



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas  
aeruginosa* 42A2: producció i caracterització**

Mònica Bassas i Galià 2007





UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de doctorat: Química Orgànica (Facultat de Químiques)

BIENNI 2002-2004

Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2: producció i caracterització

Memòria presentada per **Mònica Bassas i Galià** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Director/a:

Dra. Àngels Manresa i Presas

Dr. Joan Llorens i Llacuna

Doctorand:

Mònica Bassas i Galià

**Mònica Bassas i Galià, 2007**



La veritat és que aquesta és una de les parts de la tesi que menys m'ha costat d'escriure. Al llarg d'aquests quatre anys llargs de tesi he tingut l'oportunitat de conèixer gent molt diversa, dels quals he après moltes coses, tant a nivell professional com a nivell personal. Amb algunes d'aquestes persones hem compartit moments molt especials, algunes llàgrimes però sobretot molts somriures. Han estat quatre anys d'aprenentatge i treball constant i arribat a aquest punt m'agradaria donar les gràcies a totes les persones que m'han ajudat i han confiat en mi.

Al Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, per permetre la realització de la meva tesi, però sobretot vull agrair el suport i ajut que sempre he rebut per part de tots els professors i membres del laboratori de Microbiologia. També m'agradaria tenir un record especial pel Dr. Guinea qui sempre em va oferir un somriure i un bon consell.

Als meus directors de tesi, a la Dra. Àngels Manresa, gràcies per confiar en mi, en molts moments més del que jo mateixa ho feia, i donar-me l'oportunitat d'arribar fins aquí i al Dr. Joan Llorens, per acceptar dirigir la tesis i pels bons consells rebuts.

A la Dra. Montse Busquets, per donar-me la primera oportunitat i confiar en mi quan encara no havia ni acabat la carrera. A la Dra. Josele Espuny i a la Dra. Ana Marqués, per ensenyar-me a “disfrutar” amb la microbiologia i per cuidar-me durant tots aquests anys. A la Dra. M<sup>a</sup> José Prieto per totes les hores davant el microscopi d'AFM mentre intentàvem arreglar el món.

A la Glòria, la M<sup>a</sup> Jesús i la Lucia, gràcies per la vostra ajuda, suport i paciència en els moments més “crítics”.

A tota la gent del Departament de Micro, als que encara hi són i tots aquells que ja han marxat: Alberto, Flori, Bea, Carmen L., Pili, Maria, Victor Meche B, Aintzane, Joan, Merche, Sònia B. i Sara.

A tota la gent dels Serveis Científicotècnics. A la Unitat de RMN, a la Dra. Ana Linares i a la Dra. M<sup>a</sup> Antònia Molins, per ajudar-me sempre amb amabilitat i un somriure. A la Unitat de CG-EM, a la Dra. Irene Fernández, a la Dra. Asunción Marín i a la Laura, gràcies per ajudar-me i ensenyar-me tant. A la Unitat de Tècniques nanomètriques, al Dr. Jordi Díaz, per ensenyar-me i ajudar-me amb la microscòpia d'AFM però sobretot gràcies pel teu entusiasme. A la Unitat de Química Fina, al Dr. Rafel Prohens, a la Dra. Cristina Puigjaner i al Rafa Barbas, gràcies per la vostra ajuda i paciència en molts moments, però sobretot gràcies per fer-me somriure sempre, tot i que sóc “l'ex-usuària helvètica predilecta”.

A la M<sup>a</sup> Carme, gràcies per moltes coses però sobretot per escoltar-me, ajudar-me i compartir amb mi la teva amistat (a part de les “batucades”). A l'Oriol, amb qui no tan sols he compartit hores de laboratori sinó amb qui també comparteixo, malgrat la distància, una bona amistat.

A totes les generacions del grup de tensis. A la Dèlia, l'Arelis, l'Ester, el Jordi C, l'Anna, el Pau, la Paula, la Heli, la Queralt, el Frank, la Ruth, la Rosa M<sup>a</sup>, l'Amara, el Nacho i l'Eriel.

Al Raúl H. i a l'Ana C., gràcies per a realitzar un excel·lent treball, però el més important gràcies per la vostra confiança i amistat.

A la Noelia i a l'Albert, amb qui no tan sols he compartit la part final de la tesi, sinó amb qui sobretot he compartit alguns dels millors moments de tots aquests anys. Gràcies per tots els somriures, per tots els “grans gatsbies”, gràcies pel vostre recolzament però sobretot gràcies per la vostra amistat. Al Dr. David Miñana (“Minyins”), gràcies per tots els bons consells, per la paciència i comprensió durant l'etapa d'escriptura de la tesi, però sobretot gràcies per compartir tots aquests moments amb mi.

