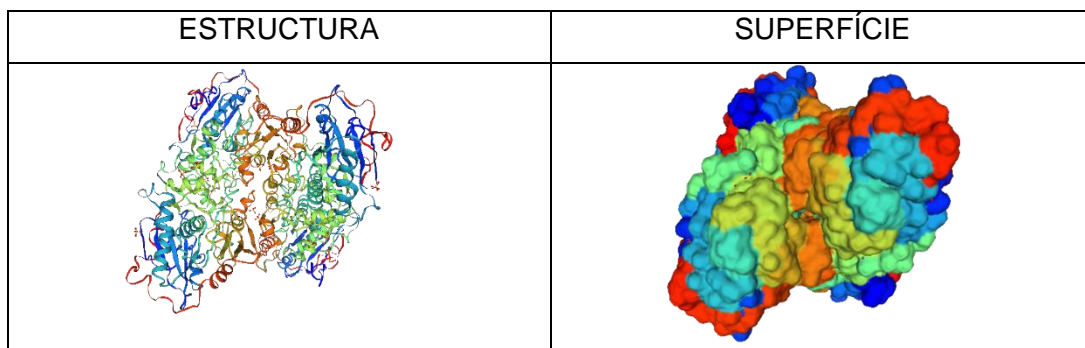


Figura 5. Estructura y superficie del homodímer de PhaC present en Cupriavidus necator

Procedència: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/A0A212MH45?csm=A822F35CF70D8B68>

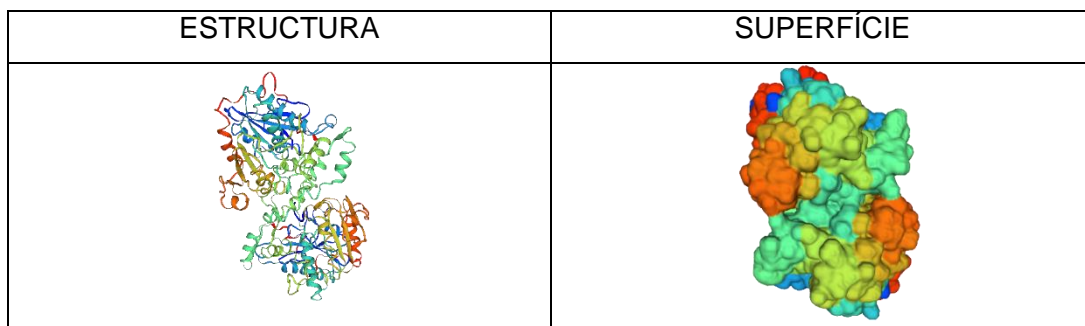


Figura 6. Estructura y superficie de la subunitat PhaC1 present en Pseudomonas

Procedència: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q8KQ23?csm=48480D893C1C6FA5>

- **PHA despolimerases:**

Com s'ha mencionat anteriorment, la principal funció fisiològica del PHA és emmagatzemar carboni que serà utilitzat per aportar energia a la cèl·lula, quan aquesta no pugui obtenir nutrients del medi on es troba. La PHA despolimerasa (PhaZ) és l'enzim que s'encarrega de l'alliberació dels monòmers del polímer perquè aquests es puguin incorporar als processos metabòlics. Està situada a la capa del grànul i també té una funció estructural. S'ha vist que aquest procés pot ser tant extracel·lular com intracel·lular.

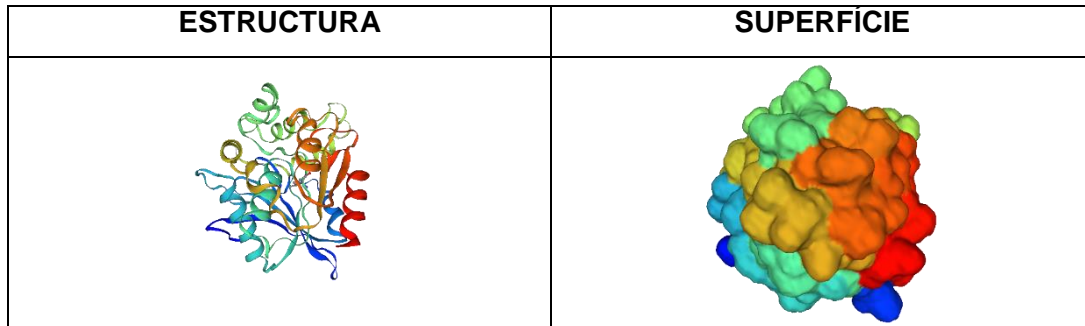


Figura 7. Estructura y superficie de la subunitat de PhaZ present en *Cupriavidus necator*
 Procedència: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/A0A212MH45?csm=A822F35CF70D8B68>

- **Fascines:**

Les fascines són les proteïnes més abundants de la capa exterior del grànul. La seva funció principal és de caràcter estructural, donat que formen part del recobriment del grànul i li aporten estabilitat. La seva mida és relativament petita i tenen un caràcter amfipàtic (tenen un cap polar i un altre cap apolar), d'aquesta manera poden generar una interfase entre el medi aquós del citoplasma (polar) i el grànul hidrofòbic de PHA (apolar).

Més recentment, s'ha vist que no totes les fascines són iguals. En el cas del bacteri *C. necator* (productor de scl-PHA), s'ha trobat la PhaP1 (fascina principal), així com les fascines PhaP2, PhaP3, PhaP4, PhaP5, PhaP6 i PhaP7, especialitzades en l'acumulació i mobilització del PHA. També s'ha trobat la PhaM, una proteïna especialitzada que uneix als grànuls i als cromosomes bacterians, per una repartició equitativa del carboxosoma, quan té lloc la divisió cel·lular.

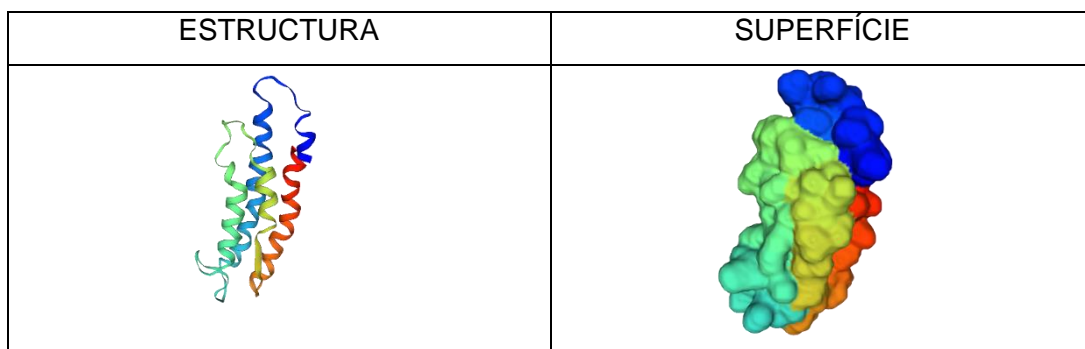


Figura 8. Estructura y superficie de la subunitat de PhaP1 present en *Cupriavidus necator*
 Procedència: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q0KBV4>

2.3.3. Gens implicats en la síntesi de PHA

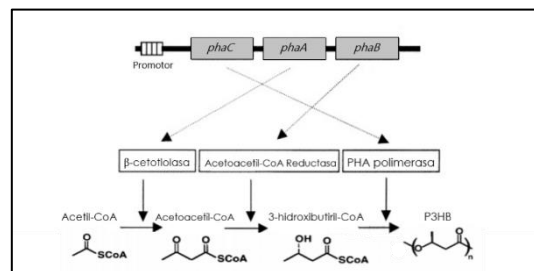
Saber quins són tots els gens que estan implicats en la síntesi de PHA és molt difícil, ja que existeixen molts gèneres bacterians capaços de produir aquests biopolímers. Per això, en aquest treball s'explicaran quins són els gens més importants per a la síntesi dels dos tipus de PHA amb més aplicacions, els scl-PHA i els mcl-PHA, a través de les espècies productores més representatives: *Cupriavidus necator* i *Pseudomona putida*, respectivament.

2.3.3.1. Informació genètica *Cupriavidus necator* (scl-PHA)

Gràcies als últims estudis realitzats sobre el genoma* complet de *Cupriavidus necator*, es pot saber amb més exactitud com es troben organitzats els gens implicats en la síntesi de PHA.

Els gens més importants per a la formació del biopolímer estan situats al cromosoma* 1 del genoma bacterià, aquests són: *phaC*, *phaA* i *phaB*. Que formen l'operó* *phaCAB*

- ***phaC***: Aquest gen s'encarrega de transcriure la proteïna PHA polimerasa (PhaC) que, com ja s'ha mencionat, té la funció de polimeritzar els monòmers. En *C. necator* també s'ha trobat un altre gen (*phaC2*) que codificaria una PHA polimerasa especialitzada a polimeritzar PHB, però el funcionament d'aquesta proteïna estaria encara per determinar.
- ***phaA***: Aquest gen codifica una proteïna amb una funció enzimàtica, la β -cetotilasa, un enzim que s'encarrega de la condensació de dos Acetil-CoA en un Acetoacetil-CoA, pas important per a la síntesi de PHA.
- ***phaB***: Igual que *phaA*, aquest gen també codifica una proteïna de caràcter enzimàtic, en aquest cas és l'enzim Acetoacetil-CoA reductasa. Com el seu nom indica s'encarrega de la reducció de l'Acetoacetil-CoA i el producte d'aquest procés és el monòmer que polimeritza la PhaC.



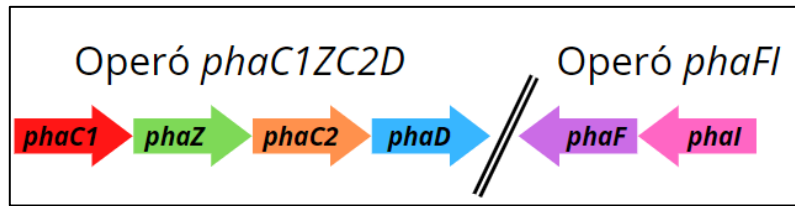
Imatge 10. Procés metabòlic de producció de scl-PHA
Modificat de: Reddy et al, 2003

2.3.3.2. Informació genètica *Pseudomonas putida* (mcl-PHA)

Al genoma de les *Pseudomonas putida* encara no s'han pogut localitzar tots els gens implicats en la producció dels mcl-PHA, però sí que s'han pogut identificar els més característics i com estarien organitzats dins del genoma bacterià.

En aquest gènere s'han trobat dos operons de transcripció oposada i separats per més gens. El primer operó s'anomena *phaC1ZC2D* i està format per dos gens *phaC* (*phaC1* i *phaC2*), ja que el dímer de PHA polimerasa de la *Pseudomonas* està format per dues subunitats la PhaC1 i la PhaC2. Entremig d'aquests dos gens es troba un gen *phaZ* que codifica les PHA despolimerases. I finalment, hi ha un gen anomenat *phaD*, del qual la seva funció principal no estaria molt clara.

L'altre operó és el format pels gens *phaI* i *phaF*, que transcriu les fascines Phal i PhaF. PhaF té una doble funció, participa en l'estabilització del grànul i actua com a regulador de l'operó *phaC1ZC2D*, mentre que Phal seria una proteïna que només participaria en la formació i estabilització dels grànuls de PHA.



Imatge 11. Operons presents al genoma de *Pseudomonas*.

2.3.4. Rutes metabòliques de PHA

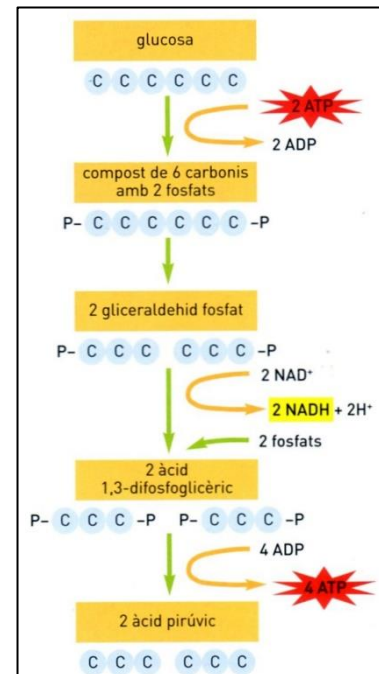
En aquest apartat s'explicaran diferents processos mitjançant els quals els bacteris transformen les fonts de carboni i les converteixen en PHA. Aquests processos de transformació són diferents depenent de quin tipus de PHA produeix el bacteri.

Com a exemple, s'explicaran les rutes metabòliques de *Cupriavidus Necator* (bacteri productor de PHA de cadena curta, scl-PHA) i de *Pseudomona putida* (bacteri productor de PHA de cadena mitjana, mcl-PHA).

2.3.4.1. Metabolisme de scl-PHA

El metabolisme de formació de scl-PHA és bastant simple, en comparació amb el de formació dels mcl-PHA, i es pot explicar en 4 vies metabòliques:

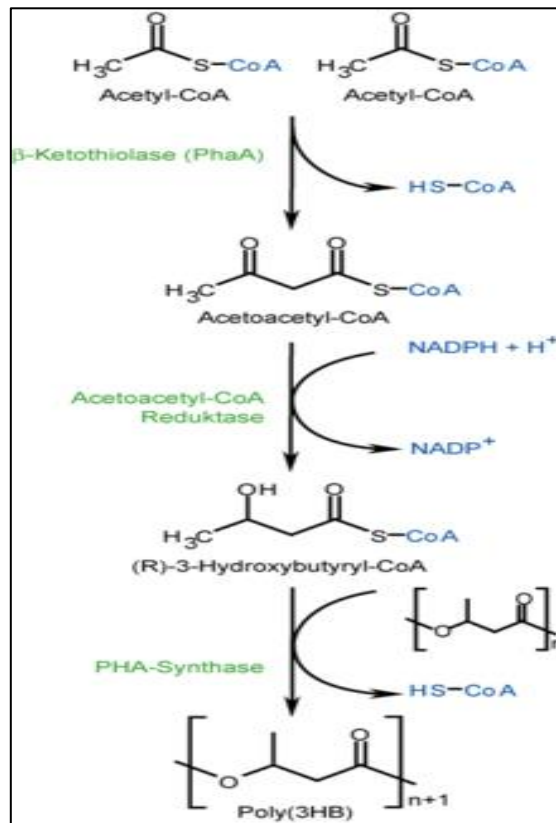
1. La primera via és transformar la font de carboni en molècules d'acetil-CoA a partir de les quals començarà tot el procés. Com que el principal substrat per a *C. necator* són els hidrocarburs de cadena curta (glúcids cíclics com la glucosa), la via metabòlica que s'encarrega de fer aquest procés és la glucòlisi. Aquest procés es basa en deu reaccions catabòliques* on es transforma una glucosa en dues molècules de piruvat. Posteriorment, aquest piruvat és transformat a Acetil-CoA, mitjançant l'extracció d'un carboni i l'addició del coenzim CoA.
2. A la segona via té lloc una reacció on es condensen dues molècules d'Acetil-CoA per donar lloc a una molècula d'acetoacetil-CoA. Aquesta unió la produeix l'enzim β -cetotialasa.



Imatge 12. Glucòlisi

3. A la tercera via es dona una reacció de reducció* produïda per l'enzim acetoacetil-CoA reductasa i el metabòlit NADPH. En aquest pas, les molècules d'acetoacetil-CoA es convertiran en els monòmers que formaran el polímer. En el cas del P3HB, el monòmer resultant d'aquest procés seria el (R)-3-hidroxitbutiril-CoA i aquesta reacció seria de tipus estereoespecífica, ja que el radical sempre es trobarà a la mateixa posició (en aquest cas, la 3).

4. L'última via metabòlica d'aquest procés consisteix en la polimerització dels monòmers. En aquesta reacció actuarà la PHA sintetasa (PhaC), que primer alliberarà el monòmer del coenzim CoA i tot seguit l'unirà a un altre monòmer a través de la formació d'un enllaç èster. D'aquesta manera, es crearà una llarga cadena de PHA que s'acumularà dins del grànul a l'interior del bacteri.



Imatge 13. Procés metabòlic de producció de scl-PHA

Procedència: https://es.wikipedia.org/wiki/Ácido_polihidroxibutírico

2.3.4.2. Metabolisme de mcl-PHA

Els mcl-PHA van ser descoberts en la dècada dels 80, en veure que la *Pseudomonas oleovorans* cultivada amb octà, formava un tipus de PHA més flexible i amb diferents propietats que el P3HB. Aquest descobriment va fer que les investigacions posteriors se centressin en la producció d'aquest nou tipus de PHA.

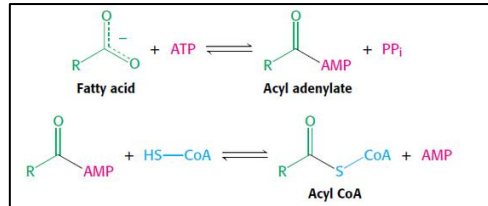
Durant aquestes investigacions, es va poder comprovar que hi havia una relació entre la llargada que tenia la font de carboni i el nombre de carbonis que tenia el mcl-PHA sintetitzat. Es va comprovar que els monòmers resultants tenien el mateix nombre de carbonis que el substrat o s'havia reduït en 2, 4 o 6 carbonis.

La reducció d'un nombre parell de carbonis va fer pensar en la β -oxidació dels àcids grassos, una via metabòlica que utilitzen les cèl·lules animals i vegetals per aconseguir energia a partir dels àcids grassos i que també s'havia estudiat en el bacteri *E. coli* (present a la flora intestinal). Aquest procés consisteix en la degradació dels àcids grassos a través de l'eliminació de 2 carbonis, en forma d'Acetil-CoA.

Per això, es va establir el metabolisme de síntesi de PHA per β -oxidació dels àcids grassos. Aquest procés constaria dels següents processos metabòlics:

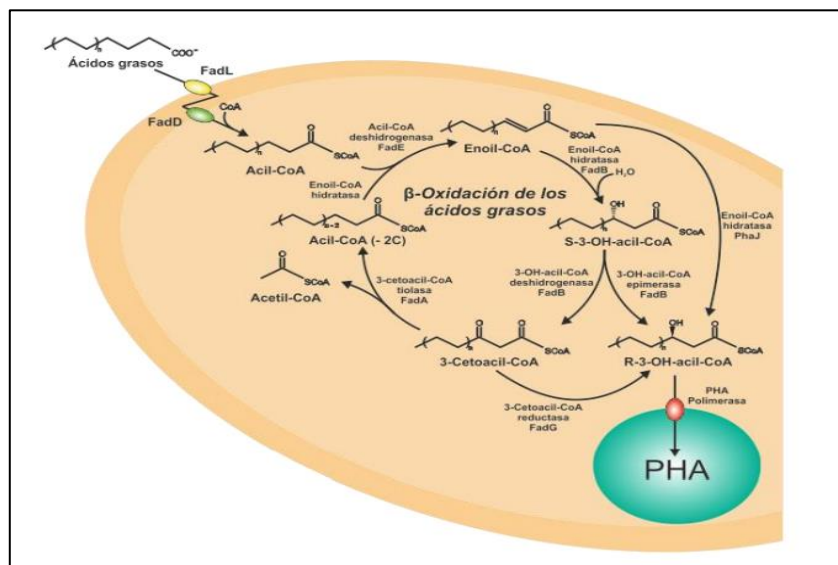
➤ **Metabolisme de síntesi de mcl-PHA a partir β -oxidació d'àcids grassos:**

1. Igual que passa en els animals i plantes, abans de començar aquesta la β -oxidació, els àcids grassos s'han de transformar en acil-CoA mitjançant l'activació dels àcids grassos, on se'ls afegeix el coenzim CoA.



Imatge 14. Conversió d'àcid gras a acil-CoA

2. Aquest Acil-CoA s'incorpora a la β -oxidació, en aquest procés cíclic de degradació es transforma en enoil-CoA, (S)-3-hidroxiacil-CoA i 3-cetoacil-CoA. En completar aquest cicle tornaria a formar-se un acil-CoA, però amb dos carbonis menys que s'haurien transformat a acetil-CoA.
3. Qualsevol d'aquests 3 compostos que formen la β -oxidació podrien ser utilitzats com a precursors dels monòmers que polimeritzarà la PHA polimerasa (PhaC1):
 - 3.1. El (S)-3-hidroxiacil-CoA seria el més fàcil de transformar a monòmer, ja que només se li hauria de canviar de configuració (S) a configuració (R) a través d'un enzim epimerasa. El (R)-3-hidroxiacil-CoA ja podria ser polimeritzat per la PhaC1 transformant-lo en PHA.
 - 3.2. L'enoil-CoA i el 3-cetoacil-CoA es transformarien en (S)-3-hidroxiacil-CoA, a través de diferents reaccions, i després de fer el canvi de configuració, també es podria polimeritzar.



Imatge 15. Procés metabòlic de producció de mcl-PHA per β -oxidació

Precedència: José Ignacio Obeso Rodríguez, Tesis doctoral, 2017

Si això es fes sense completar cap volta al cicle de la β -oxidació, els monòmers de PHA tindrien la mateixa llargària que l'àcid gras, però si ja s'hagués completat una o dues voltes, els monòmers tindrien 2 o 4 carbonis menys, respectivament. D'aquesta manera es confirma la relació explicada anteriorment.

➤ **Metabolisme de síntesi de mcl-PHA a partir de la biosíntesi dels àcids grassos:**

La biosíntesi fa referència a síntesi de biomolècules complexes a partir de molècules més simples. En aquest cas la biosíntesi dels àcids grassos fa referència a la creació d'àcids grassos a partir de molècules com la glucosa, fructosa o glicerol.

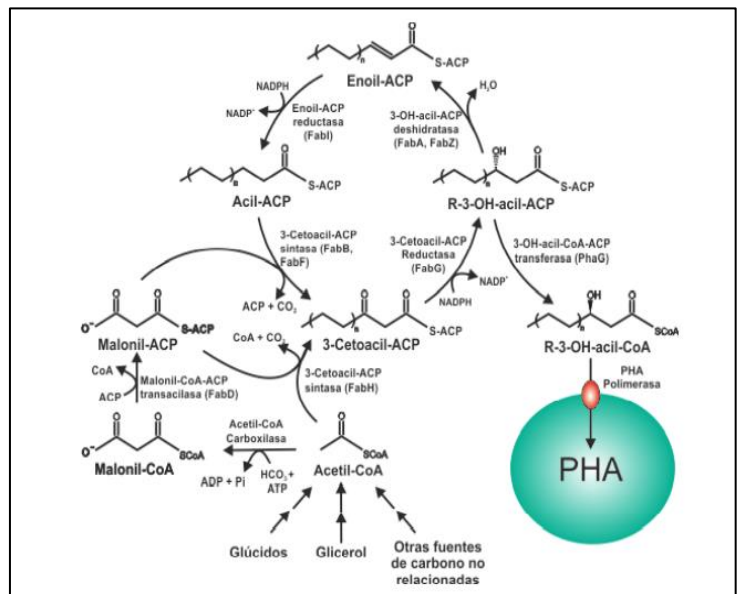
D'aquesta manera es pot definir aquest metabolisme de síntesi de mcl-PHA com una variant del metabolisme de la β -oxidació, on els àcids grassos que s'utilitzen com a substrat són sintetitzats pel mateix bacteri a partir d'altres molècules carbonades més simples.

Aquesta idea va sorgir en veure que alguns bacteris del gènere *Pseudomona*, com la *Pseudomona putida* KT2442, podien seguir produint mcl-PHA quan eren cultivades en un medi sense àcids grassos, però sí amb un excés de glucosa.

La biosíntesi dels àcids grassos s'inicia amb la transformació de molècules simples a acetil-CoA, normalment mitjançant la glucòlisi i la posterior transformació de piruvat a acetil-CoA. Aquest primer acetil-CoA serveix d'iniciador. Els altres acetil-CoA no poden afegir-se directament, sinó que necessiten una activació prèvia a malonil-CoA, una molècula de 3 carbonis.

La unió del malonil-CoA (3C) i l'acetil-CoA (2C), origina un acil-CoA de quatre carbonis i una molècula de CO_2 . La unió de molècules de malonil-CoA permet que s'hi afegixin dos carbonis cada vegada, de manera que es forma una cadena llarga, amb un nombre parell de carbonis.

Un cop s'han aconseguit els acil-CoA de cadena llarga, aquests seguiran els passos 2 i 3 del metabolisme de síntesi de mcl-PHA a partir de la β -oxidació d'àcids grassos.



Imatge 16. Procés metabòlic de producció de mcl-PHA per biosíntesi d'àcids grassos

Precedència: José Ignacio Obeso Rodríguez, Tesis doctoral, 2017

2.3.5. Extracció del PHA

El primer pas després del procés de producció del PHA, consisteix a separar la part sòlida (els bacteris) de tot el líquid (medi de cultiu). Aquesta separació es duu a terme mitjançant tècniques com la sedimentació, la centrifugació o la filtració, amb l'objectiu d'aconseguir tenir una biomassa* sòlida on només es trobin els bacteris. Després s'acostuma a deshidratar aquesta massa per eliminar tota l'aigua, utilitzant tècniques com l'asseccament tèrmic o la liofilització*.

Un cop s'aconsegueix una biomassa cel·lular de bacteris totalment sòlida es procedeix a realitzar l'extracció del PHA de l'interior dels bacteris. Aquest pas és fonamental per al procés de producció a gran escala de PHA. Es necessita que l'extracció sigui el més eficient possible per poder extreure

una major quantitat de bioplàstic amb la menor quantitat de recursos. Aquest procés també té una importància econòmica, donat que influeix en la competitivitat del PHA al mercat.

L'extracció es fonamenta en el trencament de la paret i la membrana cel·lulars dels bacteris per permetre obtenir el material bioplàstic de l'interior. Aquest fenomen es pot produir mitjançant tècniques químiques, amb l'ús de dissolvents apolars (amb capacitat de dissoldre els polímers hidròfobs), tècniques biològiques, amb l'ús d'enzims o animals, o a través de tècniques d'enginyeria genètica. Però no qualsevol mètode és viable per al procés de producció de PHA, donats els desavantatges econòmics, ecològics, de seguretat o de producció. A continuació es descriuen els mètodes més utilitzats i estudiats actualment.

Extracció química amb dissolvents halogenats

És un dels mètodes d'extracció utilitzat amb els PHA que permet una major eficiència i puresa del producte. Es basa en la utilització de dissolvents halogenats com el cloroform o el diclorometà. Però aquest mètode té molts inconvenients, ja que aquests dissolvents són molt nocius per al medi ambient i per a la salut humana.

Per altra banda, un cop el PHA s'ha dissolt en ells, es necessita un altre compost que s'anomena "antidissolvent de PHA" com l'etanol, l'acetona, el metanol o l'hexà que a temperatura molt baixa (-20 °C) poden fer precipitar el PHA. Tot aquest procés fa augmentar el cost econòmic de producció, ja que ni el dissolvent ni l'antidissolvent de PHA poden ser recuperats ni reciclats fàcilment.

Extracció química amb "dissolvents verds"

A causa de l'alta nocivitat dels dissolvents halogenats, actualment s'estan estudiant diversos mètodes d'extracció mitjançant altres dissolvents que no són tan nocius per al medi ambient ni per a la salut humana, aquests dissolvents anomenats "dissolvents verds" poden ser cetones (acetona, ciclohexanona, metiletilcetona), alcohols (etanol, 1-propanol, 1-butanol) o èsters. Com s'observa, cap d'aquests compostos conté elements halogenats i a part, la majoria d'ells es poden aconseguir a partir d'energies renovables.

De tots aquests dissolvents, el més utilitzat és l'acetona, donat que és un compost volàtil de fàcil reciclatge que també arriba a extreure PHA amb una alta puresa.

Encara que els scl-PHA no es dissolen tan bé en aquest compost pel seu alt grau de cristallinitat, els mcl-PHA sí que tenen una alta solubilitat en ell. Aquest fet, serveix per poder fer una separació entre diferents tipus de PHA si es tracta d'un cultiu mixt de bacteris. A part, quan es treballa amb acetona, només cal refrigerar la dissolució per fer la separació dissolvent-PHA i no fa falta l'addició d'un "antidissolvent".

Extracció de PHA mitjançant enzims

Un nou mètode que està agafant embranzida en el camp de l'extracció de PHA és fer una extracció mitjançant enzims, gràcies als nous avenços que estan sorgint en el camp de la biologia. En aquest cas, no es tracta d'extreure el PHA de l'interior dels bacteris, sinó d'eliminar tot allò que no és PHA, una nova tècnica que promet ser molt més eficient i econòmica si es té en compte que la massa que no és material bioplàstic no arriba al 10%.

Del Residu al Bioplàstic

Aquest procés consta d'utilitzar un còctel d'enzims (proteasa, fosfolipases, liozims, nucleases, etc.) amb l'objectiu de lisar totes les cèl·lules bacterianes i d'aquesta manera quedar-se només amb el PHA de l'interior.

Digestió de biomassa a través d'animals

Recentment també s'ha demostrat amb èxit que certs animals poden alimentar-se de la biomassa de bacteris i, a l'hora de fer la digestió, trencar la paret i la membrana cel·lular sense fer malbé el PHA, que s'excreta com un residu.

Un dels inconvenients d'aquest procés és que comporta bastant de temps i recursos. Per altra banda, donat que la majoria d'aquests animals són insectes, com el cuc de la farina, es podria integrar la producció de PHA en processos que comportin el cultiu d'insectes per a la seva posterior ingesta com a font de proteïnes.

Enginyeria genètica per a facilitar l'extracció de PHA

Gràcies als coneixements genètics que s'estan adquirint en aquest camp, seria possible modificar el genoma dels bacteris per fer que tinguessin una paret menys resistent a la pressió. D'aquesta manera quan els bacteris comencessin a augmentar de mida per l'acumulació de PHA al seu interior, la seva paret es trencaria i es podria extreure el PHA fàcilment.

2.3.6. Model industrial de producció de PHA

Encara que el descobriment dels polihidroxicanoats va ser el 1888 i van ser estudiats àmpliament a finals del segle XX, no ha estat fins al segle XXI quan el PHA ha adquirit interès a escala mundial, principalment per la conscienciació que té la població sobre els problemes ambientals causats pels plàstics convencionals i la necessitat de substituir-los.

Amb l'objectiu que el PHA es pugui comercialitzar amb un preu competitiu, que el procés de producció sigui *eco-friendly* i que la font principal no sigui un bé escàs com el petroli, va sorgir el repte científic de trobar un model industrial el més eficient possible.

Actualment han estat molts els models de producció que s'han patentat, però no tots han resultat vàlids, ja que els PHA acabaven tenint un cost elevat que els deixava econòmicament fora del mercat. El que sí que es pot dir, és que tots els models han servit com experiència i, per tant, coneixement per a poder millorar en aquesta recerca.

Ara per ara, el model que té més possibilitats de tenir una aplicació a gran escala, és la producció de PHA a partir de residus orgànics (agrícoles, industrials o alimentaris) com a font de carboni per als bacteris. D'aquesta manera, es pot produir biopolímer a partir d'una matèria primera molt econòmica, abaratint així els costos de la seva producció.

Per altra banda, aquest model de producció dona valor als residus. A la vegada, genera una alternativa econòmica per a la seva gestió en les empreses, donat que molts d'aquests residus han de ser tractats abans d'abocar-los al medi.