A l'Éscar i al Jaume, els meus punts de referència i de recolzament al llarg de tota la tesi. Amb qui he compartit infinites hores de laboratori, i dels quals he après moltíssimes coses. Gràcies per la vostra ajuda i confiança però sobretot gràcies per la vostra amistat més enllà de les portes del laboratori.

I would like to thank all the members of the biopolymers group from EMPA (St.Gallen): Tinka, Ernst, Patrick, Eva, Thomas, Sabrina, Elisabeth, Dr. R. Hany, Dr. A. Grubelnik and Dr. M. Schmid for helping me along my stage and Dr. Hartmann and Dominik Noger for the help in the cultures with bioreactors. I especially would like to thank Dr. Manfred Zinn for the confidence and the help received along the six months I was there, and Dr. Qun Ren for her confidence and friendship.

I also would like to thank Sabine, Enrico, Conny, Mutlu and all the St.Galleners, you have been my family during my stage in St. Gallen. Sabine and Enrico, you have been my main support there, not only in the lab but also at home. Sabine, we share really good moments but also a sad ones, thank you for always being there. Enrico, thank you for the long talks (“kitchen sessions”) and for the special moments we shared. At the end, I only can say Vielen Danke.

A la Sílvia i al Manel, a l’Olga, a la Cristina M. i a l’Elisenda, a l’Isra i al David R., gràcies per escoltar-me, ajudar-me i compartir amb mi la vostra amistat des de fa tants anys.

I finalment vull agrair a la meva família el suport incondicional, la confiança cega i sovint la paciència il·limitada. A la Montse, la Maria i l’Ernest, gràcies per fer-me sempre costat en els bons i en els mals moments. Als meus pares, gràcies per ajudar-me a arribar fins aquí, heu estat un exemple per a mi.





## *Als meus pares*

*“...som l’encarnació local d’un Cosmos que ha crescut fins tenir consciència de si mateix. Hem començat a contemplar els nostres orígens: material estel·lar que medita sobre els estels; conjunts organitzats de desenes de milers de bilions de bilions d’àtoms que consideren l’evolució dels àtoms; traçant el llarg camí a través del qual, com a mínim aquí, va sorgir la consciència. Les nostres lleialtats són vers les espècies i el planeta. Nosaltres parlem en nom de la Terra. Devem la nostra obligació de sobreviure no només a nosaltres mateixos sinó també al Cosmos, antic i vast, del qual eixim”.*

*Carl Sagan, Cosmos.*

*“Uno no puede por menos que asombrarse cuando contempla los misterios de la eternidad, de la vida, de la maravillosa estructura de la realidad “, escribió y añadió: “Es suficiente, si uno intenta comprender un poco de este misterio cada día”.*

*Einstein*



**ÍNDEX**

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>3</b>
1.1. Biopolímers. Els plàstics del futur?	3
1.2. Els Polihidroxicanoats (PHAs)	5
1.2.1. Revisió històrica	5
1.2.2. Estructura i propietats	9
1.2.3. Aplicacions potencials i/o aplicacions reals dels PHAs	17
1.2.4. Biosíntesi dels PHAs: rutes metabòliques	19
1.2.5. Estructura i formació del grànul de PHA	24
1.2.5.1. Grànuls en capes	25
1.2.6. Síntesi de PHAs de disseny	27
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>37</b>
3.1. Microorganisme	37
3.2. Medi de cultiu i condicions de cultiu	37
3.2.1. Cultius de cèl·lules proliferants	37
3.2.1.1. Composició i preparació del medi de cultiu	39
3.2.1.2. Fonts de carboni	39
3.2.1.3. Preparació de l'inòcul	41
3.2.1.4. Condicions de cultiu: matrassos i bioreactor	41
3.2.2. Cultius amb cèl·lules no proliferants	43
3.2.2.1. Composició i preparació del medi de cultiu	44
3.2.2.2. Fonts de carboni	44
3.2.2.3. Inòcul	44
3.2.2.4. Condicions de cultiu: matrassos	44
3.3. Determinació de la biomassa	45
3.3.1. Experiments amb matrassos	45
3.3.2. Experiments amb bioreactor	45
3.4. Determinació de la font de nitrogen residual	45
3.5. Determinació de la font de carboni residual (TOC)	46
3.6. Determinació qualitativa i quantitativa del polímer (PHA)	46