Els principals residus que s'han descrit com a possibles substrats potencials per aquests models són:

- **Residus d'indústries làctiques:** Les indústries làctiques generen una gran quantitat de residus orgànics a conseqüència de la producció de formatges, iogurts i derivats.
- **Residus de la producció d'oli d'oliva:** El procés d'obtenció d'oli d'oliva produeix molta matèria orgànica, que procedeix de tota la part sòlida de l'oliva que no es pot utilitzar.
- **Residus orgànics urbans:** El reciclatge urbà és una pràctica bastant assumida per la societat, per això tots els residus orgànics que produeix una ciutat podrien ser utilitzats per a la producció de PHA. Per altra banda, la seva posterior venda-aprofitament podria suposar un ingrés econòmic per a la mateixa ciutat.
- **Residus de depuradores:** Les depuradores són un lloc on també arriba molta biomassa provinent de la recollida de les aigües residuals. Per això, les estacions depuradores d'aigües podrien ser un lloc adient per produir PHA a nivells elevats.

Espanya és un país que està demostrant tenir un gran interès en la producció de polihidroxialcanoats a partir dels residus orgànics. Això es pot constatar amb la presència de dues empreses nacionals pioneres a escala mundial. En aquest apartat s'exposarà com aquestes empreses han estudiat diferents variants per poder fer el procés encara més eficient.

La primera empresa és *Biopolis*, una empresa valenciana que ha utilitzat bacteris recombinats amb enginyeria genètica per reduir el cost d'extracció del biopolímer.

La segona empresa és *Venvirotech Biotechnology*, empresa catalana que ha aconseguit més eficiència en integrar tot el procés dins d'un sistema tancat "container" que es pot instal·lar a qualsevol lloc.

2.3.6.1. Model de producció de *Biopolis*

Biopolis és una companyia privada de biotecnologia, creada el 2003 com una empresa spin-off del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), encara que el 2017 va ser comprada per l'empresa estatunidenca *ADM*. El seu principal objectiu és desenvolupar solucions biotecnològiques per als seus clients, a través de l'enginyeria genètica i la recombinació de genomes.

Un dels principals reptes per a *Biopolis* va ser intentar fer el procés d'obtenció de bioplàstics de manera eficient. En concret es van centrar en la producció de polihidroxialcanoats (PHA) a través de bacteris utilitzant residus orgànics.

El 2011, *Biopolis* presentava un nou model de producció de PHA que prometia ser molt més eficient que tots els presentats fins aleshores. D'aquesta manera, es podria crear bioplàstic a un preu competitiu. Això va ser possible gràcies a la utilització d'una soca de *Pseudomonas putida* modificada genèticament, que era capaç de produir la seva pròpia autòlisi* quan finalitzava la producció de PHA.

2.3.6.2. Model de producció de *Venvirotech Biotechnology*

Per tal de poder explicar millor el model que utilitza *Venvirotech*, es va concertar una entrevista amb la seva *Co-founder*.

Tal com va explicar Patricia Aymà (*Co-founder* de *Venvirotech*) en la entrevista, la idea inicial de negoci d'aquesta *start-up* biotecnològica va ser dissenyar una biorefineria on arribessin residus i, mitjançant l'acció bacteriana, es transformessin en bioplàstic. Però després de consultar les necessitats dels seus clients, van veure que un model productiu instal·lat dins les mateixes instal·lacions dels clients, seria un procés molt més eficient i també més econòmic al no involucrar el transport dels residus. D'aquesta manera va iniciar el model de producció en contenidors instal·lats a prop del lloc on es generen els residus.

Aquesta empresa va néixer amb la idea de resoldre problemes mediambientals, apropant la biotecnologia a les empreses i a la societat en general. *Venvirotech* ho aconsegueix desenvolupant tecnologia pròpia al servei de les necessitats dels seus clients. Són experts en la gestió de residus orgànics mitjançant la tecnologia dels bacteris. D'aquesta manera, aconsegueixen estandarditzar el producte de bioplàstic obtingut. A més a més, aquest biomaterial es posa de nou al mercat com un material d'alt valor afegit que es pot fer servir tant per envasatge d'aliments (*packaging*) com per aplicacions mèdiques, donat que és compatible amb el cos humà.

Per altra banda, el sistema de producció està basat en l'economia circular i té la característica que és de fàcil adaptació al tipus de residu. Aquesta empresa aposta per la filosofia *ZERO WASTE* a l'hora d'aportar solucions, és a dir, està interessada a minimitzar la generació de residus al màxim. Actualment, molts dels seus clients són empreses sensibilitzades amb aquesta filosofia que utilitzen els bioplàstics generats a partir dels seus propis residus.

Venvirotech ha aconseguit recentment una aportació econòmica que dona solidesa al seu projecte com *start-up*. Per altra banda, dona opció a petits inversors que vulguin participar en els seus nous projectes tecnològics.



Imatge 17. Container patentat per *Venvirotech Biotechnology*

2.4 BIOREFINERIA A UNA EDAR

2.4.1. Funcionament d'una EDAR

Una depuradora d'aigües residuals és el lloc on es realitza el tractament adequat sobre l'aigua, amb l'objectiu de reutilitzar-la o abocar-la al mar. Normalment aquest tractament es realitza en 5 fases:

- 1. Pretractament:** S'eliminen els agents contaminats voluminosos i pesants de les aigües fent servir diferents tècniques com el desabastament (filtració a través de reixes), el dessorrament (eliminació de partícules que han pogut travessar les reixes) i el desgreixat (eliminació de greixos).
- 2. Decantació primària:** Amb una decantació física s'acaben d'eliminar els sòlids sedimentables de la matèria flotant que no han estat eliminats en el pretractament.
- 3. Tractament biològic:** Les aigües un cop s'han eliminat la major part de sòlids són transportades als reactors biològics, on es degradarà la matèria orgànica a través de bacteris aeròbics i es generaran els llots actius o biològics.
- 4. Decantació secundària:** En aquest procés, al fang produït se li decanta la fracció sòlida per aconseguir aigua clarificada.
- 5. Tractament d'aigües:** L'aigua clarificada s'higienitza i es tracta depenent de quin sigui el seu ús final.
- 6. Tractament de fangs:** Les fraccions sòlides que s'han anat obtenint en les diferents fases de la depuració es tracten i es poden utilitzar per a l'obtenció de bio-gas, de compostatge o, com s'està estudiant en aquest treball, de bioplàstic (polihidroxiclcanoats).



Imatge 18. EDAR de Tarragona

2.4.2. Model de producció de bioplàstics a partir de residus

Quasi el 30% del cost total de la producció de PHA és causat pel preu de la font de carboni. Per altra banda, la manipulació, el tractament i la disposició final dels llots de depuradora representa un alt cost de la planta de tractament dels fangs actius. És per això, que el model de síntesi de PHA a partir de llots actius és una possibilitat de reducció de costos de la producció dels bioplàstics.

Aquest procés constaria de dues fases:

2.4.2.1. Generació d'una font de carboni mitjançant els residus

La primera fase es basa en la fermentació anaeròbica dels fangs de depuradora per degradar la matèria orgànica en àcids grassos volàtils* (AGV), un substrat ideal per als bacteris productors de PHA. Aquesta fermentació es realitzaria de manera natural pels bacteris que contenen els residus orgànics.

Un cop s'han fermentat els residus, procés que dura uns 3-7 dies, es passa a fer una filtració per separar la fracció líquida, que conté AGV, de la fracció sòlida que són residus que no s'han fermentat.

La fracció líquida servirà com a substrat per a la producció de PHA, és per això que s'ha d'assegurar que només passaran àcids grassos, aigua i nutrients, d'aquesta manera no hi haurà contaminants en la següent fase.

La fracció sòlida que s'obté es retira del procés i pot ser processada per a fer compostatge.

2.4.2.2. Selecció de bacteris productors

L'inòcul de bacteris utilitzat per a la producció de PHA procedeix dels llots actius de la depuradora. Però degut a l'alta diversitat bacteriològica dels llots, els bacteris productors entrarien en competició del substrat amb els bacteris no productors de PHA. Aquest fet provocaria una menor eficiència del procés i és per això que es seleccionen els bacteris productors a través del cicle "excés-limitació (feast-femine)".

La biomassa sotmesa a períodes successius de disponibilitat de substrat extern (període d'excés) i de cap disponibilitat de substrat extern (període de limitació) experimenta un creixement desequilibrat.

La capacitat d'emmagatzemar polihidroxicanoats proporciona als microorganismes productors un avantatge competitiu sobre aquells que no tenen aquesta capacitat, quan s'enfronten a una limitació del substrat o creixement desequilibrat.

2.4.2.3. Acumulació i extracció de PHA

Els bacteris seleccionats acumularan PHA produït a partir dels àcids grassos volàtils.

Finalment, es realitzaria una extracció del bioplàstic mitjançant un dels mètodes explicats anteriorment en l'apartat 2.3.5. EXTRACCIÓ DEL PHA.

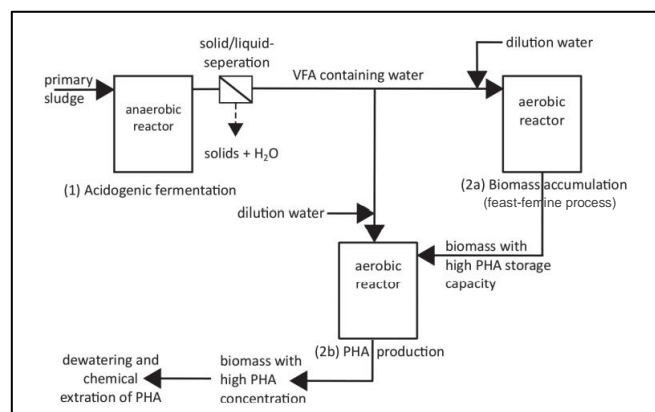


Figura 9. Esquema producció PHA
Modificat de: Pittman et al., 2017

3. MARC PRÀCTIC

Un cop presentada tota la informació referent al marc teòric, es passarà a explicar totes les pràctiques que han sigut necessàries per a comprovar les hipòtesis del present treball de recerca.

Aquest marc pràctic es troba dividit en dos blocs experimental. Al bloc I es presenten les pràctiques corresponents al creixement dels bacteris i producció de PHA. Al bloc II es presenten les pràctiques amb els mètodes utilitzats per l'extracció i posterior comprovació de la formació PHA.



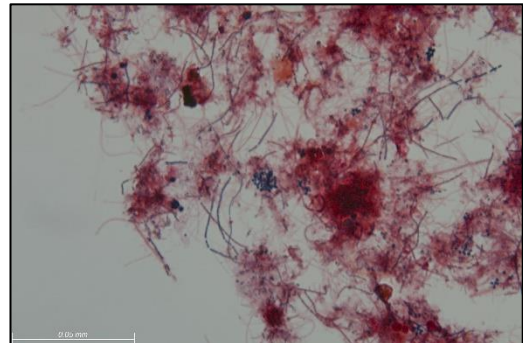
Imatge 19. Preparat *Pseudomonas putida* KT2442



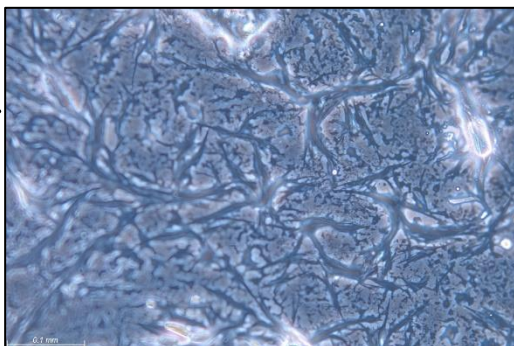
Imatge 20. Fang i llot actiu de depuradora



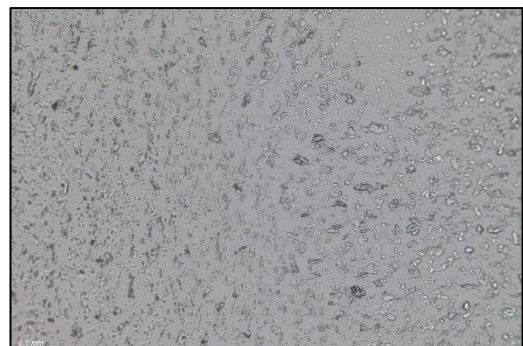
Imatge 21. Observació de PHA al microscopi



Imatge 22. Observació de PHA al microscopi



Imatge 23, 24. Filaments i acumulacions de PHA



3.1. BLOC EXPERIMENTAL I

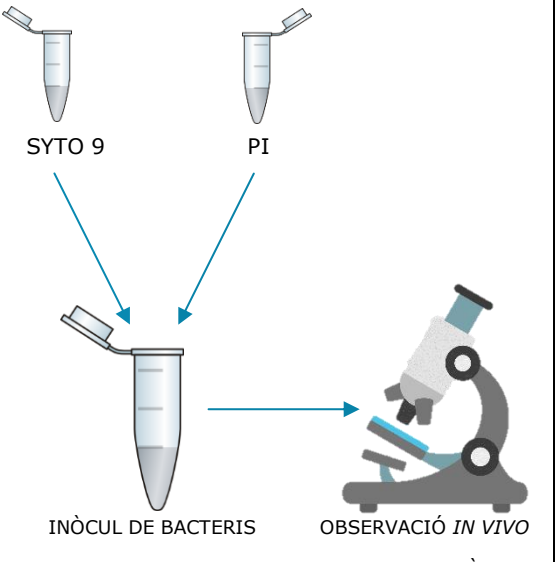
Pràctica 1	Comprovar l'estat de les <i>Pseudomonas</i>.
<p>El preparat bacterià de <i>Pseudomonas</i> va ser utilitzat per part del laboratori d'EMATSA fa 5 anys. En aquell moment ja es va comprovar la capacitat de supervivència que tenien les <i>Pseudomonas</i> en diferents medis. Donat que aquest preparat s'ha mantingut en refrigeració durant tot aquest temps i conté tots els nutrients necessaris, només es va procedir a activar-lo.</p> <p>Abans de realitzar aquest procés, es va fer una prova de fluorescència per comprovar la quantitat de bacteris vius i morts que hi havia. D'aquesta manera, es va verificar si el preparat era viable per utilitzar-lo a l'experimentació de producció de PHA.</p>	
Pràctica 2	Creixement de les <i>Pseudomonas</i> (H3.2)
<p>En aquesta segona pràctica es troba tot el procediment de creixement que van tenir les <i>Pseudomonas</i>.</p> <p>Per poder mesurar i comprovar aquest creixement es va utilitzar la tècnica d'espectrofotometria*, on a través de l'efecte Tyndall es mesura l'absorbància de les cèl·lules per tal de poder traçar les corbes de creixement bacterià. Aquest creixement estarà produït per l'augment de volum que pateixen els bacteris a l'hora de produir PHA.</p>	
Pràctica 3	Fermentació dels fangs de la depuradora
<p>Al mateix temps que es feien créixer les <i>Pseudomonas</i>, es va prendre una mostra de fang de les aigües residuals de Tarragona a la qual es va inocular amb una mostra de llot actiu. Aquesta mescla es va deixar incubar per tal que la matèria orgànica es transformés en àcids grassos volàtils (AGV). D'aquesta forma, els bacteris productors de PHA dels llots actius es podrien alimentar d'aquests AGV.</p>	

Taula 1. Esquema bloc experimental I

La metodologia de presentació de cada pràctica serà la següent: Primer una introducció de la pràctica. Després una taula on es troba detallat el material, productes emprats, procediments, esquema del disseny i les imatges obtingudes. Finalment, s'exposen els resultats més rellevants i les conclusions de la pràctica.

PRÀCTICA I: COMPROVAR L'ESTAT DE LES *PSEUDOMONES*

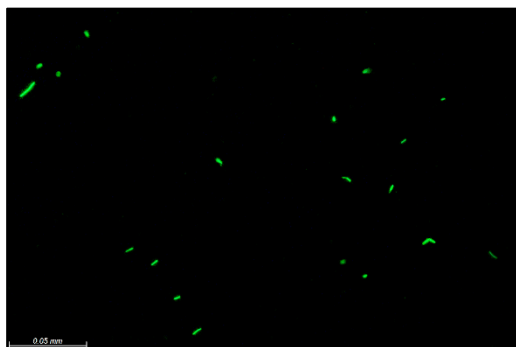
Com s'explica a la taula 1, aquesta pràctica servirà per comprovar l'estat de les *Pseudomonas*. Per això, es farà servir un kit de detecció de bacteris vius i morts via fluorescència*. Aquest kit consta de dos tints fluorescents, el SYTO 9 i el iodur de propidi (PI). El reactiu SYTO 9 (de color verd sota llum blava) pot tenyir totes les cèl·lules, mentre que el PI (de color vermell sota llum verda) només pot tenyir les cèl·lules que tinguin trencades o molt danyades les parets cel·lulars (bacteris morts). Per això, a través del microscopi òptic amb una freqüència de 480nm (llum blava) es podran veure primer tots els bacteris de color verd, i després canviant a 550nm (llum verda) es podran veure quins d'aquests bacteris verds també s'observen de color vermell, la qual cosa significa que en realitat estan mortes.

Data	Pràctica I	Nom de la pràctica: Comprovar l'estat de les Pseudomones.
28/08/20	Objectiu: Comprovar la viabilitat del preparat de <i>Pseudomonas putida</i> KT2442 per a l'experimentació.	
Materials: Preparat de <i>Pseudomonas putida</i> KT2442, pipetes, puntes per a pipetes (de 5µl i d'1ml), eppendorfs, vòrtex, kit live/dead per a bacteris, microscopi òptic amb fluorescència, porta objectes, dissolució salina de clorur de sodi (NaCl) al 1% (m/v), balança, espàtula, paper de filtre, embut i vas de precipitats.		
Procediment		Esquema
1. Amb l'ajuda de la balança i una espàtula s'agafen 2 g del preparat de <i>Pseudomonas</i> i es posen al vas de precipitats.		
2. S'afegeixen 100ml (mil·lilitres) de la dissolució salina al vas i es deixa en agitació a 250 rpm durant 4 hores a 27 °C per activar els bacteris.		
3. Com que la preparació conté altres impureses, es filtra amb l'ajuda del paper de cel·lulosa, eliminant les més grans.		
4. Un cop la mostra és homogènia se segueix el protocol d'actuació del kit live/dead. En aquest cas, es necessiten 1,5 µl (microlitres) de cada reactiu que es mesclaran, amb l'ajuda del vòrtex, amb 1ml d'inòcul de bacteris per fer la tinció.		
5. Un cop s'ha realitzat la tinció de la mostra tal com s'indicava als protocols, es passa a l'observació <i>in vivo</i> * de la mostra al microscopi. Per a l'observació, s'agafen 5 µl de l'inòcul tenyit i es posen en un portaobjectes.		
6. Al microscopi es configura l'opció de fluorescència i s'observa a 1000 augments.		
7. Fer un comptatge aproximat i veure que més del 50% de bacteris verds no es tenyeixen de vermell.		

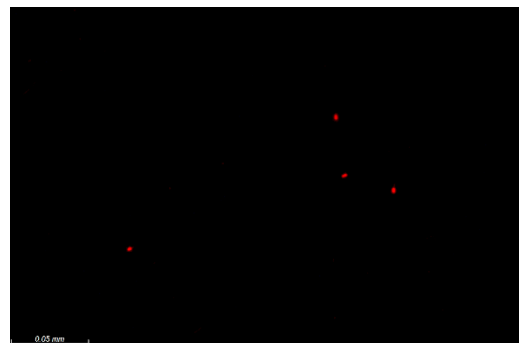
RESULTATS PRÀCTICA I

Taula 2. Pràctica I

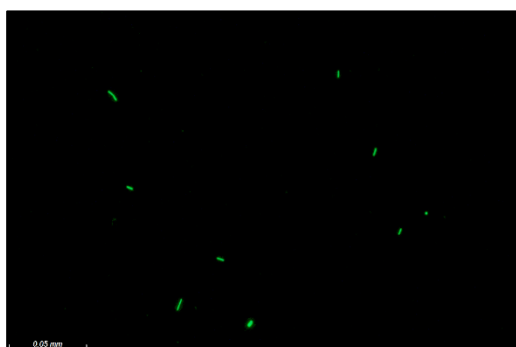
➤ Fotografies:



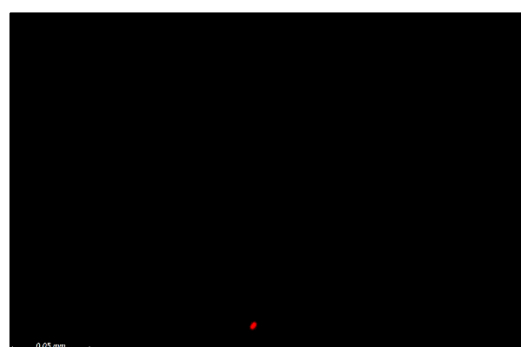
Imatge 25. Bacteris



Imatge 26. Bacteris morts



Imatge 27. Bacteris



Imatge 28. Bacteris morts

Gràcies a l'observació *in vivo* al microscopi, es van poder recopilar fotografies i vídeos de les *Pseudomonas* on es van apreciar que la majoria de bacteris estaven vius i actius.

➤ **Càlcul aproximat del percentatge de bacteris vius:**

Per tenir un nombre més exacte dels bacteris vius, es va realitzar el seu comptatge en una superfície de 0,64 mm². El resultat obtingut va ser de 107 bacteris vius d'un total de 128. Per tant, el 85% de bacteris d'aquesta superfície estaven vius. Pel seu càlcul es va emprar la següent fórmula:

$$\% = \frac{\text{Bacteris vius}}{\text{Bacteris totals}} \cdot 100$$

CONCLUSIONS: PRÀCTICA I

Amb la valoració de les imatges i el càlcul del percentatge, la conclusió d'aquesta primera pràctica és positiva i, per tant, el preparat té una quantitat òptima de bacteris vius per fer l'experimentació de la producció de PHA.

PRÀCTICA II: CREIXEMENT DE LES PSEUDOMONES

Un cop comprovat que el preparat de les *Pseudomonas putida KT2442* era viable per a una producció de PHA es va procedir a realitzar la segona pràctica. L'objectiu d'aquesta pràctica va ser fer créixer les *Pseudomonas* per acumular biomaterial al seu interior. Per aquesta raó, aquesta pràctica es va dividir en dues parts.

La primera part va consistir a donar a les *Pseudomonas* un medi òptim per poder créixer i acumular PHA al seu interior. Per tal d'obtenir la quantitat més gran de PHA, es van limitar les fonts de nitrogen i fòsfor dels bacteris estudiats. Quan les *Pseudomonas* van disposar de menys nutrients al medi, van activar el metabolisme de producció de PHA i, el carboni que es trobava en excés, va ser transformat en biomolècules amb funció de reserva energètica (en aquest cas PHA).

Per altra banda, en aquesta primera part de la pràctica es va estudiar el creixement de les *Pseudomonas putida KT2442* amb dues fonts de carboni, una de caràcter glúcid (sucre) i una altra de caràcter lipídic (oli d'oliva).

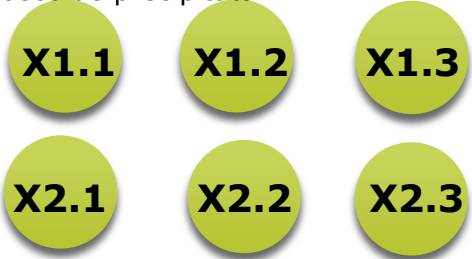

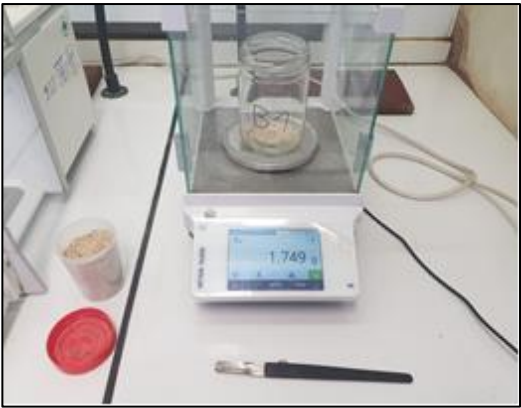

La segona part de la pràctica va consistir en la comprovació del creixement de les *Pseudomonas* durant tot el procés de producció de PHA. Aquesta part de l'experimentació també va permetre saber el temps que tardaven les *Pseudomonas* a arribar al màxim de PHA produït.

El mesurament del creixement bacterià es va fer mitjançant l'espectrofotometria tenint en compte l'aplicació de l'efecte Tyndall. Aquest efecte descobert per John Tyndall el 1869 tracta el fenomen físic fonamentat que les partícules en una dissolució siguin visibles pel fet de dispersar la llum, i fa possible establir una relació directament proporcional entre l'absorbància de la solució, la mida de les partícules i la longitud d'ona de la llum emesa.

Fent servir un espectrofotòmetre, es va llegir l'absorbància de la solució de *Pseudomonas* a una longitud d'ona determinada i d'aquesta manera establir una corba de creixement durant el temps de la producció. Teòricament, els bacteris haurien d'arribar al primer pic de creixement en unes 72 hores (3 dies). Si aquest fet es confirma, es pot procedir a afegir una altra vegada un excés de la font de

carboni seleccionada. Posteriorment si els bacteris assumeixen un segon pic, es pot comprovar que els bacteris han augmentat la seva mida a partir de la font de carboni i no per una casualitat.



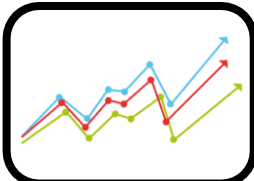
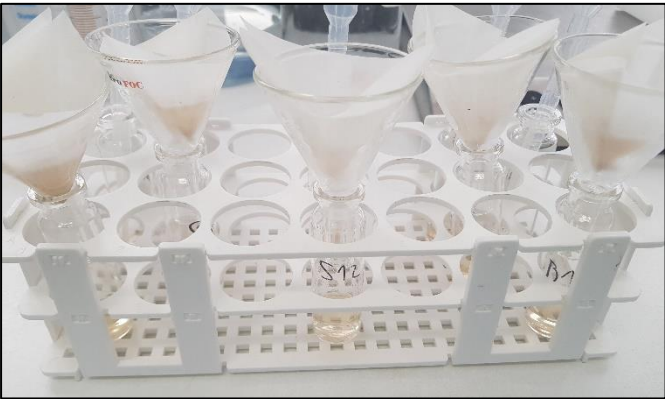

PRÀCTICA II: PART I

Data	Pràctica II.1	Nom de la pràctica: Producció de PHA amb les fonts de carboni seleccionades.	
01/09/20-12/09/20	Objectiu: Aconseguir un medi de cultiu i unes condicions adients per a la producció de PHA.		
Materials: Preparat de <i>Pseudomonas putida</i> KT2442, 3 litres d'aigua destil·lada (H ₂ O), 30g de clorur de sodi (NaCl), agitador magnètic, imants d'agitació, 14 vasos de precipitats, espàtula, proveta, balança, incubador, marcador permanent.			
Procediment		Esquema	
1. Fer una dissolució salina de NaCl de 3 litres al 1% (m/v) i abocar 125ml a cada vas de precipitats.		Vasos de precipitats:	
2. Preparar l'inòcul de <i>P. putida</i> KT2442, afegint 1,5 grams a cada vas de precipitats, d'aquesta manera s'aconsegueix una concentració de 12g de preparat bacterià/litre, la concentració necessària per la seva activació segons el protocol de preparació.			
3. Deixar els vasos en l'incubador a 27°C amb una agitació de 250 rpm durant unes 4 hores, per activar els bacteris.		Rèpliques de vasos amb font de carboni, la X és la lletra que dependrà de la font de carboni utilitzada. S: sucre OL: oli	
4. Acabat aquest període de temps, diluir l'inòcul afegint 125ml de la dissolució salina per tenir una concentració de 6g/l òptima per una producció a petita escala, com s'indica el protocol de creixement del preparat.			
5. Agregar 5 grams de sucre a 6 vasos de precipitats i 5ml d'oli d'oliva als altres 6. Aquestes quantitats estan calculades per a tenir un excés de font de carboni al medi.		Rèpliques de grups control (sense font de carboni afegida)	
6. Col·locar de nou els bacteris a l'incubador a 27°C amb una agitació de 250 rpm. En aquest cas, el temps d'incubació estarà determinat per la segona part d'aquesta pràctica II.			
Imatges:			
			

Taula 3. Pràctica II.1

PRÀCTICA II: PART II

Les longituds d'ones seleccionades van ser 540nm i 600nm, que es troben dins de l'espectre de llum que pot incidir a una partícula de la mida d'un bacteri (aproximadament: 1µm, micròmetre).

Data	Pràctica	Nom de la pràctica: Creixement de les <i>Pseudomonas</i> per l'acumulació de PHA (H3.2)	
01/09/20-12/09/20	Objectiu: Veure el creixement que tenen les <i>Pseudomonas</i> durant el procés de producció i poder establir quin és el temps que es tarda a arribar al màxim de l'acumulació.		
Materials: Vasos de precipitats X1.1, X1.2 i X1.3 de la primera part de la pràctica II, grup control B1, pipetes <i>Pasteur</i> , 4 tubs d'assaig, 4 embuts, paper de filtre, espectrofotòmetre, cubeta de quars.			
Procediment		Esquema	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Agafar 10ml de la dissolució dels vasos de precipitats 1.1, 1.2, 1.3 i B1 i posar aquestes mostres en uns tubs d'assaig. D'aquesta forma no farà falta agafar tot el contingut del vas i interrompre la producció. 			
<ol style="list-style-type: none"> 2. Degut a les impureses de grans dimensions del preparat, aquest es filtra amb paper de cel·lulosa abans de fer la mesura d'absorbància. 			
<ol style="list-style-type: none"> 3. Mesura de l'absorbància de la dissolució en una cubeta de quars. 			
<ol style="list-style-type: none"> 4. S'introdueix la cubeta dins l'espectrofotòmetre i es fan les dues lectures a les longituds d'ona de 540nm i 600nm. 			
<ol style="list-style-type: none"> 5. Passar els resultats a un full de càlcul per poder realitzar un gràfic on es vegi la corba de creixement. 			
<ol style="list-style-type: none"> 6. Un cop acabada tota la pràctica es retorna la mostra sobrant als vasos de precipitats inicials, per tal de no perdre volum. 			
<ol style="list-style-type: none"> 7. Aquesta pràctica es repetirà durant tot el procés de producció. 			
Imatges:			
			

Taula 4. Pràctica II.2

RESULTATS PRÀCTICA II

Els resultats de la pràctica II seran els corresponents a la segona part de la pràctica, ja que és aquesta segona part la que ens brinda les dades necessàries per poder fer les conclusions d'aquesta pràctica.

➤ **Corbes de creixement de les *Pseudomonas putida* KT2442 amb diferents fonts de carboni:**

En aquest apartat, només es tractaran les gràfiques de les corbes de creixement que s'han creat amb la mitjana de les dades de les 3 rèpliques de cada font de carboni en comparació amb el grup control. Les gràfiques completes de les dades de totes les rèpliques durant els 11 dies de l'experimentació es troben a l'apartat d'annexos.