---

3.6.1. Determinació qualitativa dels grànuls de PHA. Tinció amb roig nil .....	46
3.6.2. Determinació quantitativa del polímer .....	46
3.6.2.1. Liofilització de la biomassa .....	47
3.6.2.2. Extracció del polímer .....	47
3.6.2.3. Quantificació del polímer .....	47
3.7. Caracterització del PHA .....	48
3.7.1. Purificació del polímer .....	48
3.7.2. Hidròlisi del polímer .....	49
3.7.2.1. Metanòlisi amb H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	49
3.7.2.2. Metanòlisi amb BF <sub>3</sub> /MeOH .....	49
3.7.2.3. Propanòlisi amb HCl/PrOH .....	50
3.7.3. Derivatització del polímer: reacció de sililació .....	50
3.7.4. Tècniques estructurals .....	51
3.7.4.1. Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier (FTIR) .....	51
3.7.4.2. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) .....	52
3.7.4.3. Cromatografia de Gasos acoblada a Espectrometria de Masses .....	52
3.7.5. Microscòpia .....	54
3.7.5.1. Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM) .....	54
3.7.5.2. Microscòpia de Força Atòmica (AFM) .....	55
3.7.6. Propietats tèrmiques .....	56
3.7.6.1. Anàlisi Calorimètrica Diferencial (DSC) .....	56
3.7.6.2. Termogravimetria (TG) .....	57
3.7.7. Determinació del Pes Molecular. Cromatografia de Permeació de Gel (GPC) ....	57
3.7.8. Tècniques fotoquímiques .....	58
3.7.8.1. Preparació dels films .....	58
3.7.8.2. Irradiació amb llum ultravioleta (UV) .....	59
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>63</b>
4.1. Fonts de carboni complexos .....	63
4.1.1. Cultius i producció de PHA amb substrats complexos .....	63
4.1.1.1. Extracte monodi .....	63
i. Cultiu discontinu .....	65
ii. Cultiu alimentat .....	67
iii. Cultiu en condicions no proliferants .....	69
4.1.1.2. Àcid linoleic .....	71
4.1.1.3. Oli de llinosa .....	76

---

4.1.2. PHAs: estructura i propietats .....	81
4.1.2.1. Espectroscòpia d'Infraroig (FTIR) .....	81
i. PHA-monodi .....	81
ii. PHA-linoleic .....	81
iii. PHA-L (oli de llinosa) .....	81
4.1.2.2. Ressonància Magnètica Nuclear (NMR) .....	83
i. PHA-monodi .....	83
ii. PHA-linoleic .....	86
iii. PHA-L (oli de llinosa) .....	89
4.1.2.3. Cromatografia de Gasos - Espectrometria de Masses .....	92
i. PHA-monodi i PHA-linoleic .....	95
ii. PHA-L (oli de llinosa) .....	97
4.1.2.4. Propietats Tèrmiques i Pes Molecular .....	103
4.1.3. Estudi de la reacció d'entrecruament del PHA d'oli de llinosa .....	104
4.1.3.1. Procés natural .....	106
i. Espectroscòpia d'infraroig (FTIR) .....	107
ii. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) .....	108
iii. CG-EM: composició monomèrica .....	110
iv. Propietats tèrmiques: DSC i TG .....	111
4.1.3.2. Tractament fotoquímic: irradiació amb llum ultravioleta .....	111
i. Espectroscòpia d'infraroig (FTIR) .....	112
ii. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) .....	114
iii. CG-EM: composició monomèrica .....	117
iv. Propietats tèrmiques: DSC i TG .....	118
4.1.4. Estudi microscòpic del bacteri i del PHA .....	121
4.2. Fonts de carboni definides .....	129
4.2.1. Cultius i producció de PHA emprant substrats definits .....	130
4.2.1.1. Àcid nonanoic .....	130
4.2.1.2. Àcid undecanoic .....	133
4.2.1.3. Àcid undecenoic .....	136
4.2.1.4. C11:1+C11:0 .....	139
i. Cultius en condicions proliferants .....	139
ii. Cultius en condicions no proliferants (NP) .....	141
4.2.2. Escalat a bioreactor .....	143
4.2.2.1. Bioreactor HPR-F5 .....	145
4.2.2.2. Bioreactor HPR-F7 .....	149
4.2.2.3. Bioreactor HPR-F9 .....	156

4.2.1.4. Bioreactor HPR-F10 .....	162
4.2.3. PHAs: estructura i propietats .....	168
4.2.3.1. Ressonància Magnètica Nuclear .....	168
i. PHA-C9:0 .....	168
ii. PHA-C11:0 .....	170
iii. PHA-C11:1 .....	172
iv. PHA-(C11:1+C11:0) .....	174
v. PHA-(C11:1+C11:0) obtinguts en els processos en bioreactor .....	175
4.2.3.2. CG: composició monomèrica .....	176
i. PHAs obtinguts en cultius en matrassos .....	178
ii. PHAs obtinguts en cultius en bioreactor .....	179
4.2.3.3. Propietats Tèrmiques i Pes Molecular .....	181
i. PHAs obtinguts en matrassos .....	181
ii. PHAs obtinguts en el cultius en bioreactor .....	183
4.3. Estudi microscòpic de les inclusions lipídiques de PHA .....	185
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>191</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>195</b>
<b>7. ANNEXOS .....</b>	<b>211</b>