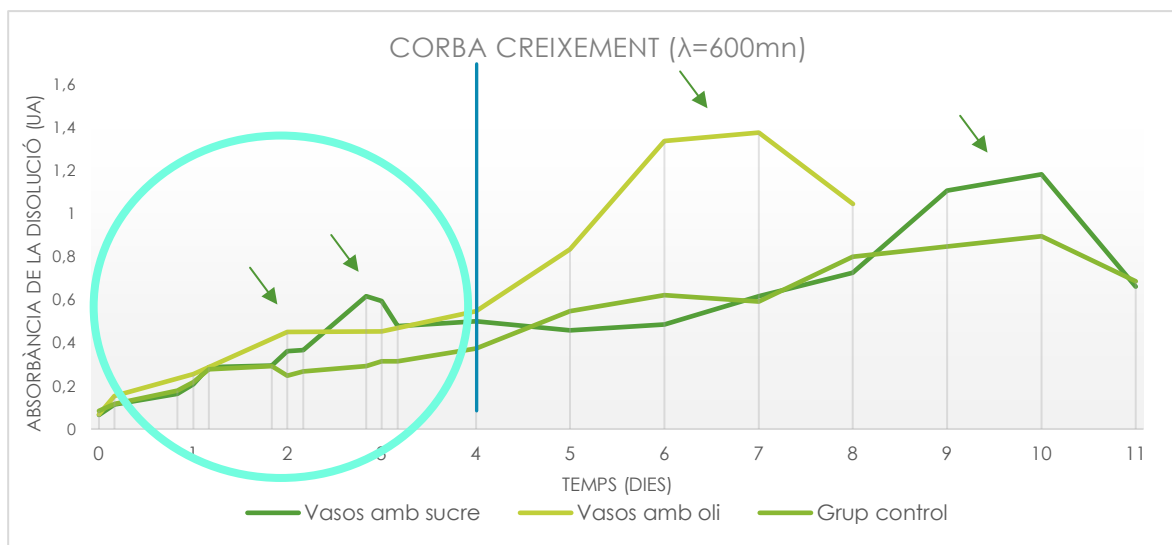


Figura 10. Corbes de creixement de les *Pseudomonas putida* KT2442 durant els 11 dies d'experimentació.

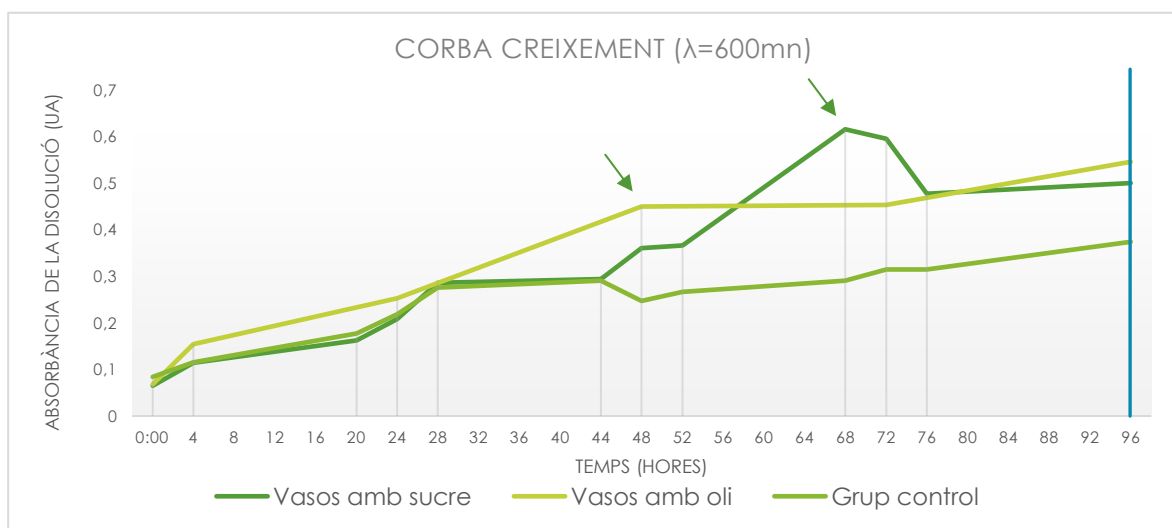


Figura 11. Ampliació dels 4 primers dies de l'experimentació.

CONCLUSIONS PRÀCTICA II

Com mostren els gràfics de l'apartat anterior, s'aprecia un augment de l'absorbància a mesura que avança el temps, la qual cosa ens permet afirmar que ha hagut un creixement dels bacteris que hi havia en cada mostra.

Durant les primeres 24 hores, s'observa un creixement homogeni dels tres grups de mostres, segurament degut a que els bacteris encara es trobaven en un medi sense limitacions de nutrients. En aquest medi les *Pseudomonas* van poder seguir amb el seu metabolisme normal i per això no va haver-hi una diferència entre les mostres que tenien una font de carboni i la que no en tenia.

No es fins al següent dia (entre les 24 i 48 hores) on es troben les primeres anomalies. La mostra amb oli d'oliva com a font de carboni, es va destacar de les altres dues tenint un creixement molt més elevat i arribant al seu primer pic just a les 48 hores de la producció. A part, la mostra de sucre també comença a despuntar més que la mostra sense font de carboni, la qual es va estabilitzar i va començar a decreixer. Aquesta estabilitat hauria estat provocada per la falta de nutrients (carboni, nitrogen, fòsfor), mentre que les altres sense limitació de carboni van poder seguir creixent.

Després de les 48 hores també s'observa una estabilització de la mostra amb oli d'oliva, significat que també ha esgotat el carboni i ha acabat la producció, mentre que la mostra amb sucre fa un creixement exponencial i arriba al seu màxim al cap de les 72 hores, un pic superior al que va arribar la mostra amb oli.

Al cap de 80 hores també es pot donar per acabada la producció de PHA de la mostra de sucre, que també s'estabilitza.

Els primers resultats d'aquests tres primers dies són molt positius, ja que ens permeten veure que les mostres amb font de carboni han tingut un creixement major a la que no en tenia. Aquest creixement s'ha completat en unes 72 hores, encara que la mostra d'oli ho va fer en 48 hores. Això, també ens permet observar que les *Pseudomonas* prefereixen una font de carboni amb una major quantitat de carbonis, com són els àcids grassos que conté l'oli.

En tornar a posar-hi un excés de carboni al quart dia (assenyalat en blau al gràfic), les mostres amb oli van tornar a arribar a un pic entre les 48-72 hores posteriors, i les que tenien el sucre ho van fer entre les 120-144 hores.



En finalitzar els 11 dies d'experimentació es va poder concloure que les *Pseudomonas* van presentar un període de producció d'uns 3-4 dies quan el seu substrat és de caràcter glúcid, mentre que si la font de carbonis és de caràcter lipídic, aquest procés s'accelera i es realitza en 2-3 dies. També es va poder comprovar que aquest creixement s'havia produït en tenir una limitació de fòsfor i nitrogen, i un excés de carboni al medi.

PRÀCTICA III: FERMENTACIÓ DELS FANGS

En aquesta pràctica es va voler simbolitzar la sistemàtica de producció de PHA a través dels residus de la depuradora de Tarragona.

Aquest procés consistiria a fer servir un bioreactor i seguir els mateixos passos del model de producció de PHA exposats a l'apartat 2.4. BIOREFINERIA A UNA EDAR

Com que no es disposava d'un bioreactor adequat, no es va poder fer la selecció de bacteris productors mitjançant el mètode del cicle "excés-limitació (feast-femine)".

Data	Pràctica III	Nom de la pràctica: Fermentació dels fangs	
6/09/20	Objectiu: Simular el procés de producció de PHA en una EDAR		
Materials: Vasos de precipitats, balança, espàtula, agitador, imants d'agitació, incubador, aigua destil·lada i Parafilm.			
Procediment		Esquema	
1. Posar 100 g de fang de depuradora i 25 g de llots actius en un recipient tancat.		Vasos de precipitats: 	
2. Identificar les rèpliques amb els codis: F1, F2, F3.			
3. Mantenir els recipients en agitació a 100 rpm i a una temperatura de 30 °C durant un període de 7 dies.			
Imatges:			
			

Taula 5. Pràctica III

Al cap d'aquests dies, la mostra estava molt més líquida a causa de la descomposició de la matèria que s'havia produït. Això fa pensar que es va dur a terme el procés de fermentació, generant-se AGV al medi, i que aquests AGV van ser ingerits pels bacteris presents a la mostra, com a substrat alimentari per a la producció de PHA.

3.2. BLOC EXPERIMENTAL II

El bloc experimental II també està dividit en tres pràctiques:

Pràctica 1	Comprovació que el biopolímer produït és PHA (H1/H2/H3.1)
Un cop les <i>Pseudomonas</i> van créixer i el fang actiu va passar a un estat més líquid, es va realitzar una tinció específica per a PHA, per tenir l'evidència científica que el biopolímer produït era PHA. Amb aquesta tinció es va poder observar el material intern dels bacteris a través de la microscòpia òptica. D'aquesta manera es va poder comprovar d'una forma molt visual si realment el creixement dels bacteris va estar causat per la formació de PHA.	
Pràctica 2	Extracció del PHA
Quan es va observar que els bacteris van produir PHA, es va iniciar el procés d'extracció del biopolímer, per a després poder comprovar el tipus de PHA produït (scl-PHA / mcl-PHA). En aquest treball es va utilitzar el mètode d'extracció química fent servir l'hexà com a dissolvent.	
Pràctica 3	Tipus de PHA produïts (H3.3)
Una vegada es va extreure el polímer, es va realitzar l'última pràctica que va consistir en l'anàlisi d'aquest polímer mitjançant la cromatografia de gasos i l'espectrometria de masses. Aquesta tècnica va permetre comprovar quins tipus de PHA havien produït les <i>Pseudomonas</i> .	

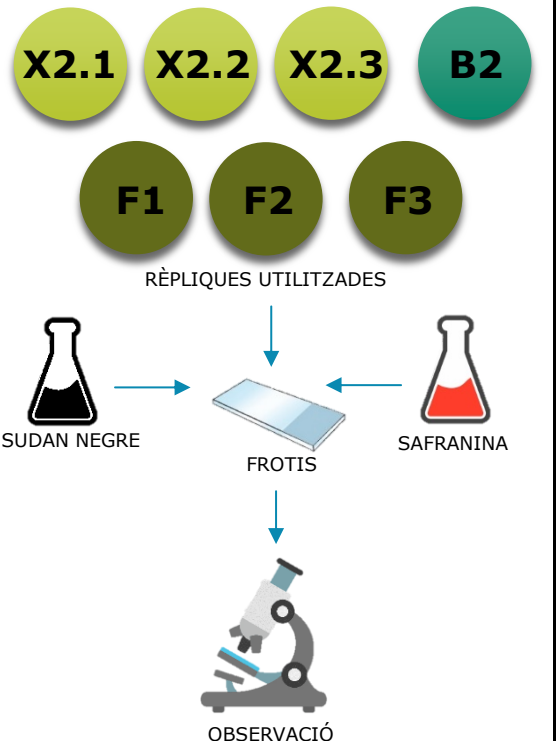
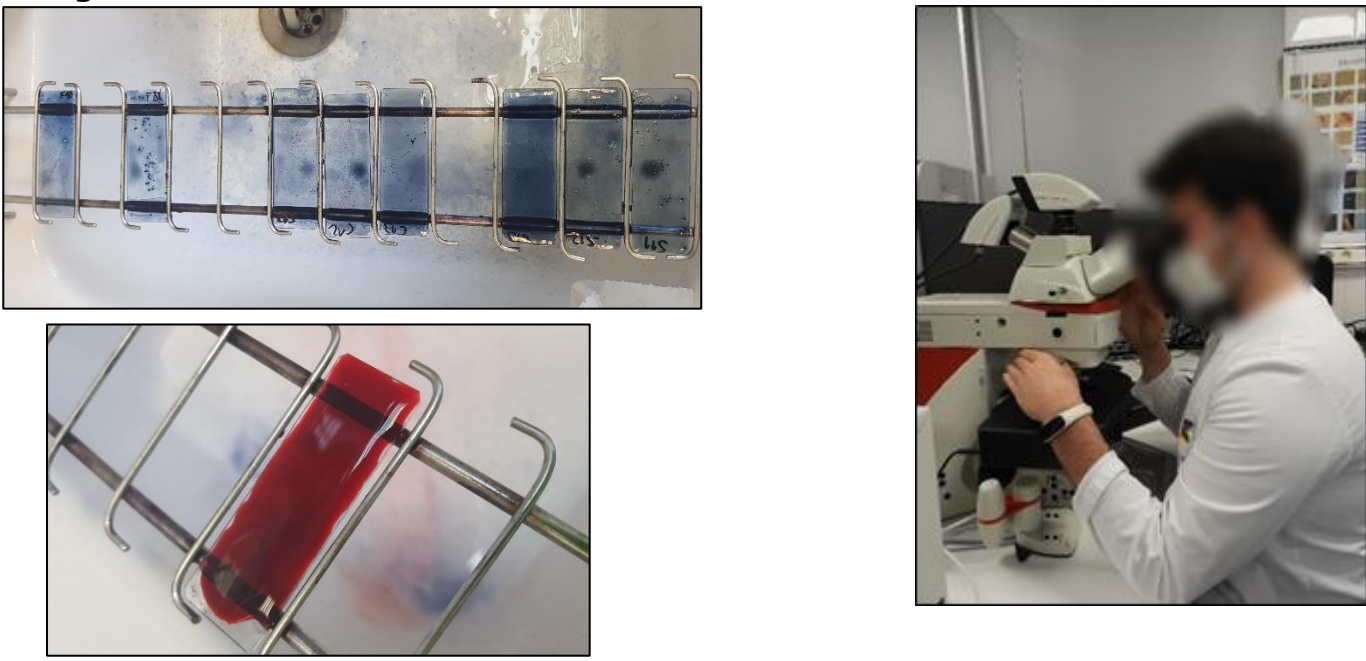
Taula 6. Esquema bloc experimental II

PRÀCTICA I: COMPROVACIÓ QUE EL BIOPOLÍMER PRODUÏT ÉS PHA

En aquesta pràctica es va voler comprovar que realment tant el cultiu pur de *Pseudomonas putida* KT2442 com els bacteris de la mostra de fang actiu de l'EDAR de Tarragona, havien produït PHA.

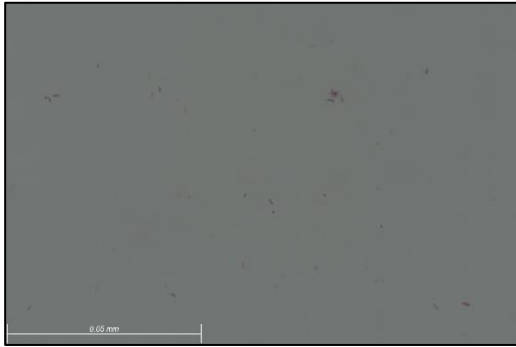
Per realitzar aquesta comprovació es va fer una altra tinció. En aquest cas, es va utilitzar una tinció específica per a grànuls de PHA, que havia de permetre veure si realment dintre dels bacteris hi havia aquest material.

Els tints que es van utilitzar van ser el Sudan negre, que havia de tenyir el PHA de color blau, i la safranina, que havia de tenyir tota la biomassa de color vermell. Aquesta tinció es va realitzar seguint el procediment descrit al llibre "*Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*".

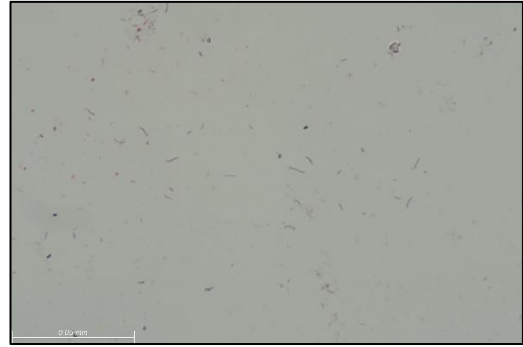
Data	Pràctica I	Nom de la pràctica: Comprovació que el biopolímer produït és PHA (H1/H2/H3.1)	
13/09/20	Objectiu: Comprovar si s'ha produït PHA a l'interior de les cèl·lules		
Materials: Repliques de producció X2.1, X2.2, X2.3, el grup control B2, les mostra fermentades de fang, tints específics de PHA (Sudan negre i safranina), microscopi òptic, porta objectes, aigua destil·lada i oli d'immersió			
Procediment		Esquema	
1. Preparar una solució de Sudan negre al 0,3% (pes/volum) en etanol del 60%.			
2. Preparar una solució de safranina al 0,5% (pes/volum) en aigua.			
3. Fer els frotis de les mostres per a l'observació al microscopi: Deixar caure 10ml de mostra al porta objectes mentre es manté a uns 30° d'inclinació i deixar assecar.			
4. Un cop els frotis s'han assecat, abocar solució de Sudan negre en excés per sobre durant 10 minuts per a tenyir el PHA. Passat el temps, netejar amb aigua destil·lada i assecar amb un paper.			
5. Abocar la solució de safranina en excés per sobre els frotis durant 10 segons per tenyir les cèl·lules, després tornar a netejar i assecar.			
6. Examinar els frotis a 1000 augments al microscopi			
Imatges:			
			

RESULTATS PRÀCTICA I

➤ Fotografies observació al microscopi



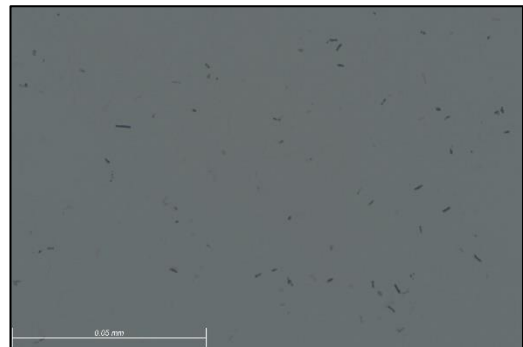
Imatge 29. Tinció bacteris grup control



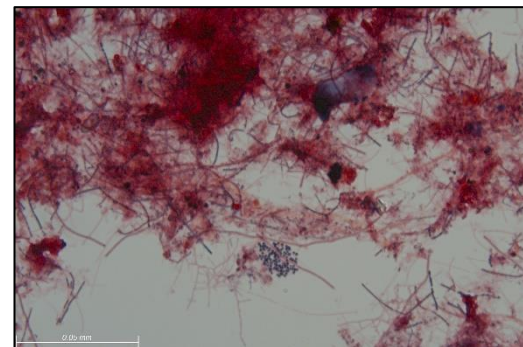
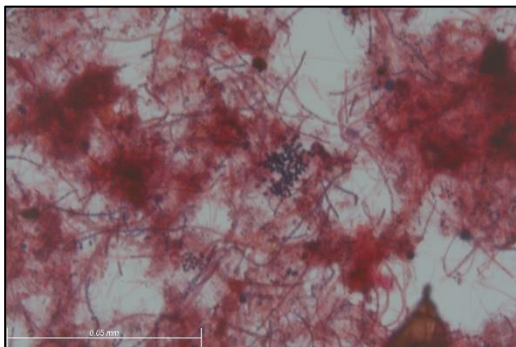
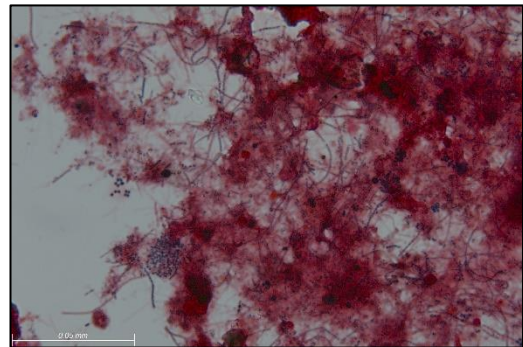
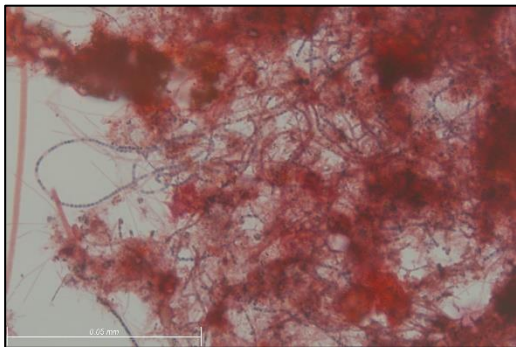
Imatge 30. Tinció bacteris alimentats amb sucre blanc



Imatge 31. Tinció bacteris alimentats amb oli d'oliva



Imatge 32. Tinció bacteris alimentats amb oli d'oliva



Imatge 33, 34, 35, 36. Tinció bacteris dels llots actius

CONCLUSIONS PRÀCTICA I

En les imatges del microscopi es va veure com el tint específic de PHA va tenyir els bacteris que emmagatzemaven el biopolímer en el seu interior.

En totes les observacions es va veure que hi havia els dos colors dels tints, per tant, es va poder concloure que tant les *Pseudomonas putida KT2442* com els bacteris del llot actiu van produir PHA.

Al comparar les mostres que contenien les *Pseudomonas putida KT2442*, es va veure que la mostra de l'oli havia produït més que la de sucre, encara que la diferència no va ser excessiva. Aquest fet va portar a la conclusió que les *Pseudomonas* preferien les fonts de carboni amb cadenes més llargues.

Per altra banda, en comparar la mostra de llot amb les mostres de *Pseudomonas*, sí que es va observar una major producció de PHA per part del llot de l'EDAR. També es va observar en aquesta mostra diversos tipus de bacteris, atès a les diferents morfologies observades, que van produir PHA.

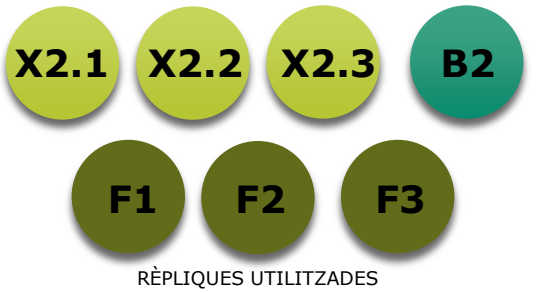
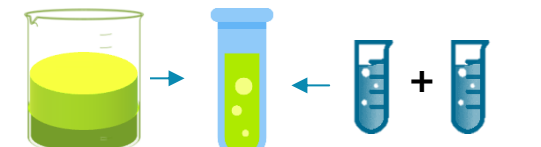
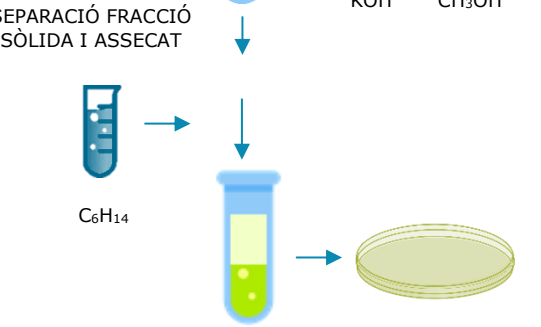





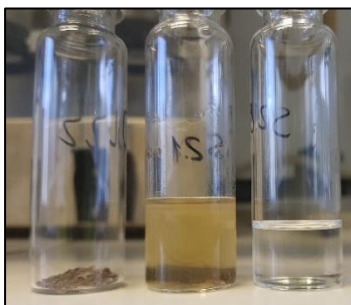
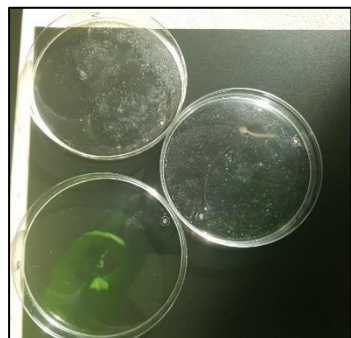
Aquesta comparació va ser important, donat que conclou que els bacteris de la depuradora de Tarragona produeixen PHA, i ho fan en major quantitat que les *Pseudomonas putida KT2442*.

PRÀCTICA II: EXTRACCCIÓ DEL PHA

Atès a l'afirmació que els bacteris van produir PHA, la segona pràctica va consistir en l'extracció d'aquest bioplàstic.

L'interès d'aquesta pràctica va ser intentar extreure el biopolímer de dins dels bacteris, per després analitzar-lo i intentar identificar quin tipus de PHA s'havia produït.

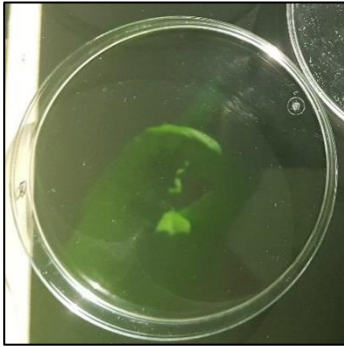
Per aquest motiu, es va fer una extracció química emprant hexà (C_6H_{14}) com a dissolvent de PHA. Per tal d'agilitzar aquest procés es va afegir hidròxid de potassi (KOH), metanol (CH_3OH) i també es va utilitzar l'agitació per ultrasons.

Data	Pràctica II	Nom de la pràctica: Extracció de PHA
14/09/20-16/09/20	Objectiu: Extreure el biopolímer format per les <i>Pseudomonas</i> i els bacteris del fang actiu per la posterior identificació.	
Materials: Rèpliques de producció X2.1, X2.2, X2.3, el grup control B2, les mostres fermentades de fang actiu, hidròxid de potassi (KOH), metanol (CH ₃ OH), hexà (C ₆ H ₁₄), bany d'ultrasons, tubs d'assaig, vasos de precipitats, nitrogen, centrífuga, forn, morter, plaques d'alumini, espàtula, pipetes <i>Pasteur</i> de vidre.		
Procediment		Esquema
1. Separar la part sòlida de tot el medi líquid fent servir la centrífuga.		
2. Assecar les mostres col·locant-les en un forn a 105°C durant 24 hores.		
3. Triturar les mostres amb un morter fins aconseguir obtenir una pols fina.		
4. Col·locar la pols en tubs d'assaig i afegir 10ml d'una solució al 30% de KOH-CH ₃ OH. Deixar els tubs durant 1h dins un bany d'ultrasons, per incrementar l'eficiència del procés de degradació de les capes cel·lulars.		
5. Un cop passat aquest temps, afegir als tub 5ml d'hexà (C ₆ H ₁₄) i deixar al bany d'ultrasons 10min.		
6. Deixar reposar el tub d'assaig fins que hi hagi una separació de fases (aquosa i orgànica). Extreure l'hexà que ha quedat a la part superior del tub amb l'ajuda d'una pipeta <i>Pasteur</i> de vidre i abocar-lo en una placa de petri. Reservar hexà amb PHA dissolt per a la pràctica III.		
7. Repetir el pas 5 i 6 tres vegades més, per extreure la major quantitat de PHA.		
9. Evaporar l'hexà sobrant amb una corrent de nitrogen gas (N ₂), perquè només quedi el PHA.		
10. Tancar les plaques de petri on dins es troba el PHA, per després observar-les al microscopi.		
Imatges:		
		
		

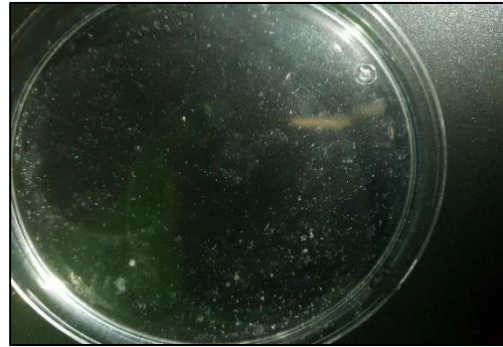
Taula 8. Pràctica II

RESULTATS PRÀCTICA II

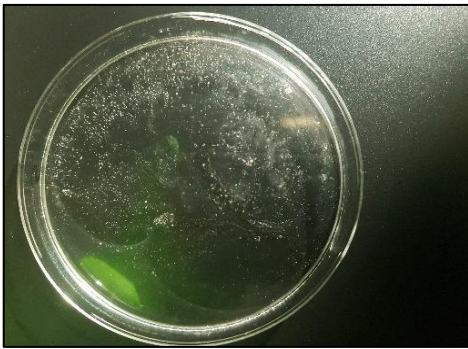
➤ Plaques de petri amb PHA



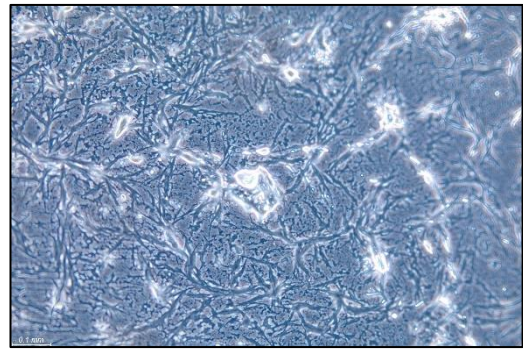
Imatge 37. Placa de petri grup control



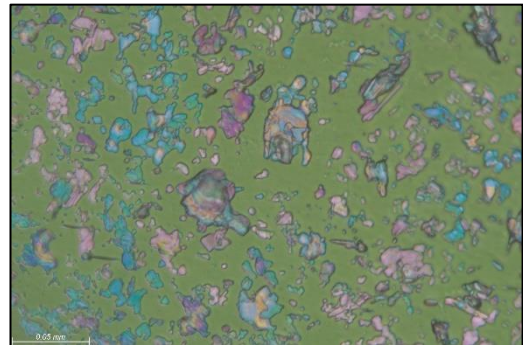
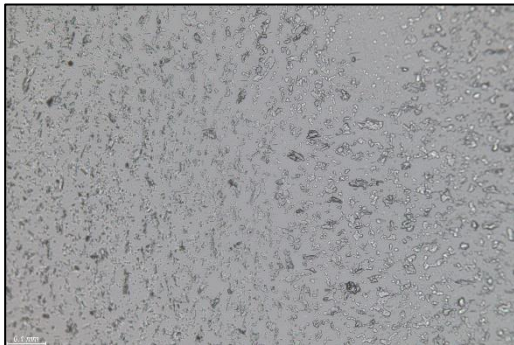
Imatge 38. Placa de petri mostra alimentada amb sucre blanc



Imatge 39. Placa de petri mostra alimentada amb oli d'oliva



Imatge 40. Fibres y acumulacions de polímer vistes a través de microscopi, mostra alimentada amb oli d'oliva



Imatge 41, 42. Acumulacions de polímer vistes a través de microscopi, llots actius

CONCLUSIONS PRÀCTICA II

La principal conclusió d'aquesta pràctica va ser poder arribar a veure amb l'ull humà els petits filaments i acumulacions del biopolímer generat.

També es va poder comprovar que, possiblement, el PHA produït per les *Pseudomonas* i el PHA produït pels bacteris dels llots actius no era el mateix tipus, ja que un va formar filaments i l'altre va acabar formant estructures cristal·lines, a causa del grau de cristal·lització. El que fa pensar, que les *Pseudomonas* van produir mcl-PHA i els bacteris de la depuradora de Tarragona van sintetitzar scl-PHA.

Per altra banda, també es va concloure que l'extracció química amb hexà va ser possible, fent servir una dissolució del 30% de KOH-CH₃OH, en un temps relativament curt.

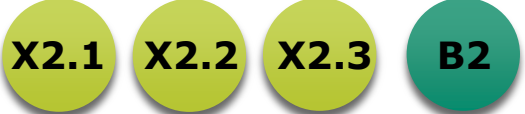
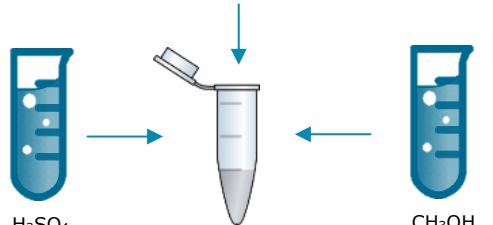
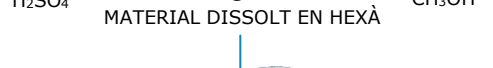


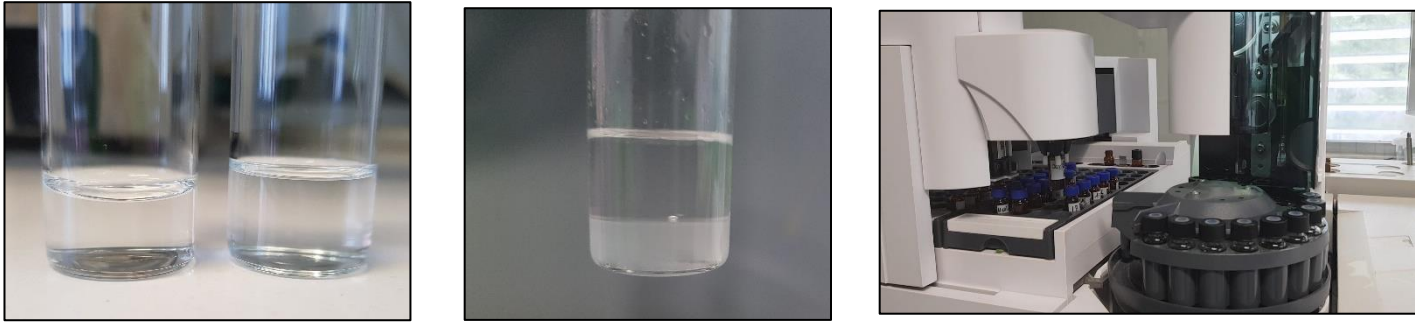
PRÀCTICA III: TIPUS DE PHA PRODUÏTS

En aquesta última pràctica d'aquest marc pràctic es van analitzar, per cromatografia, algunes de les mostres del PHA extret. D'aquesta manera, es volia identificar els tipus de PHA que van produir les *Pseudomonas*.

Per fer aquesta analítica es va utilitzar la tècnica de cromatografia de gasos fent servir l'espectrometria de masses com a sistema de detecció. La cromatografia de gasos és una tècnica de separació de mesclades de productes volàtils o semivolàtils fent servir un gas portador i un sistema de separació com és la columna cromatogràfica. La mostra s'introdueix en el port d'injecció del cromatògraf on es volatilitza i els vapors o gasos formats són arrossegats per un gas portador cap a la columna. El diferent grau d'interacció dels components de la mescla amb la fase estacionària de la columna fa possible la separació. Finalment, els components separats poden ser detectats, caracteritzats i quantificats utilitzant diferents detectors. En el cas concret d'aquesta pràctica es va fer servir un espectròmetre de masses com a detector.

Per realitzar la identificació cromatogràfica del biopolímer va ser necessari convertir-lo a monòmer. Per aconseguir-ho es va degradar el PHA extret amb una solució d'àcid sulfúric (H_2SO_4) amb metanol (CH_3OH). D'aquesta manera es trenca primer el polímer i després, els monòmers es derivatitzen a la forma metil èster per l'acció del metanol.

Finalment, els monòmers derivatitzats es van extreure amb cloroform per tal de poder cromatografiar-los.

Data	Pràctica III	Nom de la pràctica: Tipus de PHA produïts (H3.3)
16/09/20	Objectiu: Comprovar quins tipus de PHA han produït les <i>Pseudomonas putida</i> KT2442	
Materials: Material dissolt en hexà de les rèpliques X2.1, X2.2, X2.3 i el grup control B2, corrent de Nitrogen (N ₂), àcid sulfúric 96%, metanol, cloroform, bany d'ultrasons, dissolució de NaOH, pipetes de vidre, Na ₂ SO ₄ , cromatògraf.		
Procediment		Esquema
<p>1. Assecar amb una corrent de N₂ l'hexà amb PHA dissolt de la pràctica anterior. Després, afegir 3ml d'àcid sulfúric i 3ml de metanol al tub d'assaig.</p>		
<p>2. Posar el tub d'assaig en un bany d'ultrasons durant 1 hora.</p>		<p>RÈPLIQUES UTILITZADES</p>
<p>3. Passat l'hora, afegir 5ml de cloroform al tub d'assaig, que actuarà com a dissolvent de PHA. En aquest cas s'utilitza el cloroform perquè és el medi adequat per realitzar l'anàlisi cromatogràfica.</p>		
<p>4. Posar el tub al bany d'ultrasons durant 15 minuts, després es deixa reposar el tub i un cop s'hagin separat les fases, s'extrau el cloroform que haurà quedat a la part inferior.</p>		<p>MATERIAL DISSOLT EN HEXÀ</p>
<p>5. Neutralitzar el pH àcid de la mostra extreta amb cloroform afegint una dissolució de NaOH diluïda. Deixar separar les fases i extreure la fase del cloroform.</p>		
<p>6. En aquest moment, la mostra extreta amb cloroform podria contenir una petita porció de la fase aquosa que afectaria negativament a la columna del cromatògraf. Per això, es fa passar el cloroform a través d'una columna de vidre amb Na₂SO₄ que és una sal que es fa servir per absorbir la fase aquosa.</p>		
<p>7. Analitzar la mostra al cromatògraf.</p>		<p>CLOROFORM</p>
<p>8. Repetir tot el procés amb els 5ml d'hexà que s'havia reservat de cada mostra d'extracció.</p>		<p>CROMATÒGRAF</p> 
Imatges:		
		

Taula 9. Pràctica III

RESULTATS PRÀCTICA III

Cromatogrames obtinguts:

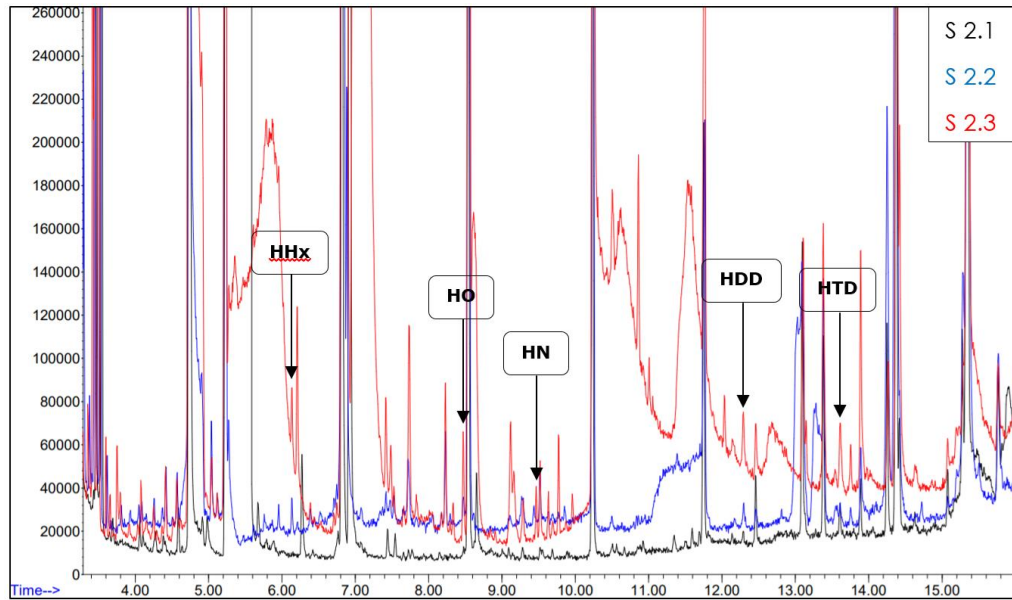


Figura 12. Cromatograma rèpliques alimentades amb sucre

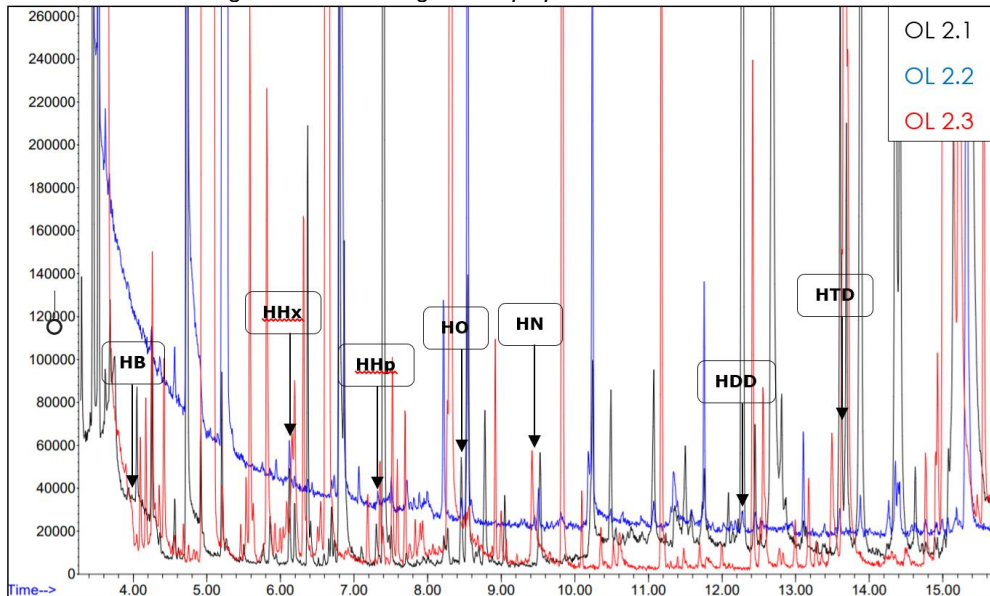


Figura 13. Cromatograma rèpliques alimentades amb oli d'oliva

CONCLUSIONS PRÀCTICA III

Després d'una anàlisi exhaustiva de tots els pics dels productes que contenen les mostres, es va poder comprovar quins eren els monòmers constituents de PHA que hi havia a les mostres.

Al material plàstic produït pels bacteris alimentats amb sucre, es va trobar presència dels monòmers constituents dels següents tipus de PHA:

- Poli hidroxi-hexanoat (PHHx)
- Poli hidroxi-octanoat (PHO)
- Poli hidroxi-nonanoat (PHN)
- Poli hidroxi-dodecanoat (PHDD)
- Poli hidroxi-tetradecanoat (PHTD)

Del residu al Bioplàstic

A les mostres del material plàstic produït pels bacteris alimentats amb oli d'oliva, es va trobar presència dels monòmers constituents dels següents tipus de PHA:

- Poli hidroxi-butirat (PHB)
- Poli hidroxi-nonanoat (PHN)
- Poli hidroxi-hexanoat (PHHx)
- Poli hidroxi-dodecanoat (PHDD)
- Poli hidroxi-heptanoat (PHHp)
- Poli hidroxi-tetradecanoat (PHTD)
- Poli hidroxi-octanoat (PHO)

Per tant, les anàlisis cromatogràfiques han confirmat que els filaments que s'havien vist a la pràctica II corresponien al PHA, majoritàriament mcl-PHA, generat pels bacteris.

4. CONCLUSIONS

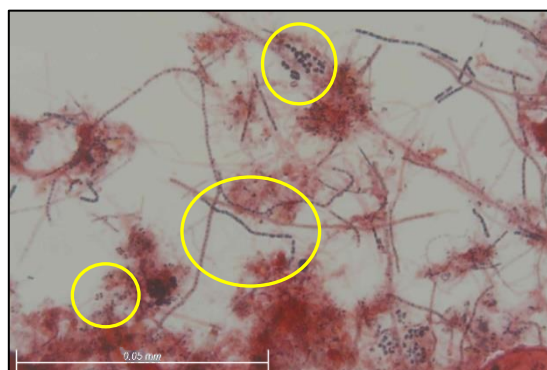
A partir dels resultats obtinguts a les diferents pràctiques, s'ha realitzat la comprovació d'hipòtesi com a conclusions del present treball de recerca.

	Es verifica	Es nega
H.1. És possible l'obtenció de bioplàstic a partir dels residus que arriben a la depuradora de Tarragona	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H.2. Els bacteris de la depuradora de Tarragona tenen més potencial productor que un cultiu de Pseudomonas (bacteris productors de PHA).	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H.3.1. El tipus de substrat amb el qual s'alimenten els bacteris influeix en la quantitat de PHA produït.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H.3.2. El temps de producció pot variar depenent de com sigui el substrat.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H.3.3. Un mateix bacteri pot produir diferents tipus de PHA.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

HIPÒTESI PRIMÀRIA: És possible l'obtenció de bioplàstic a partir dels residus que arriben a la depuradora de Tarragona.

Utilitzant únicament **residus de la depuradora de Tarragona** s'ha aconseguit simular un procés de producció de polihidroxialcanoats (PHA).

A través d'una tinció es va poder veure que diferents soques bacterianes dels llots actius de depuradora van produir PHA, utilitzant els AGV de la fermentació de residus com a substrat.



Imatge 43. Diferents soques de bacteris dels llots actius que han produït PHA.

Per tant, es pot afirmar que: **És possible implantar un procés paral·lel al de depuració d'aigües que permeti l'obtenció de bioplàstics**, a falta d'altres comprovacions sobre l'estat de l'aigua residual i de la reproducció del procés en una planta pilot.

El procediment també es verifica, atès que totes les rèpliques van donar resultats molt similars. Per altra banda, comparant la quantitat de producció de PHA dels bacteris dels llots actius alimentats amb AGV, respecte a la del grup de control (bacteris sense font de carboni en excés) s'aprecia una notable diferència.

HIPÒTESI SECUNDÀRIA: *Els bacteris de la depuradora de Tarragona tenen més potencial productor que un cultiu de Pseudomonas (bacteris productors de PHA).*

Comparant la producció de PHA dels bacteris de la depuradora i els bacteris del cultiu pur de *Pseudomonas*, es pot dir que s'ha generat més PHA per part dels bacteris dels llots actius, al ser un cultiu mixt de bacteris.

HIPÒTESIS TERCIÀRIES:

1. *El tipus de substrat amb el qual s'alimenten els bacteris influeix en la quantitat de PHA produït.*

Gràcies a la tinció de PHA es va poder observar que les *Pseudomonas* que havien estat alimentades amb un substrat lipídic (oli d'oliva) presentaven una major quantitat de producció, enfront de les *Pseudomonas* cultivades en un medi de cultiu amb substrat glúcid (sucre blanc). Mentre el grup control (sense font de carboni en excés) presentava una producció negligible.

Això ens permet afirmar que en un mateix tipus de bacteri (*Pseudomonas putida KT2442*) el substrat ha influït en la quantitat de PHA que s'ha produït, verificant la hipòtesi plantejada.

2. *El temps de producció pot variar depenent de com sigui el substrat.*

Observant les corbes de creixement dels bacteris es va poder comprovar que les *Pseudomonas* alimentades amb oli d'oliva van arribar als pics de producció màxima en un període de 48-72 hores, mentre que les *Pseudomonas* alimentades amb sucre blanc assolien als pics en un període de 72-120 hores.

3. *Un mateix bacteri pot produir diferents tipus de PHA.*

Aquesta hipòtesi va poder ser verificada gràcies als cromatogrames realitzats a la pràctica III del bloc experimental II, on es van poder observar els diferents tipus de monòmers que poden polimeritzar i formar PHA.

Les *Pseudomonas* amb sucre blanc com a substrat van produir: PHHx, PHO, PHN, PHDD i PHTD.

Les *Pseudomonas* amb oli d'oliva com a substrat van produir: PHB, PHHx, PHHp, PHO, PHN, PHDD, PHTD.

D'aquesta manera, es confirma que un mateix bacteri pot produir diferents tipus de polihidroxicanoats (PHA).

CONCLUSIONS PERSONALS:

Finalitzat aquest treball, estic satisfet de haver pogut comprovar experimentalment una idea innovadora i alternativa a la producció del plàstic convencional. A part, m'he sentit molt a gust treballant en un ambient científic en un laboratori microbiològic.

Per altra banda, valoro molt positivament el fet d'haver pogut mantenir una entrevista amb personal d'alt nivell científic en el camp de la biotecnologia.

La ciència és el futur de la humanitat. Louis Pasteur

5. ANNEXOS

5.1. GLOSSARI

Absorbància: Valor de l'absorció que es produeix quan la llum (o, més generalment, l'energia radiant) travessa una substància. Es calcula amb la següent fórmula:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

On I és la intensitat de llum amb una longitud d'ona específica (λ) després de incidir en la mostra i I_0 és la intensitat de la llum, amb la mateixa longitud d'ona (λ), mesurada en un espai buit.

Àcids grassos volàtils (AGV): Són àcids grassos amb una cadena de carbonis de 6 o menys carbonis.

Autòlisi: Fenomen consistent en la destrucció total o parcial del contorn de la cèl·lula i en la dispersió del citoplasma, de forma totalment autònoma.

Bicapa fosfolipídica: Associació de fosfolípids que en un medi aquós encaren els seus extrems apolars (parts hidròfugues) i mantenen en contacte amb el medi els seus grups polars (parts hidròfiles); així es poden formar vesícules o liposomes tancats sobre ells mateixos.

Biomassa: Massa total de la matèria viva existent en una comunitat o en un ecosistema.

Centre quiral: Àtom situat en el centre d'un compost que presenta quiralitat, és a dir, no és superposable a la seva imatge especular.

Citoplasma: Constituent fonamental de la cèl·lula, delimitat per la membrana plasmàtica i la membrana nuclear, on van inclosos la resta d'elements cel·lulars.

Copolímer: Un copolímer és un polímer derivat de dues o més espècies químiques monomèriques.

Cromosoma: Estructura cel·lular formada per ADN i proteïnes associades que transporta la informació genètica.

Cultiu mixt: Cultiu de bacteris que conté més d'una espècie.

Cultiu pur: Cultiu en què totes les cèl·lules provenen d'una sola cèl·lula inicial i mantenen llurs característiques genètiques al llarg del temps.

Enantiòmers: Dos compostos que són imatges especulars completes no superposables l'una a l'altra, de la mateixa manera que dues mans són "iguals" però inverses.

Enllaç èster: Un enllaç èster es defineix com l'enllaç entre un grup alcohol (-OH) i un grup àcid carboxílic (-COOH), format per l'eliminació d'una molècula d'aigua (H₂O).

Enzim: Els enzims són substàncies orgàniques, gairebé sempre de natura proteica, que acceleren reaccions químiques. Els enzims interaccionen amb molècules de partida (substrats) i catalitzen la seva transformació en altres de diferents (productes).

Espectrofotometria: Anàlisi de l'espectre d'absorció d'una substància mitjançant un espectrofotòmetre.

Fluorescència: Emissió de radiació per àtoms o molècules que han estat excitats per absorció de fotons.

Força de tensió: La tensió és una força de reacció aplicada per un objecte als objectes que l'estiren.

Genoma: Contingut total d'ADN propi del conjunt de cromosomes d'una espècie.

Glicerol: El glicerol és un alcohol que conté en la seva estructura tres grups hidroxils (-OH). La seva fórmula química és C₃H₈O₃ i també pot ser anomenat glicerina, actua com a component central de diversos lípids juntament amb els àcids grassos.

Hidrolitzar: Descomposició d'una substància química per l'acció de l'aigua.

Homodímer: En biologia un dímer és una proteïna composta per dues subunitats. En el cas dels homodímers, les dues subunitats són idèntiques.

Liofilització: Operació que consisteix en una congelació, seguida d'una deshidratació per sublimació que té lloc en un recipient on prèviament s'ha fet el buit.

Monòmers: Cadascuna de les molècules simples, generalment de pes molecular baix, que formen cadenes de dues (dímer), tres (trímer) o més (polímer) unitats.

Observació microscòpica *in vivo*: Observació d'un subjecte en estat viu.

Operó: Regió cromosòmica que conté un cert nombre de gens regulats per un promotor-operador comú que codifiquen diferents proteïnes relacionades funcionalment.

Osmosi: Tendència a passar dissolvent de la dissolució menys concentrada a la que ho és més, en un sistema format per dues dissolucions de concentracions diferents, però amb el mateix dissolvent, separades per una membrana semipermeable.

Punt de fusió: El punt de fusió d'un material és la temperatura a la qual aquest material comença a canviar el seu estat de sòlid a líquid a una determinada pressió.

Radical: Són àtoms o molècules amb electrons desaparellats, per la qual cosa són molt reactius i es combinen amb facilitat amb altres àtoms o molècules.

Reacció catabòlica: Reacció de degradació que comporta una oxidació i que té lloc en els processos del metabolisme.

Reacció de reducció (anabòlica): Fenomen constructiu, que inclou processos de síntesi i requereix energia. S'oposa a catabolisme.

Transició vítria: La temperatura de transició vítria és el canvi de la fluïdesa d'un material per efecte de la temperatura que separa regions rígides de viscoses, de manera simplificada es pot entendre com que a aquesta temperatura el polímer deixa de ser rígid i comença a estovar-se.

5.2. BIBLIOGRAFIA

1. ÁLVAREZ DA SILVA, Laura (2016). *Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos*. Treball fi de grau.
2. AYMÀ MALDONADO, Patricia (2016). *PHA accumulating bacteria selection in a sbr treating fermentation liquids of organic fraction of municipal solid waste*. Master final project.
3. F. CHEK, Min; KIM, Sun-Yong; MORI, Tomoyuki i HAKOSHIMA, Toshio (2017). *Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from Chromobacterium sp. USM2, producing biodegradable plastics*. *Scientific Reports*, NATURE, 7:5312, 2017
4. G. RICHARD, Michael; T. DAIGGER, Glen; JENKINS, David. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. IWA Publishing, 2003 (ISBN: 9781843390466)
5. GARCÍA HIDALGO, Javier (2014). *PHB despolimerasas de Streptomyces exfoliatus y Streptomyces ascomycinicus. Caracterización de enzimas con potencial aplicación biotecnológica*. Tesis doctoral.
6. GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda; MEZA CONTERAS, Juan Carlos; GONZÁLEZ REYNOSO, Orfil i CORDOVA LÓPEZ, Jesús Antonio (2011). *Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano*. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29. 77-115, 2013.
7. *Gran enciclopèdia Catalana*. Grup Enciclopèdia Catalana. Disponible a Internet: <<https://www.enciclopedia.cat/>>
8. JENDROSSEK, Dieter i PFEIFFER, Daniel (2013). *New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)*. *Environmental Microbiolog* 16 pàg.2357–2373 (2014)
9. JIMENO FERNANDEZ, Antonio; BALLESTEROS VÁZQUEZ, Manuel i RODRÍGUEZ, Santiago. *Biología 2 Batxillerat*. Santillana, 2016 (ISBN: 9788490470374).
10. KOLLER, Martin (2019). *Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis at the Edge of Water Activity-Haloarchaea as Biopolyester Factories*. *Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production*, Volume 2 (ISBN: 978-3-03928-640-9) Art. 1, 2020.
11. L. MADISON, Lara i W.HUISMAN, Gjalte (1999). *Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic*. *American Society for Microbiology* V.63, N°1, 1999.
12. MENG MENG, Cai; HONG, Chua; QINGLIANG, Zhao, SHIRLEY, Sin Ngai i JIE, Ren (2008). *Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids*

(VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresource Technology* 100 pàg.1339-1405 (2009).

13. OBESO RODRÍGUEZ, José Ignacio (2017). *Síntesis de polihidroxicanoatos en Pseudomonas putida: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales*. Tesis doctoral.
14. PITTMAN, Timo i STEINMETZ, Heidrun (2017). *Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants*. *Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production* (ISBN: 978-3-03842-637-0) Art. 12, 2017.
15. REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; RASHMI i KALIA, V.C. (2002). *Polyhydroxyalkanoates: an overview*. *Bioresource Technology* 87 pàg.137-146 (2003).
16. RODRIGUEZ-CONTRERAS, Alejandra (2019). *Recent Advances in the Use of Polyhydroxyalkanoates in Biomedicine*. *Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production, Volume 2* (ISBN: 978-3-03928-640-9) Art. 10, 2020.

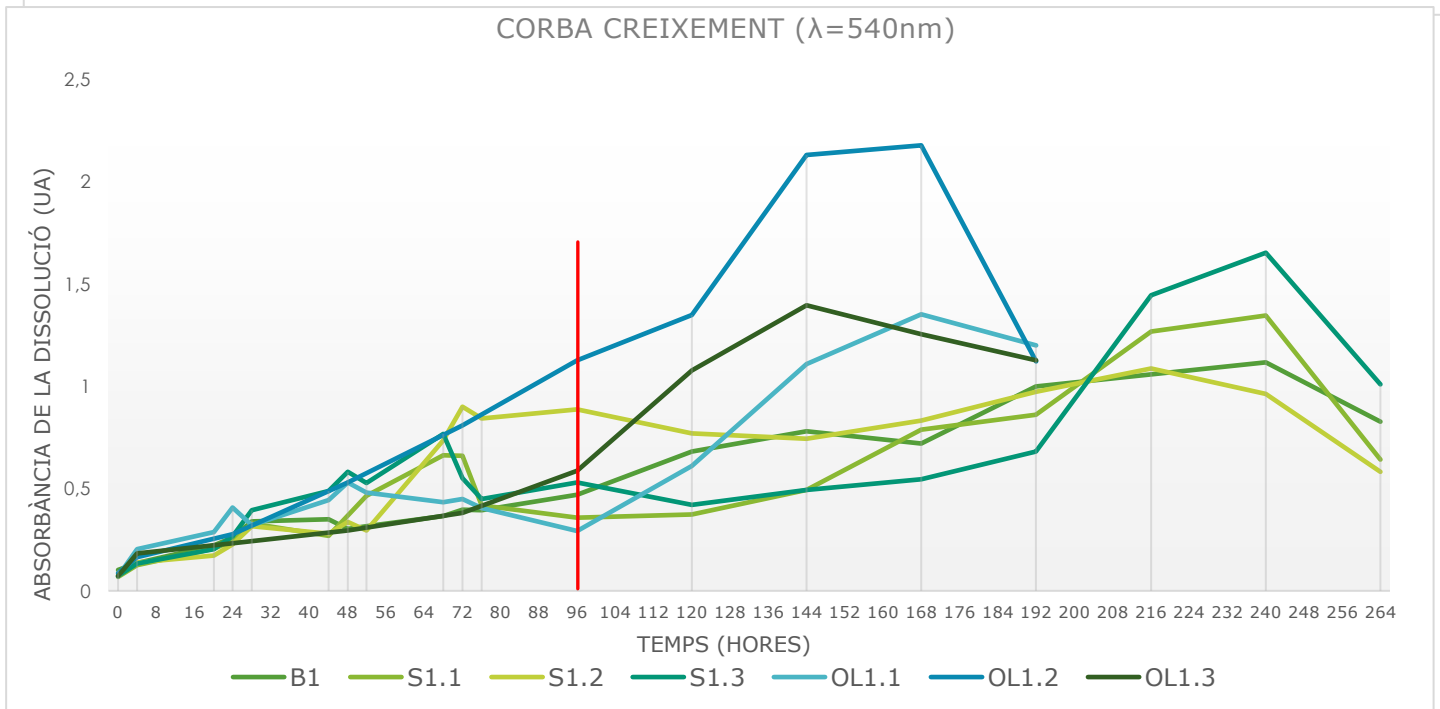
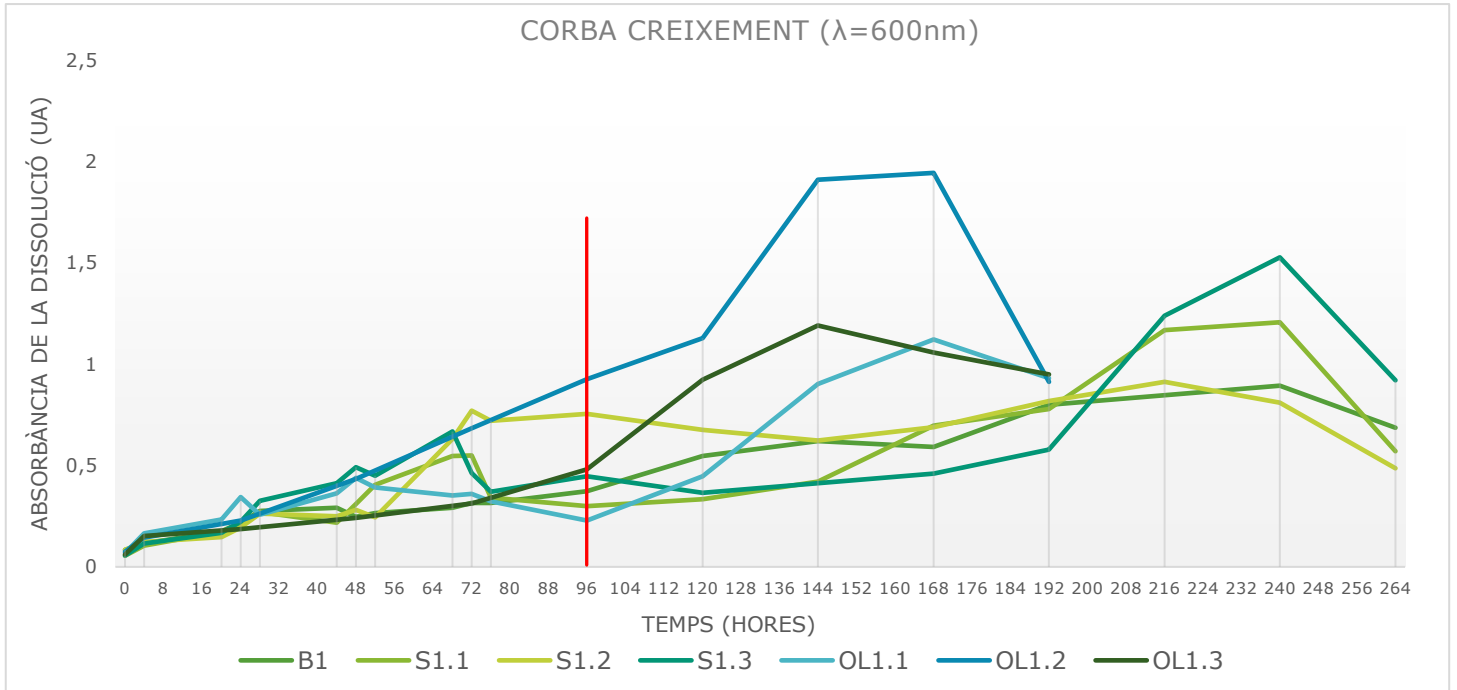
5.3. WEBGRAFIA

1. Què són els plàstics? [Consultat: 30-6-20] <<https://www.plasticseurope.org/es/about-plastics/what-are-plastics>>
2. Història dels plàstics [Consultat: 2-7-20] <<https://www.abc-pack.com/enciclopedia/historia-de-los-plasticos/>>
3. Tipus de plàstics [Consultat: 3-7-20] <<https://www.plasticseurope.org/es/about-plastics/what-are-plastics/large-family>>
4. El 91 por ciento del plástico que fabricamos no se recicla [Consultat: 3-7-20] <<https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/2017/07/el-91-por-ciento-del-plastico-que-fabricamos-no-se-recicla>>
5. Bioplastics market data [Consultat: 4-7-20] <<https://www.european-bioplastics.org/market/>>
6. Todo lo que necesitas saber sobre los bioplásticos [Consultat: 7-7-20] <<https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/2018/11/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-los-bioplásticos>>
7. Datos de mercado del sector del plástico en Europa [Consultat: 8-7-20] <<https://www.plasticseurope.org/es/resources/market-data>>
8. Què són els plàstics? [Consultat: 8-7-20] <<https://www.plasticseurope.org/es/about-plastics/what-are-plastics>>
9. Polyhydroxyalkanoates [Consultat: 9-7-20] <<https://en.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxyalkanoates>>
10. Polihidroxicanoatos (PHA) [Consultat: 9-7-20] <<https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/10/polihidroxicanoatos-pha.html>>
11. BioBarr [Consultat: 13-7-20] <<https://www.biobarr.eu/>>
12. Tinció de Gram [Consultat: 15-7-20] <https://ca.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3_de_Gram>
13. SWISS-MODEL [Consultat: 24-7-20] <<https://swissmodel.expasy.org/>>
14. ADM Biopolis [Consultat: 13-8-20] <<http://biopolis.es/>>

15. Funcionament d'una EDAR [Consultat: 25-8-20] <<https://twenergy.com/ecologia-y-reciclaje/funcionamiento-de-una-depuradora-de-aguas-residuales-1299/>>

5.4. MATERIAL COMPLEMENTARI

➤ GRÀFICS CORBES DE CREIXEMENTS PRÀCTICA II DEL BLOC I:



➤ INSTAL·LACIONS LABORATORI EMATSA:



