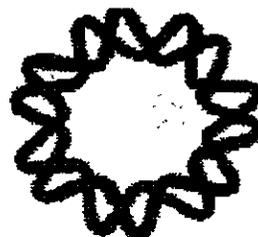


03072
9
2ej



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



**“Efecto del CO₂ sobre la producción de alginatos
por *Azotobacter vinelandii*”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
M A E S T R O E N C I E N C I A S
P R E S E N T A
I.Q.AL. GABRIEL SEÑEZ ENRIQUEZ

0273790

Cuernavaca, Mor. Octubre de 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Galindo y la asesoría del Dr. Carlos F. Peña. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN119598, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectos 25165-B y 130010B, así como con la beca 118121 de CONACyT.

A :

Ruth

Por enseñarme a vivir al 101 %

Pina, Gabriel y Edgar

**Por su ejemplo y el amor
que crece cada día**

Erika

**Por hacer de cada momento
un evento especial**

Reconocimientos

Al Dr. Enrique Galindo F. por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su apoyo y sus innumerables enseñanzas.

Apoyo técnico:

Toño Rocha, Ponchito, Inés Reyes (por toda su valiosa ayuda) y al Dr. De León por sus atinados comentarios.

A mis amigos de la maestría:

Gerardo, Genaro, Gaby, Isadora, Lolita, Beto, Adriana, Vanesa, Claudia, Lety, Mainul y César por formar una comunidad lejos de casa.

Al Ing. Trujillo por todas las enseñanzas, la paciencia y su amistad inquebrantable.

A todos mis amigos de Chihuahua, por el refugio seguro.

A mis compañeros del Grupo EG/OTR por su amistad y apoyo.

Índice general

Nomenclatura	1
Resumen	2
1.-Introducción	4
2.-Antecedentes	8
2.1. CO ₂ en escalamiento	8
2.2 Reacciones del CO ₂	10
2.3 Generación y demanda de CO ₂ por microorganismos	15
2.3.1 Bacterias	15
2.3.2 Levaduras	17
2.3.3 Efecto sobre hongos	20
2.4 Alginatos y <i>Azotobacter vinelandii</i>	26
2.4.1. Fisicoquímica del alginato	26
2.4.2 Aplicaciones de los alginatos	27
2.4.3 Alginatos bacterianos	27
2.4.4 Biosíntesis de alginato	28
2.4.5 <i>Azotobacter vinelandii</i>	30
2.4.6 Generación de CO ₂ por <i>Azotobacter vinelandii</i>	31
3.- Objetivos	33
4.- Materiales y Métodos	34
4.1 Materiales	34
4.1.1 Microorganismo	34
4.1.2 Medio de cultivo	34

4.1.3 Inóculo	35
4.1.4 Sistema de fermentación	35
4.2 Métodos analíticos	37
4.2.1 Análisis de CO ₂ a la salida del fermentador	37
4.2.2 Determinación de CO ₂ disuelto en el caldo de cultivo	37
4.2.3 Determinación de sacarosa	38
4.2.4 Determinación de biomasa	40
4.2.5 Extracción y cuantificación de alginato	40
4.2.6 Determinación de viscosidad	41
4.2.7 Distribución de pesos moleculares	41
4.2.8 Medición de actividad alginasa por medio de cromatografía (HPLC)	42
4.2.9 Integración de las curvas de generación de CO ₂	43
4.3 Cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos	43
5.- Resultados y discusión	47
5.1 Fermentación testigo	47
5.2 Fermentaciones adicionando diferentes niveles de CO ₂ en el gas influente	51
5.3 Viscosidades obtenidas en las diferentes condiciones evaluadas	65
5.4 Pesos moleculares promedios (PMP)	67
5.5 Expresión de liasas a altas concentraciones de CO ₂	72
6.- Conclusiones y recomendaciones	79
6.2 Conclusiones	79
6.3 Recomendaciones	80
7.- Bibliografía	81
Apéndice	85

Índice de figuras

2.1 Biosíntesis de alginato por <i>Azotobacter vinelandii</i> .	29
4.1 Esquema del sistema de fermentación y adquisición de datos (adaptado de Rocha, 1999).	36
4.2 Curva estándar para la determinación de sacarosa.	39
5.1 Perfiles típicos de oxígeno disuelto, gases (oxígeno y nitrógeno) y pH durante el cultivo testigo (3% TOD, 700 r.p.m. y 29°C) de <i>A. vinelandii</i> .	48
5.2 Cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa y evolución de CO ₂ en cultivo testigo.	49
5.3 Cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa y evolución de CO ₂ , en cultivo testigo y cultivo con adición de 4 % de CO ₂ en el gas influente.	53
5.4 Cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa y evolución de CO ₂ en cultivo testigo y cultivo con adición de 8 % de CO ₂ en el gas influente.	54
5.5 Cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa y evolución de CO ₂ en cultivo testigo y cultivo con adición de 13 % de CO ₂ en el gas influente.	56
5.6 Cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa y evolución de CO ₂ en cultivo testigo y cultivo con adición de 25% de CO ₂ en el gas influente.	58
5.7 Rendimientos ($Y_{p/x}$) y concentraciones máximas de biomasa en cultivos de <i>Azotobacter vinelandii</i> adicionando 0, 4, 8, 13 y 25 % de CO ₂ .	60
5.8 Velocidades específicas de crecimiento (μ) en h ⁻¹ a diferentes niveles de CO ₂ empleados en las fermentaciones de <i>A. vinelandii</i> .	61
5.9 Medición del CO ₂ a la salida de la corriente de gases para los diferentes niveles de CO ₂ adicionado y concentración de CO ₂ en el seno del líquido.	63

5.10	Viscosidades obtenidas (cps) a las diferentes condiciones evaluadas para los cultivos de <i>A. vinelandii</i> .	65
5.11	Evolución del peso molecular promedio (PMP) del alginato aislado en las diferentes condiciones de CO ₂ evaluadas (0, 4, 8 y 13 %).	67
5.12	Distribución de los pesos moleculares del alginato aislado en las diferentes condiciones de CO ₂ evaluadas (0, 4, 8 y 13 %).	71
5.13	Distribución de los pesos moleculares del alginato comercial, enfrentado con extracto enzimático de los cultivos testigo y con adición de CO ₂ de 17 %.	74
A1.	Determinación de la velocidad específica de crecimiento	85
A2.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo control A.	87
A3.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 4 % de CO ₂ en el gas influente (A).	87
A4.	CO ₂ a la salida del fermentador para los cultivos control.	88
A5.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 4 % de CO ₂ en el gas influente (A).	88
A6.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 4 % de CO ₂ en el gas influente (B).	89
A7.	CO ₂ a la salida del fermentador para los cultivos donde se adiciona 4 % de CO ₂ en el gas influente.	89
A8.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 8 % de CO ₂ en el gas influente (A).	90
A9.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 8 % de CO ₂ en el gas influente (B).	90
A10.	CO ₂ a la salida del fermentador para los cultivos donde se adiciona 8 % de CO ₂ en el gas influente.	91
A11.	Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 13 % de CO ₂ en el gas influente (A).	91

A12. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 13 % de CO ₂ en el gas influente (B).	92
A13. CO ₂ a la salida del fermentador para los cultivos donde se adiciona 13 % de CO ₂ en el gas influente.	92
A14. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 25 % de CO ₂ en el gas influente (A).	93

Índice de tablas

2.1 Concentraciones relativas de CO_2 aq. y H_2CO_3 y HCO_3^- a diferentes valores de pH	14
2.2 Efecto del CO_2 sobre diferentes sistemas biológicos	24
5.1 Resultado de la prueba t de <i>Student</i> entre las condiciones evaluadas	60
5.2 Velocidades de específicas de crecimiento, constantes de la ecuación de Luedeking-Piret y rendimientos.	62
5.3 Áreas obtenidas de la integración de las curvas de CO_2	64
5.4 Polidispersiones obtenidas en los cultivos con adición de CO_2 (0, 4, 8 y 13 %)	70

Nomenclatura

PMP	Peso molecular promedio
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
r.p.m.	Revoluciones por minuto
cps	Centipoises
ppm	Partes por millón
atm	Atmósfera
ATC	Ciclo del ácido tricarboxílico
pCO₂	Presión parcial de CO ₂ (atm)
H	Constante de la Ley de Henry
PHB	Polihidroxibutirato
μ	Velocidad específica de crecimiento
Y_{p/x}	Rendimiento de producto en base a biomasa
Y_{p/s}	Rendimiento de producto en base a fuente de carbono
Y_{x/s}	Rendimiento de biomasa en base a fuente de carbono
α	Constante de la ec. de Luedeking-Piret, se refiere a la producción asociada al crecimiento.
β	Constante de la ec. de Luedeking-Piret, se refiere a la producción no asociada al crecimiento.
(ds/dt)/dx	Consumo específico de sacarosa
(dp/dt)/dx	Producción específica del polímero

Resumen

Azotobacter vinelandii es un microorganismo productor de alginato y tiene una alta tasa respiratoria. Ello hace que el CO₂ generado pueda tener una influencia importante cuando el proceso de producción se escala (v.gr. de matraz a fermentador). Esto hace que esta bacteria sea un modelo de estudio de gran interés con el fin de evaluar el efecto del CO₂ sobre la producción de alginato, soportándose en la importancia que este gas tiene desde el punto de vista fisiológico en *A. vinelandii* y los posibles papeles que el CO₂ pueda desempeñar en los mecanismos de generación del polímero. Además, no existen reportes del efecto de este gas sobre microorganismos productores de polisacáridos.

Por estas razones se evaluó el efecto del CO₂ sobre la producción del alginato y sobre su calidad, para lo cual se realizaron experimentos en fermentador de 1 L (700 rpm, 29°C y TOD del 3 %) al que se adicionaron diferentes niveles de CO₂ (4, 8, 13 y 25 %) en la corriente de entrada de los gases. Primero se determinaron los niveles de CO₂ generados por el microorganismo bajo las condiciones control (700 rpm, 29°C y 3% de TOD); después se sometió el cultivo a cantidades de CO₂ que teóricamente serían suficientes para simular los niveles que probablemente son encontrados en cultivos desarrollados en matraces y concentraciones de CO₂ superiores a los generados por el propio microorganismo en bioreactor. También los cultivos fueron sometidos a niveles que simulan las concentraciones obtenidas en la parte inferior de fermentadores industriales

donde la presión hidrostática, junto con la presión de cabeza, generan altas concentraciones de CO₂ disuelto.

Al realizar fermentaciones con diferentes proporciones de CO₂ en el gas influente (4, 8 y 13 %) no se encontró efecto sobre el crecimiento y se observó una ligera inhibición sobre la producción del polímero. A 25 % de CO₂, el crecimiento y la producción de alginato fueron inhibidos totalmente. Las viscosidades obtenidas en ninguno de los casos fue mayor de 10 cps en el caldo de cultivo, lo que es muy semejante a la encontrada en el caldo del cultivo del experimento control. Ello descarta la posibilidad de que, en matraces, las altas viscosidades reportadas sean producidas por efectos del CO₂.

Los pesos moleculares promedio en los cultivos control y donde se adicionó 4 % de CO₂ en la parte final de los cultivos caen drásticamente, mientras que en los cultivos donde se adicionó 8 y 13 %, esta caída no se observa. Esto sugiere que el CO₂ a niveles > 8 % puede actuar de manera inhibitoria sobre las enzimas líticas que promueven la degradación el polímero.

Capítulo I

Introducción

El CO₂ es uno de los principales productos en la oxidación de carbohidratos durante el metabolismo celular. La conversión de azúcares a CO₂ y agua es la base de casi toda la vida sobre la tierra. El CO₂ producido es formado mediante reacciones de descarboxilación. El CO₂ no solo es un producto, sino que también es necesario para la producción de intermediarios que participan en las secuencias metabólicas, como lo es el oxaloacetato, el cual puede ser formado por carboxilación, a través del piruvato, de 5 diferentes maneras (Onken y Liefke, 1989).

Generalmente se puede establecer que el CO₂ tiene un efecto dual sobre el crecimiento celular. En algunos microorganismos se ha reportado que niveles menores al 5% en el ambiente gaseoso del cultivo, promueven el crecimiento. Tal es el caso de *Pseudomonas fluorescens* (Gill y Tan, 1979) y *Escherichia coli* (Repaske y Clayton, 1978; Lacoursiere *et al.*, 1986). Además, en la literatura existen suficientes reportes del efecto inhibitorio del CO₂ en una amplia variedad de microorganismos (Jones y Greenfield, 1982; Ho y Smith, 1986a; Geraats, 1994; McIntyre y McNeil, 1998). Sin embargo, el grado en que es restringido el crecimiento por el CO₂, difiere ampliamente, dependiendo del microorganismo y de los parámetros ambientales, tales como el medio de cultivo, sustrato, temperatura, pH, etc.

En fermentadores industriales, la concentración de CO₂ disuelto en el medio de cultivo es de gran importancia; en algunos casos, tan importante como lo es la concentración de oxígeno disuelto (Royce y Thornhill, 1991). Cuando se realizan cambios operacionales durante un proceso de fermentación, con la finalidad de incrementar la transferencia de oxígeno, el impacto de estos cambios sobre la concentración de CO₂ disuelto no son generalmente tomados en cuenta. Uno de los métodos más comúnmente usados para incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno es aumentar la presión de operación en el fermentador. Esta práctica tiene un efecto dramático sobre la concentración de CO₂ disuelto (ya que la concentración de la especie gaseosa es proporcional a la presión ejercida). Además, otras variables de operación que afectan la velocidad de transferencia de CO₂ (por ejemplo: la velocidad del flujo de aire y la velocidad de agitación) también tienen un efecto sustancial sobre la concentración de CO₂ disuelto (Dahod, 1993).

Sin embargo, la acumulación del CO₂ no es exclusiva de niveles industriales, ya que este fenómeno también se ha identificado en sistemas frecuentemente empleados para fines de investigación (matraces). Los matraces son sistemas comúnmente utilizados para realizar cultivos aerobios de pequeña escala. Estos sistemas son ampliamente empleados para la selección de cepas y el desarrollo de medios de cultivo. Sin embargo, algunas veces es imposible reproducir los resultados de matraces agitados en biorreactores de laboratorio.

Una de las características del sistema de matraces es que tiene un bajo grado de remoción de CO₂ (ventilación), ocasionado por el tapón de algodón, lo que provoca que el CO₂ generado se acumule en el *espacio de cabeza*. Aunado a lo anterior, generalmente existe

una caída del pH ocasionado por los ácidos orgánicos generados por el microorganismo, promoviendo un incremento en la concentración de CO₂ disuelto en el caldo de cultivo.

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa, que se caracteriza por su alta tasa respiratoria y, por ende, una alta generación de CO₂. Esta bacteria es productora de alginato bajo ciertas condiciones de cultivo. Cultivos de *A. vinelandii* en matraz producen un alginato con características reológicas de alta viscosidad y altos pesos moleculares. Sin embargo, al cambiar de escala (por ejemplo, a biorreactor de 1 L, 700 rpm, TOD de 3% y 29°C) las viscosidades y los pesos moleculares del polímero sufren una caída de más de dos órdenes de magnitud (Peña, 1998), no obstante que los rendimientos se mejoran.

Las altas tasas de generación de CO₂ de *Azotobacter vinelandii*, aunado a lo ineficiente de los matraces con respecto a la remoción del CO₂ (debido a la resistencia ocasionada por el tapón de algodón comúnmente empleado), promueven cambios en las presiones parciales de los gases en el transcurso de la fermentación, incrementando la solubilidad del CO₂ en el medio de cultivo y aumentando la cantidad de las diferentes especies iónicas que este gas produce al disociarse en medio líquido. Ello puede tener efectos sobre el microorganismo a nivel de membrana y/o sobre las enzimas productoras del polímero, probablemente dando como resultado los cambios observados en la viscosidad y en los pesos moleculares del alginato producido en matraces.

Sin duda, una de las variables de fermentación más importantes es el CO₂ disuelto en el caldo de cultivo, el cual afecta el comportamiento de una gran cantidad de microorganismos (Jones y Greenfield, 1982). Sin embargo, no existe reporte alguno de la influencia de CO₂ sobre los cultivos de *Azotobacter vinelandii* y tampoco sobre la influencia de este gas en otro modelo biológico productor de biopolímeros. Ello remarca la importancia del presente trabajo.

En la primera parte de este trabajo se evaluó la cantidad de CO₂ generado en fermentador bajo condiciones testigo (3% de TOD, 700 rpm y 29°C) que son las condiciones donde se obtiene la máxima producción del alginato. En la segunda parte del trabajo, el cultivo de *A. vinelandii* se sometió a diferentes concentraciones de CO₂ en la corriente de entrada de los gases (4, 8, 13 y 25%) y se evaluó el efecto de estas concentraciones sobre el crecimiento bacteriano, producción de alginato, distribución de los pesos moleculares del polímero y las viscosidades del caldo de cultivo.

Capítulo II

Antecedentes

2.1 CO₂ en el escalamiento

Los bioprocesos son usualmente desarrollados en tres escalas:

- a) Nivel laboratorio
- b) Planta piloto
- c) Nivel industrial

Escalamiento significa reproducir en equipo industrial los resultados obtenidos en fermentaciones realizadas en planta piloto y a nivel laboratorio (Ju y Chase, 1992). En procesos de escalamiento, se ha identificado al CO₂ disuelto como uno de los principales causantes de dificultades para obtener traslados de escala exitosos (Geerats, 1994).

A nivel laboratorio, los matraces agitados son ampliamente utilizados como herramienta en la selección de microorganismos, así como en la evaluación y selección de medios de cultivo. Esto es debido a que tienen notables ventajas, por ejemplo: se requieren pequeñas cantidades de materiales y potencia, además, una gran cantidad de experimentos se pueden correr en paralelo, también son fáciles de operar. Sin embargo, en matraces agitados, el CO₂ generado no es efectivamente ventilado hacia el exterior del matraz. Esto es debido a la resistencia ocasionada por el tapón de algodón comúnmente utilizado. Además del incremento de la presión parcial de CO₂ en matraces, el pH puede disminuir como resultante de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos y, como consecuencia, se

incrementa la concentración de CO₂ disuelto en el caldo de cultivo (Kato y Tanaka, 1998), alcanzándose niveles que pueden ser inhibitorios para los microorganismos en estudio.

Después de seleccionar en matraces tanto el microorganismo como el medio de cultivo óptimo, los estudios posteriores son realizados generalmente bajo condiciones ambientales constantes, en pequeños fermentadores instrumentados. A nivel laboratorio, es fácil alcanzar un mezclado eficiente, sin embargo, con el incremento en tamaño del biorreactor, lograr una distribución homogénea de concentraciones y temperaturas se hace más difícil, especialmente en reactores industriales. En biorreactores de gran altura, la presión hidrostática no es constante en todo el reactor, siendo dependiente de la posición local. Por ejemplo, la presión total en el fondo del fermentador será la suma de la presión hidrostática más la presión de cabeza del reactor. Esto significa que en un reactor industrial (de aproximadamente 10 metros de altura) la solubilidad del O₂ y CO₂ en el fondo del reactor será un 70% mayor a la existente en la parte superior del reactor (Onken y Liefke, 1989).

Uno de los métodos más frecuentes para incrementar la concentración de oxígeno disuelto es aumentando la presión de operación dentro del fermentador. Esta práctica puede tener un efecto dramático sobre los microorganismos, puesto que se incrementa de manera notable la concentración del CO₂ disuelto (Dahod, 1993). Se sabe que presiones parciales superiores a 0.1 atm tienen efectos inhibitorios en cultivos aerobios (Onken y Liefke, 1989).

Un mejor entendimiento de la transferencia de CO₂ en reactores es de gran importancia. Ello permitiría hacer un diseño más racional de los fermentadores y de los dispositivos que estos

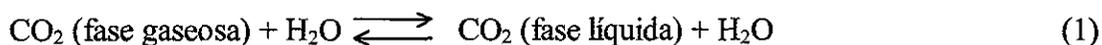
poseen (impulsores, sensores, etc.) además de realizar escalamientos exitosos en procesos biotecnológicos de importancia industrial. Desafortunadamente, la investigación en este tema ha recibido poca atención en el pasado y es necesaria más información básica (Ho y Smith, 1986 b).

2.2 Reacciones del CO₂

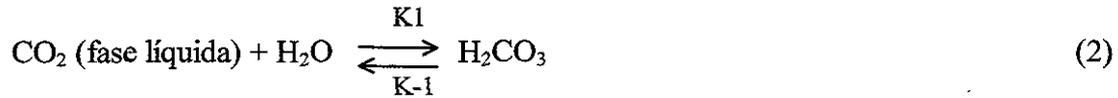
En fermentaciones se desarrollan varias reacciones en medios complejos. Naturalmente, el proceso metabólico y respiratorio de la célula involucra una red compleja de reacciones que permiten su existencia y crecimiento (Ho *et al.*, 1987). El CO₂ es un metabolito liberado en forma gaseosa por las células en el caldo de cultivo, el cual inmediatamente se disocia en las diferentes especies que existen en medio acuoso (Ishizaki *et al.*, 1971a). En el aire, 0.03 % del volumen es ocupado por CO₂. En agua pura, la concentración de CO₂ es aproximadamente de 0.4 ppm a 1 atm y 25°C. Sin embargo, en medios de cultivo, la solubilidad del CO₂ es más baja debido al contenido de minerales y sustratos orgánicos disueltos (Onken y Liefke, 1989).

Unas de las reacciones más estudiadas es la del CO₂ y el H₂O. Más del 99% del CO₂ disuelto en agua existe como gas disperso. Menos del 1% existe como ácido carbónico (H₂CO₃), el cual se disocia para generar iones hidrógeno (H⁺), iones bicarbonato (HCO₃⁻) y una pequeña cantidad de iones carbonato (CO₃⁻) (Ho *et al.*, 1987).

El primer paso en el sistema de gas líquido, es cuando el CO₂ se disuelve en agua:



El CO_2 disuelto entonces se hidrata para formar ácido carbónico:



El ácido carbónico se disocia casi instantáneamente en la siguiente reacción:



De la suma de las reacciones (2) y (3) obtenemos una reacción total:



La constante de equilibrio total es:

$$K = K3 / K-3 = [\text{H}^+] [\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2] \quad (5)$$

La reacción (4) es forzada a la derecha como resultado de la constante de difusión del CO_2 en el ambiente externo de la célula. Entonces, el bicarbonato que ha sido producido genera una reacción más, formando los iones de carbonato e hidrógeno:



La reacción (6) es extremadamente lenta y, bajo ciertas condiciones, se considera despreciable. Las constantes de velocidades para estas reacciones son:

$$K2 / K-2 = 1 \times 10^{-3} \quad (7)$$

$$K3 / K-3 = 2.5 \times 10^{-4} \quad (8)$$

$$K4 / K-4 = 6 \times 10^{-11} \quad (9)$$

La cantidad total de las especies carbónicas presentes en el sistema es representada por C_T .

$$C_T = [\text{CO}_2] + [\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] \quad (10)$$

Como regla general, el CO_2 en fase gaseosa se disuelve de acuerdo a la ley de Henry (Royce y Thornhill, 1991), en donde la solubilidad es proporcional a la presión parcial de bióxido de carbono ($p\text{CO}_2$). Entonces, la molaridad del $[\text{CO}_2(\text{d})]$ está dada por:

$$[\text{CO}_2]_{\text{aq}} = H p\text{CO}_2 \quad (11)$$

Donde:

H = Constante de la ley de Henry para CO_2 ($33.55 \text{ atm} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ a 30°C)

$p\text{CO}_2$ = Presión parcial de CO_2 en la fase gaseosa (atm)

La cantidad del ión bicarbonato está dada por la ecuación de Henderson-Hasselbach (Ishizaki *et al*, 1971a):

$$\log [\text{HCO}_3^-] = \text{pH} - \text{pK}_{\text{HCO}_3^-} + \log [\text{CO}_2] \quad (12)$$

De acuerdo a las ecuaciones presentadas arriba, es claro que la molaridad del ión bicarbonato y carbonato serán inversamente proporcionales a la concentración de iones hidrógeno. La relación del ión bicarbonato con el ácido carbónico puede ser calculado mediante la ecuación 3 y la expresión 7.

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{2.5 \times 10^{-4}}{[\text{H}^+]} \quad (13)$$

Cuando el pH es superior a 6, la ecuación anterior puede ser expresada como se muestra a continuación:

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} > 250 \quad (14)$$

Esto significa que, a un pH superior a 6, la molaridad del ácido carbónico será bastante pequeña comparada con la del ión carbonato (**tabla 2.1**).

La relación carbonato/bicarbonato también puede ser calculada de las ecuaciones 6 y 9 mediante el mismo procedimiento:

$$\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} = \frac{6 \times 10^{-11}}{[\text{H}^+]} \quad (15)$$

Sustituyendo 10^{-8} por $[\text{H}^+]$, obtenemos:

$$\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]} = 6 \times 10^{-3} \quad (16)$$

La cantidad del ión carbonato a un pH menor de 8 será menor que la cantidad del ión bicarbonato.

Si el pH se encuentra entre 6 y 8, la mayoría de las especies disueltas y disociadas del CO_2 en fase líquida están en forma de CO_2 (g) y del ión HCO_3^- . Entonces, a un pH fisiológico, la

disolución y disociación del CO₂ puede ser simplificada en la siguiente expresión (Ishizaki *et al.*, 1971 a):

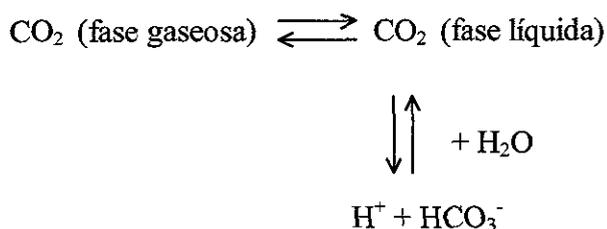


Tabla 2.1. Concentraciones relativas de CO₂ aq, H₂CO₃ y HCO₃⁻ a diferentes valores de pH.

[CO ₂ aq]	pH	[H ₂ CO ₃]	[HCO ₃ ⁻]
1	7.0	0.001	2.5
1	6.5	0.001	0.80
1	6.0	0.001	0.25
1	5.5	0.001	0.08
1	5.0	0.001	0.03
1	4.5	0.001	0.008
1	4.0	0.001	0.003

Tomado de: Jones y Greenfield (1982)

La disolución del CO₂ no depende del pH. La concentración total de CO₂ disuelto en los caldos de cultivo es de 1 a 2 órdenes de magnitud mayor que el oxígeno para pH mayores a 6.5 (Royce, 1992). Sin embargo, la concentración de bicarbonato se incrementa con un incremento del pH y, para pH menores a 6.5, los iones carbonatos son prácticamente inexistentes (Ho *et al.*, 1987).

2.3 Generación y demanda de CO₂ por microorganismos

El CO₂ es uno de los productos principales en la oxidación de carbohidratos durante el metabolismo celular. La conversión de azúcares a CO₂ y agua es la base de casi toda la vida sobre la Tierra. Sin este proceso básico de oxidación, muchas formas de vida no existirían (Ho y Smith, 1986a). El CO₂ no es únicamente un producto, también es necesario para el crecimiento de algunos microorganismos. La deficiencia de alguno de los constituyentes que conforman el ciclo del ácido tricarbóxico, puede ser sustituido por fijación de CO₂ en condiciones específicas de crecimiento (Ho *et al.*, 1987). En algunos microorganismos, se ha reportado que niveles de CO₂ en la atmósfera gaseosa menores del 5% pueden estimular el crecimiento y niveles superiores de este valor inhiben el crecimiento y la producción de los metabolitos que éstos generan. Tales efectos inhibitorios son dependientes del nivel de CO₂ y de cada microorganismo (McIntyre y McNeil, 1998).

2.3.1 Bacterias

Bajos niveles de CO₂ disuelto pueden estimular el crecimiento microbiano. Uno de los casos es el de *Pseudomonas fluorescens*, que al crecer en medio mínimo con adición de CO₂ en la corriente de gases (hasta 0.128 atm), se incrementó la velocidad de crecimiento (0.65 h⁻¹) en comparación a la velocidad obtenida (0.60 h⁻¹) en el cultivo sin adición de CO₂ (Gill y Tan, 1979). Sin embargo, en medio complejo, cualquier concentración de CO₂ superior a la determinada en el aire, fue inhibitoria para el crecimiento. La estimulación del crecimiento es debida a que, en ausencia de fuentes externas de ciertos compuestos existe fijación de CO₂ mediante reacciones de carboxilación, para sustituir las deficiencias de ciertos compuestos esenciales para el crecimiento (Gill y Tan, 1979).

Otro caso es el de *Escherichia coli*, la cual, en condiciones aerobias mostró estimulación del crecimiento al adicionar CO₂ al medio en concentraciones semejantes a los niveles atmosféricos (0.03 a 0.04 %) (Repaske y Clayton, 1978). Mori *et al.* (1983) encontraron (en cultivos alimentados) que concentraciones del 20 % de CO₂ en la entrada de los gases no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Sin embargo, al incrementar la concentración de CO₂ hasta un 64 %, se observó una disminución de un 80 % en el crecimiento microbiano.

Lacoursiere *et al.* (1986) investigaron el efecto de la concentración de CO₂ disuelto en cultivos anaerobios de *E. coli*. Encontraron que a concentraciones del 5 % de CO₂ a la salida del reactor, se obtuvo la máxima velocidad específica de crecimiento de la bacteria (50% mayor a la obtenida en los cultivos sin adición de CO₂), por lo que concluyeron que es posible que bacterias entéricas se adapten a concentraciones del 5 % de CO₂, que son las correspondientes a las concentraciones encontradas dentro de intestinos en mamíferos.

Por otro lado, estos investigadores (Lacoursiere *et al.*, 1986) proponen que la inhibición es debida a efectos fisiológicos sobre una variedad de reacciones enzimáticas. Por ejemplo, el CO₂ y su equilibrio con el ión bicarbonato para mantener el pH intracelular. Esto puede afectar el metabolismo de *E. coli* a través de enzimas descarboxilantes, como la proteína acarreadora carboxi-biotina, esencial para la síntesis de ácidos grasos monosaturados en condiciones aeróbicas. La síntesis de ácidos grasos es controlada por una gran variedad de mecanismos alostéricos y el CO₂ es conocido por afectar esta vía (Stryer, 1982).

Se ha visto que la acumulación del CO₂ en biorreactores (debido a problemas de ventilación) causa inhibición sobre la producción y el crecimiento microbiano. La inhibición en la producción de inosina producida por *Bacillus subtilis* fue causada por presiones parciales superiores a 0.029 atm (Ishizaki *et al.*, 1971 a y b). Estos mismos niveles también causaron inhibición en la producción de celulosa bacteriana por *Acetobacter xylinum* (Kouda *et al.*, 1997). Por otra parte, el proceso de fermentación para la obtención de la enzima lipasa, producida por *Pseudomonas alcaligenes*, fue afectado por las concentraciones de CO₂ presentes en el fermentador, las cuales fueron generadas por el microorganismo (Geerats, 1994). También, se demostró que bacterias empleadas en la digestión de desechos orgánicos (mezcla de bacterias mesófilas y termófilas) son sensibles a altas concentraciones de CO₂ (Hansson, 1982). Este gas promueve una disminución en el grado de degradación de compuestos orgánicos como el acetato.

En contraste, para ciertas bacterias, el CO₂ no tiene ningún efecto sobre el crecimiento y la producción de metabolitos. Tal es el caso de *Clostridium butyricum* que fue evaluado en una fermentación acidogénica bajo diferentes concentraciones de CO₂ (van Andel *et al.*, 1985).

2.3.2 Levaduras

Otro de los modelos biológicos de gran interés es el de las levaduras, los cuales son uno de los medios ampliamente usados en la expresión proteínas recombinantes y no se encuentra exento de los efectos generados por el CO₂.

Chen y Gutmanis (1976) estudiaron el efecto del CO₂ sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae* en un biorreactor bajo condiciones aerobias y limitación de sustrato, para obtener una eficiente producción de biomasa. Los experimentos se realizaron a un nivel constante de O₂ de 20 %. Ellos encontraron que niveles menores a 20 % de CO₂ en la mezcla de gases, no generaron inhibición en el crecimiento de la levadura, mientras que a niveles de 50 % de CO₂, se redujo 16 % el crecimiento del microorganismo. Kuriyama *et al.* (1993) investigaron el efecto del CO₂ sobre *S. cerevisiae* en cultivo continuo. Observaron que al incrementar la presión parcial de CO₂ de 0.43 a 1.92 atm, disminuyó en un 25 % la concentración celular. Sin embargo, aumentó 8 % la concentración de etanol y disminuyó 50 % la concentración de glicerol. Estos autores proponen que los incrementos en el CO₂ intracelular, promueven que el equilibrio del sistema de piruvato deshidrogenasa se mueva hacia al lado del piruvato. Estos incrementos en el piruvato aumentan la velocidad de reacción de la enzima piruvato descarboxilasa, la cual convierte piruvato a acetaldehído. Este incremento en la velocidad de producción de acetaldehído resulta a su vez en un aumento en la producción de etanol.

Jones y Greenfield (1982) sugieren que, en fermentaciones anaerobias con levaduras, la inhibición del crecimiento es principalmente de naturaleza fisicoquímica, más que enzimática. Ellos se apoyan en el hecho de que la producción de etanol parece no ser afectada por una pCO₂ elevada y es posible que los efectos sean promovidos tanto por el CO₂(aq) y HCO₃⁻ a nivel de membrana, causando la disminución en la velocidad de crecimiento. Mori *et al.* (1983) estudiaron el efecto del CO₂ en *Candida brassicae*, en cultivos alimentados a

concentraciones constantes de oxígeno disuelto. Observaron que concentraciones de CO₂ de hasta 61 % (concentración máxima evaluada) no inhiben el crecimiento del microorganismo.

Kato y Tanaka (1998) demostraron que el rendimiento celular de *S. cerevisiae* en matraces Erlenmeyer con tapón de algodón fue 20 % menor en comparación con matraces Erlenmeyer aireados o con cultivos realizados en fermentador, todos operados (al inicio del cultivo) con coeficientes de transferencia volumétrico de oxígeno semejantes. Estos resultados son atribuidos a la baja capacidad de ventilación que poseen los matraces Erlenmeyer, lo cual conduce a un incremento en la presión parcial del CO₂, aunado a una disminución en la presión parcial del O₂. Estos autores proponen que los cambios en las presiones parciales de los gases causan inhibición del crecimiento celular. Sin embargo, la inhibición del crecimiento microbiano puede ser relacionada con la disminución en la pO₂ y no con el aumento en la pCO₂, ya que este modelo biológico es altamente tolerante a concentraciones elevadas de este gas.

Se puede decir que las levaduras son de los microorganismos más tolerantes a altas concentraciones de CO₂, sin causar efectos dramáticos en el crecimiento. Se puede esquematizar la tolerancia de los diferentes microorganismos al CO₂ de la siguiente manera (Jones y Greenfield, 1982):

Levaduras > Bacterias gram positivas > gram negativas > hongos

2.3.3 Efecto sobre hongos

La concentración de CO₂ disuelto es de particular interés en el caso de fermentaciones miceliales, puesto que se afecta tanto la morfología como la productividad de la fermentación (Royce y Thornhill, 1991). Estos microorganismos son de los más importantes desde el punto de vista económico en la industria biotecnológica (McIntyre y McNeil, 1997c). A pesar de la importancia económica de los microorganismos filamentosos, existen pocos estudios donde se evalúe la influencia del CO₂.

Pirt y Mancini (1976) investigaron (en cultivo continuo) el efecto del CO₂ sobre la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*. En estos estudios se controló el pH y la tensión de oxígeno disuelto de manera que la única variable fuera la presión parcial de CO₂ en fase gaseosa. Se probaron diferentes concentraciones de CO₂, encontrándose que la velocidad de síntesis del antibiótico disminuyó aproximadamente 50 % al someter el cultivo a una presión parcial de CO₂ de 0.08 atm.

Ho y Smith (1986a) encontraron que fermentaciones de *P. chrysogenum* sometidas a concentraciones de CO₂ entre 3 y 5 % en la corriente de gases no mostraron efectos significativos sobre el crecimiento y la producción del antibiótico, y es posible que estos niveles de CO₂ sean necesarios para un crecimiento óptimo. A una concentración del 12.6 % de CO₂, las velocidades de producción del antibiótico y crecimiento celular fueron reducidas 23 y 40 %, respectivamente. Cuando la fermentación fue expuesta a 20 % de CO₂, la concentración de biomasa y la producción de penicilina fueron reducidas 70 y 90 %, respectivamente. Estudios de microscopía electrónica mostraron que la morfología de *P.*

chrysogenum en cultivo sumergido, fue modificada en respuesta a cambios en la concentración de CO₂. Cuando se adicionó CO₂ entre 0.03 y 8 %, la morfología predominante fue la forma filamentosa. Sin embargo, a 15 %, el aspecto de la hifa es de hinchamiento y aparecen formaciones de células esféricas parecidas a levaduras (Ho y Smith 1986 a y b; Ho *et al.*, 1987). Este comportamiento posiblemente es debido a cambios producidos en la estructura de la pared celular promovidos por el CO₂. Este gas puede alterar la estructura de los ácidos grasos. De la misma manera, el ión bicarbonato puede afectar la superficie cargada de la porción polar de los grupos fosfolipídicos y de las proteínas periféricas, lo cual reduce la velocidad de transporte a través de la membrana y la pared celular (Ho y Smith, 1986a). A elevadas concentraciones de CO₂, la disociación del ácido carbónico podría neutralizar la carga interna de la membrana, induciendo hinchamiento osmótico y causando una penetración de iones dentro de la membrana. Bajo esta condición se generaría una alta concentración de iones y una polarización de la membrana, resultando en velocidades lentas de transferencia tanto para el CO₂ y metabolitos secundarios a través de la membrana (Ho y Smith, 1986a).

En otro estudio, se observó que altas concentraciones de CO₂ (20 %) en el gas influente reducen el comportamiento no Newtoniano de los caldos de cultivo y disminuyó la viscosidad aparente, en comparación al cultivo sin adición de CO₂. Una ligera adición de CO₂ al caldo de cultivo (5 %), promovió la variación en la morfología de *P. chrysogenum*, de un micelio normal a hifas más largas, las cuales se modificaron a “pellets” esféricos rugosos cuando se sometió el cultivo a altas concentraciones de CO₂ (Ju *et al.*, 1991).

Otro de los sistemas biológicos ampliamente estudiados es el de *Aspegillus niger* y la producción de ácido cítrico. McIntyre y McNeil (1997a) estudiaron (en cultivos por lote) la influencia del CO₂ sobre la producción de este ácido orgánico por *A. niger*. Encontraron que concentraciones superiores al 3 % de CO₂ están asociadas con una disminución en la concentración final de biomasa y citrato, además de una reducción en el consumo de sustrato. El grado de inhibición fue mayor conforme se aumentó la concentración de CO₂. Niveles elevados de CO₂ disuelto estuvieron asociados con cambios críticos en parámetros morfológicos, obteniéndose incrementos en el tamaño de la hifa y en la longitud de las ramificaciones. McIntyre y McNeil (1997b) también investigaron los mismos efectos pero en cultivo continuo. Observaron que bajas concentraciones de CO₂ (2 %) estimularon la producción de citrato; sin embargo, al adicionar CO₂ a niveles superiores a 7.5 %, el grado de inhibición fue significativo. Cultivos continuos mostraron menos inhibición que los cultivos en lote en términos de biomasa y síntesis del ácido orgánico (McIntyre y McNeil, 1997c).

También han sido estudiados otros microorganismos miceliares. Tal es el caso de *Sclerotium rolfsii* (Kristzman *et al.* 1977). Al incubar este microorganismo en atmósferas enriquecidas de CO₂ de 0.5 a 2 % (v/v), la velocidad de crecimiento del micelio se incrementó 400 % en comparación a los cultivos crecidos en aire. Sin embargo, la formación de esclerocios fue inhibida, mientras que una concentración de 10 % de CO₂ inhibió totalmente el crecimiento. Ellos sugieren que el crecimiento de las hifas y la formación de esclerocio en *S. rolfsii* requieren un incremento en energía y el suministro de intermediarios para la generación de carbohidratos, los cuales son suministrados por la vía del glioxilato. El CO₂ no es

únicamente incorporado a constituyentes celulares sino que también inhibe la vía del ácido cítrico. El hongo supera la inhibición parcial del ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) al operar por la vía alternativa del glioxilato y, como consecuencia, se inhibe la enzima succinato 2,6-diclorolindo-fenol reductasa, afectando la formación de esclerocio.

Jones y Greenfield (1982) proponen que, en hongos, el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) puede ser el blanco de inhibición del CO₂. Esta inhibición parece ser mediada vía oxalacetato, inhibiendo la succinato deshidrogenasa, la cual pudiera estimular la carboxilación de piruvato a oxaloacetato por PEP-carboxiquinasa, siendo éste el principal sitio de acción para dirigir una inhibición secundaria.

En general, los efectos del CO₂ sobre los diferentes sistemas biológicos anteriormente descritos (los cuales son resumidos en la **tabla 2.2**), son encontrados a nivel de membrana celular y cambios en el pH intracelular. En la membrana, el CO₂ interactúa con lípidos, disminuyendo la habilidad de la célula para incorporar varios iones. Niveles altos de CO₂ son conocidos como causantes de anestesia (Dixon y Kell, 1989), un proceso que tiene su sitio de acción primario en los ácidos grasos de la membrana plasmática. La absorción de un agente anestético (*i.e.* CO₂) en la membrana promueve que una región hidrofóbica se expanda más allá de su tamaño crítico (Sheldon, 1980). Esto puede alterar la actividad funcional de las proteínas y causar cambios en la fluidez de la membrana. Estos efectos podrían tener importantes consecuencias para todas las funciones mediadas por la membrana.

Tabla 2.2 Efecto del CO₂ sobre diferentes sistemas biológicos.

Microorganismo	Efecto	Conc. de CO ₂	Autor
<i>Bacillus subtilis</i>	Inhibición en la producción de inosina	pCO ₂ >0.08 atm	Ishizaki <i>et al.</i> (1971b)
	Obtención de la enzima α -amilasa con alta actividad	0.06 atm	Gandhi y Kjaergaard (1975)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Estimulación del crecimiento en medio simple.	<0.13 atm	Gill y Tan (1979)
	Inhibición del crecimiento en medio complejo	Todos los niveles	
<i>Acetobacter xylium</i>	Reducción en la velocidad de producción de celulosa bacteriana	>0.025 atm	Kouda <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	CO ₂ disuelto identificado como la principal causa de inhibición en escalamiento.	---	Geraats (1994)
<i>Cultivos termófilos</i>	Disminución de la temperatura máx. en degradación de acetato	>0.3 atm	Hansson (1982)
<i>Escherichia coli</i>	Acortamiento de la fase lag	0.0075 atm	Repaske y Clayton (1978)
	Máximo rendimiento de biomasa	0.05 atm	Lacoursiere <i>et al.</i> (1986)
	No mostró efecto inhibitorio en cultivo alimentado	0.2 atm	Mori <i>et al.</i> (1983)
<i>Candida brassicae</i>	No mostró efecto alguno	0.61 atm	Mori <i>et al.</i> (1983)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	En cultivo continuo: disminuciones de 25% en concentración celular y 50% en glicerol, incremento de 8% en la concentración de etanol.	Incremento de 0.42 a 1.92 atm	Kuriyama <i>et al.</i> (1993)
	Disminución en el rendimiento celular en matraces	0.35 atm	Kato y Tanaka (1998)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Incremento en la velocidad de crecimiento e inhibición en formación de esclerocio	0.01-0.02 atm	Kritzman <i>et al.</i> (1977)
	Inhibición total	0.1 atm	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cultivo continuo: disminución de 50% en la velocidad de síntesis del antibiótico.	0.08 atm	Pirt y Mancini (1975)
	Cultivo en lote: disminuciones en velocidades de crecimiento y síntesis del antibiótico en 40 y 23%, respectivamente y cambios en morfología.	0.126 atm	Ho y Smith (1986a)
	Cambios en el comportamiento reológico del cultivo	0.2 atm	Ju <i>et al.</i> (1991)

Tabla 2.2 Efecto del CO₂ sobre diferentes sistemas biológicos (continuación).

Microorganismo	Efecto	Conc. de CO ₂	Autor
Aspergillus niger	Cultivo en lote: disminuciones en las concentraciones de biomasa, citrato, consumo de sustrato y cambios en morfología	>0.03 atm	McIntyre y McNeil (1997 a)
	Cultivo continuo: disminución de 30 % de la concentración de biomasa	18%	McIntyre y McNeil (1997 b)

Por otro lado, el pH intracelular puede ser alterado por altos niveles de CO₂. Dixon y Kell (1989) han propuesto que un factor determinante en la eficiencia del CO₂ como inhibidor, es su capacidad para penetrar la membrana bacteriana, causando cambios en el pH intracelular. Ellos proponen dos mecanismos por los cuales niveles elevados de CO₂ disminuyen la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. La primera propuesta es que incrementos en los niveles de CO₂ pueden alterar la producción de enzimas específicas por inducción/represión en la síntesis de éstas. La segunda propuesta es que niveles altos de CO₂ dentro de la célula producen HCO₃⁻, el cual es central en la regulación del metabolismo celular, estimulando e inhibiendo algunas enzimas.

Se debe de tener en mente que los diferentes mecanismos propuestos no actúan de modo aislado y los efectos de altas concentraciones de CO₂ pueden ser mediados por diferentes mecanismos, los cuales interactúan entre sí. En vista de que el CO₂ está involucrado en todas las reacciones de carboxilación/descarboxilación, tanto como producto o sustrato, éste puede tener un impacto en el metabolismo celular en diferentes sitios (McIntyre y McNeil, 1998).

2.4 Alginatos y *Azotobacter vinelandii*

El polisacárido alginato es obtenido de algas marinas desde el siglo pasado (Gacesa, 1998). Las especies de algas empleadas en la extracción del polímero principalmente son: *Laminaria*, *Ascophyllum* y *Macrocystis* (Jarman, 1979). La síntesis de este polímero no es exclusivo de algas, también especies bacterianas como *Pseudomonas* y *Azotobacter* pueden producir alginatos.

2.4.1 Físicoquímica del alginato

El alginato es un compuesto de ácido β -D-manurónico y su epímero C-5 α -L-gulurónico. Estos monómeros pueden ser arreglados en forma homopolimérica (polimanuronato o poliguluronato) o estructuras de bloque heteropoliméricas, a lo largo de una cadena lineal (Gacesa, 1998). Los alginatos de origen bacteriano son normalmente O-acetilados en la posición 2 o 3 de los residuos del ácido D-manurónico (Rehm y Valla, 1997).

La estructura de bloque y el grado de O-acetilación determinan las propiedades físicoquímicas del alginato bacteriano. La viscosidad intrínseca del alginato, determina la viscosidad en solución. Esta propiedad depende principalmente del peso molecular del polímero, así como de la polidispersidad de su masa molecular. Las propiedades gelificantes de los alginatos son debidas a su capacidad para unirse a cationes divalentes o multivalentes. El más importante es el ión de calcio, el cual produce cambios conformacionales, induciendo la gelificación por el modelo conocido como la “caja de huevos” (Clementi, 1997).

2.4.2 Aplicaciones del alginato

El alginato tiene un número de propiedades que son deseables en la producción de alimentos. Son solubles tanto en agua caliente como en agua fría, actúan como espesantes, agentes gelificantes, formadores de películas y estabilizantes. Además, tienen la habilidad de formar geles estables al calor e imparten estabilidad en el descongelamiento de productos (Pszczola, 1998).

La industria farmacéutica generalmente utiliza alginato y ácidos algínicos en formas altamente purificadas como estabilizante de soluciones y dispersiones que contienen sustancias sólidas, así como agente de unión y desintegrante en tabletas. También son usados en la industria textil (impresiones), tratamiento de papel, de aguas residuales, sellado de latas, fabricación de cerámicas, entre otras (Clementi, 1997).

2.4.3 Alginatos bacterianos

Todos los alginatos usados para propósitos comerciales son producidos mediante la cosecha de algas cafés (Pszczola, 1998). Sin embargo, hay factores que hacen probable que en un futuro los alginatos bacterianos sean productos comerciales. El primero, es el relacionado con el impacto ambiental asociado con la cosecha de las algas marinas y el procesamiento de éstas. El segundo es el relacionado con la calidad del producto final. Las propiedades de los alginatos purificados son determinadas por su grado de polimerización y acetilación, además de la composición del monómero y su secuencia. Estas características son potencialmente alcanzables en los alginatos de origen bacteriano (Clementi, 1997). El grado de polimerización afecta la viscosidad de los alginatos; sin embargo, en bacterias se puede

controlar este parámetro mediante las condiciones de fermentación y mediante manipulaciones genéticas (Rehm y Valla, 1997).

Actualmente existe un gran interés en la producción de alginatos bacterianos. Las especies de *Pseudomonas* exhiben altos rendimientos (por unidad de carbono consumido) superiores que las variedades de *Azotobacter*. Aunque *Pseudomonas mendocina* es conocida como una especie no patógena, los riesgos potenciales de patogenicidad asociados con *Pseudomonas* hacen de *Azotobacter vinelandii* una alternativa más apropiada para la producción de este polímero. Además, los alginatos excretados por *Pseudomonas* spp. contienen largas regiones contiguas de residuos L-manurónico, mostrando pobres propiedades gelificantes (Clementi *et al.*, 1985).

2.4.4 Biosíntesis de alginato

En la producción de alginatos bacterianos, el punto inicial en la biosíntesis del polímero es la fructosa-6-P. Se ha establecido que los sustratos de crecimiento de 6 carbonos son oxidados a través de la vía de Entner-Doudoroff, el piruvato derivado de la oxidación de azúcares es alimentado en el ciclo del TCA antes de la síntesis de la fructosa-6-P (mediante la gluconeogénesis), y posterior formación del alginato.

La **figura 2.1** ilustra la biosíntesis de alginato partiendo de la fructosa-6-fosfato, la cual es isomerizada a manosa-6-fosfato por la enzima fosfomanosa isomerasa. Mediante la enzima fosfomanosa mutasa, la manosa-6-fosfato es isomerizada a manosa-1-fosfato. El compuesto anterior es activado a GDP-manosa por la intervención de la enzima GDP-manosa

pirofosforilasa, posteriormente se forma el GDP-ácido manurónico, gracias a la acción de la GDP-manosa deshidrogenasa. Finalmente, la polimerasa (paso 5 en la **figura 2.1**), incorpora residuos de ácido manurónico en el crecimiento de la cadena de alginato (Gasesa, 1998).

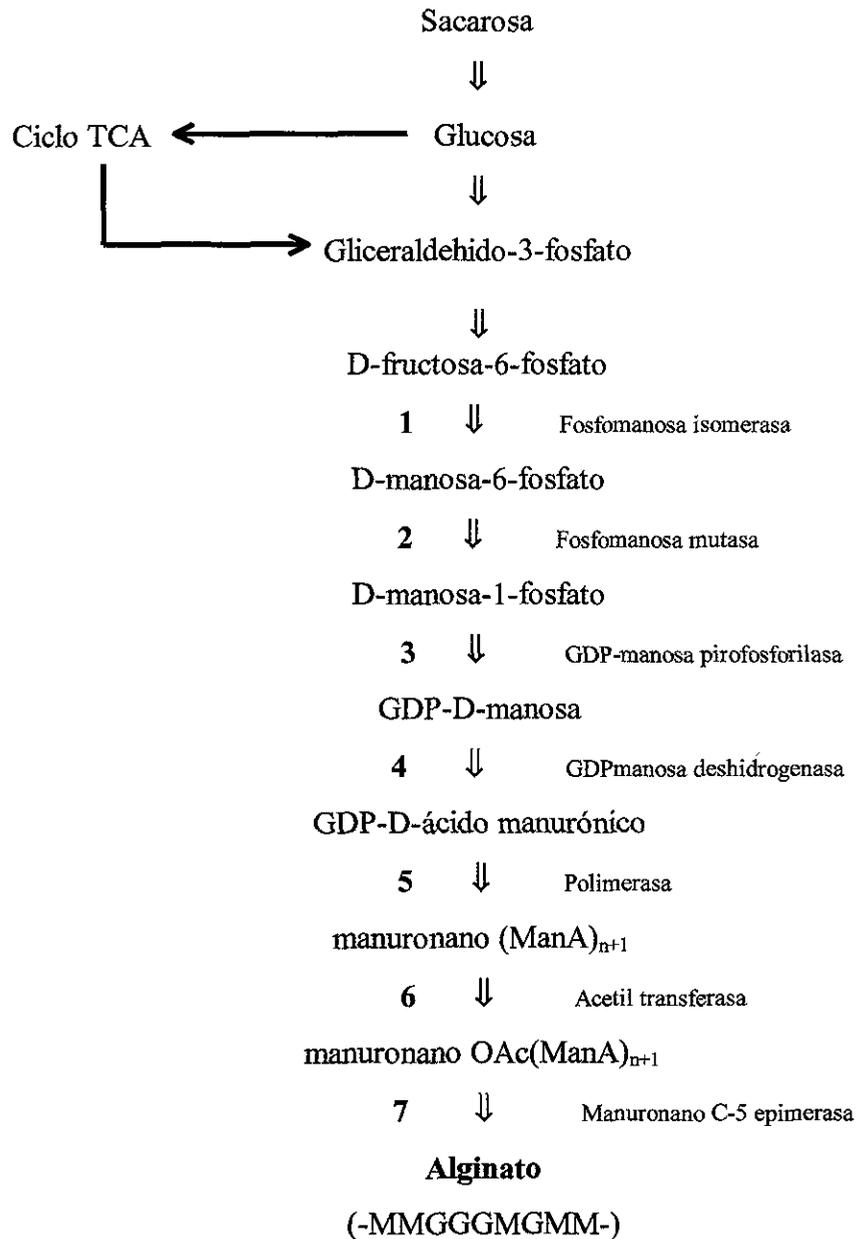


Figura 2.1. Biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*; 1: Fosfomanosa isomerasa, 2: Fosfomanosa mutasa, 3: GDP-manosa pirofosforilasa, 4: GDPmanosa deshidrogenasa, 5: Polimerasa, 6: Acetil transferasa, 7: Manuronano C-5 epimerasa.

En el polímero final, la enzima epimerasa (paso 7 en **figura 2.1**) convierte residuos de β -D-manuronato a α -L-guluronato. En *A. vinelandii*, la epimerización se lleva a cabo fuera de la célula. Tales enzimas introducen tanto estructuras de bloques alternantes como homopoliméricos. Los iones de calcio son necesarios para la actividad de la enzima, pero no necesitan cofactores como NAD^+/NADH (Ertesvag y Skjak-Braek 1996).

2.4.5 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria aerobia estricta fijadora de nitrógeno, la cual cataboliza la fuente de carbono mediante la vía de Entner-Doudoroff, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC). En respuesta a incrementos en la tensión de oxígeno disuelto (TOD), aumenta la velocidad específica de respiración y entonces convierte una gran proporción de la fuente de carbono en bióxido de carbono, un proceso energéticamente inútil. Este rasgo del metabolismo ayuda a mantener un ambiente de baja concentración de oxígeno, protegiendo el sistema de nitrogenasas que son sensibles al oxígeno (Jarman, 1979). Además, bajo condiciones donde el suministro de oxígeno es restringido, se sintetiza un polímero intracelular de reserva, el polihidroxibutirato (PHB), que en algunos casos puede contribuir hasta con un 50 % del peso seco de la célula (Clementi, 1997). Es interesante notar que tanto la acumulación de PHB y la secreción de alginato están asociados con el proceso de enquistamiento. Este proceso genera células esféricas, que se encuentran en una estado de vida latente y que son resistentes a la desecación en condiciones adversas de crecimiento (Brivonese y Sutherland, 1989). Esto representa una desviación del sustrato carbonado de la síntesis de alginato. Para un máximo

rendimiento de alginato (con respecto al carbohidrato empleado) es crucial tener un estricto control en el suministro de oxígeno (Jarman, 1979).

2.4.6 Generación de CO₂ por *A. vinelandii*

Debido a la alta tasa respiratoria del microorganismo es importante identificar los sitios donde el CO₂ es generado y además utilizado, ya que esto permite tener un mejor entendimiento del sistema *A. vinelandii*-CO₂.

Una de las vías importantes de cualquier organismo aeróbico es la del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC), donde se pueden identificar 2 lugares de producción de CO₂. Uno es en la transformación del isocitrato a α -cetoglutarato, mediante la acción de la enzima isocitrato deshidrogenasa. La siguiente reacción es la obtención de un compuesto de 4 carbonos mediante la descarboxilación del α -cetoglutarato, catalizado por la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa. Para que la acetilCoA entre al ATC es necesario que el piruvato pierda un carbono mediante la generación de CO₂, reacción que es catalizada por la piruvato deshidrogenasa (Stryer, 1982).

Otra vía que produce CO₂, es la de las pentosas fosfato, la cual genera NADPH y ribosa-5-P en el citosol. El NADPH es utilizado en la biosíntesis de especies reductoras y la ribosa-5-P se usa en la síntesis de RNA, DNA y coenzimas. Cuando las células necesitan mas NADPH que ribosa-5P se pueden generar 12 NADPH por cada molécula de glucosa-6P, la cual es completamente oxidada a CO₂ (Stryer, 1982).

La principal vía de formación del alginato es mediante la vía Entner-Doudoroff, seguido por la síntesis de fructosa-6P a partir de dos moléculas de gliceraldehido-3P. Para formar el gliceraldehido-3P participan dos reacciones que son de gran importancia. El piruvato, mediante una reacción de carboxilación, produce oxalacetato, el cual a su vez es descarboxilado, formando fosfoenolpiruvato, compuesto que sufre cuatro modificaciones para obtener el gliceraldehido-3P, indispensable para la formación de fructosa 1,6 bifosfato (Stryer, 1982).

Capítulo III

Objetivos

General

- Estudiar el efecto del CO₂ en la cinética de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* y sobre la producción y calidad del alginato obtenido.

Específicos

- Determinar la evolución del CO₂ producido por *A. vinelandii* durante la fermentación.
- Evaluar el efecto del CO₂ sobre la cinética de crecimiento de *A. vinelandii* y la producción del alginato al variar la presión parcial del CO₂ en el gas de entrada del fermentador (bajo condiciones controladas de O₂ y agitación).
- Caracterizar los alginatos producidos (con respecto a su peso molecular), en los cultivos sometidos a diferentes niveles de CO₂ en el gas influente.

4.1.3 Inóculo

Los procedimientos de mantenimiento de la cepa han sido descritos previamente por Miranda (1998). La cepa se transfirió de un cultivo de medio inclinado a cajas Petri, conteniendo medio Burk modificado. Se cultivó durante 72 horas a 29°C. Las células así obtenidas se usaron en la preparación del inóculo del fermentador, el cual es producido en matraz, de la siguiente manera: se inocularon 100 mL de medio de cultivo Burk modificado contenido en matraz Erlenmeyer de 500 mL y se incubó a 200 rpm y 29°C, durante 24 h. o hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1.

4.1.4 Sistema de fermentación

Los cultivos fueron realizados en un fermentador de 1.5 L (Virtis) equipado con tres turbinas Rusthon (diámetro impulsor/diámetro del tanque = 0.5) con un volumen inicial de 1.0 L. El pH fue controlado a 7.2 mediante la adición automática de NaOH (2 N). La espuma fue controlada manualmente mediante la adición de silicón (Dow Corning) al 10 % (p/v). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue medida mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Ingold), cuya señal fue amplificada y adquirida por una computadora Macintosh II SI, vía una interface Mac Adios II A/D & D/A (GW Instruments). La TOD fue controlada en línea, usando un programa escrito en Microsoft Quickbasic (Aguilar-Aguila *et al.*, 1993). La TOD fue controlada a 3 % con respecto a la saturación del aire, mediante la manipulación de la presión parcial de nitrógeno y oxígeno en la alimentación, a través de controladores de flujo másico (Brooks Instruments) y usando un algoritmo de control proporcional. Las fermentaciones se

corrieron a un flujo de gas constante de 800 ccpm, 29°C y una velocidad de agitación de 700 rpm.

Con el sistema descrito se logró controlar satisfactoriamente la TOD en los valores cercanos al *set point*.

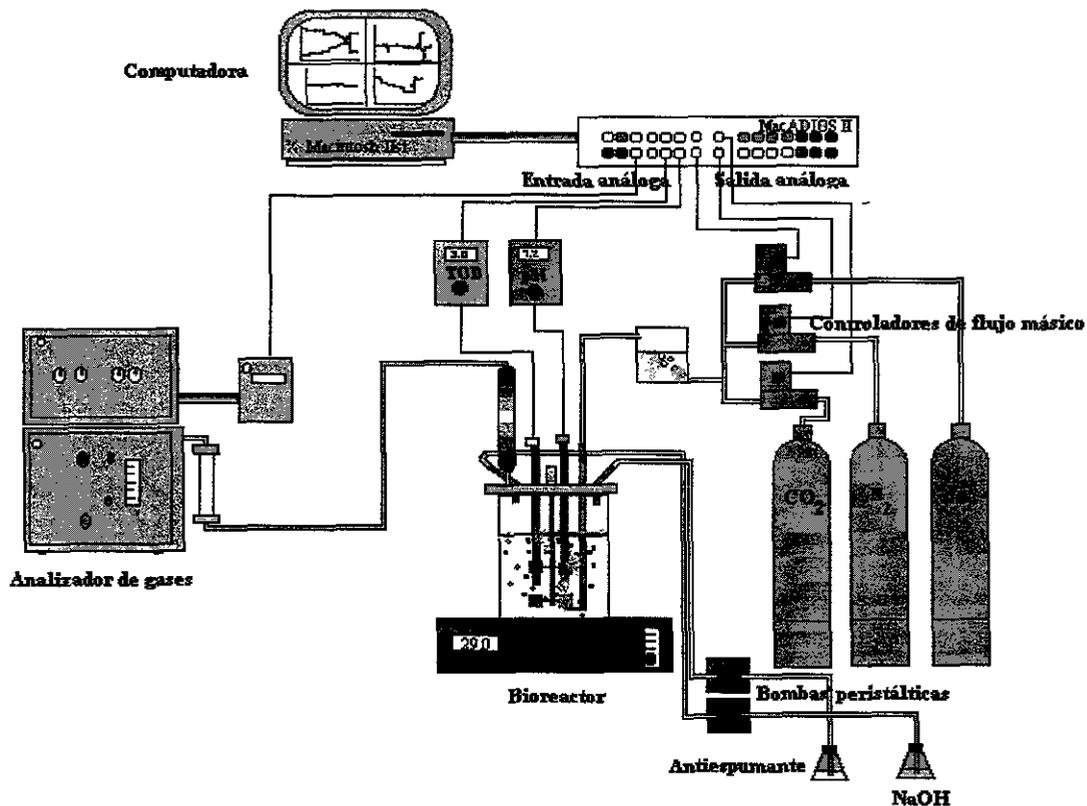


Figura 4.1 Esquema del sistema de fermentación y adquisición de datos (adaptado de Rocha, 1999).

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Análisis del dióxido de carbono a la salida del fermentador

Se monitoreó el CO₂ en el gas efluente del bioreactor mediante un detector infrarojo (Columbus Instruments International Corporation, modelo 1410), de la siguiente manera:

a) Calibración del equipo: Primero se fijó el cero mediante un flujo constante de nitrógeno a 800 ccpm, 14.7 PSI y 21°C y para la calibración del punto de detección máxima del equipo (18 %) se empleó una mezcla de gases de N₂ y CO₂, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se ajustaron los valores obtenidos en la señal análoga de salida con las concentraciones de CO₂ conocidas mediante el uso de un multímetro digital (Otto, MI16H). Las lecturas fueron dadas en porcentaje. Esta operación se repite varias veces hasta que la señal análoga corresponda con la concentración de CO₂ utilizada.

b) Después de calibrar el equipo, el sistema fue conectado a la salida de la corriente de gases del fermentador. Antes de entrar el gas al equipo de detección es pasado a través de un condensador y una trampa de humedad, la cual contiene perclorato de potasio (GFS Chemicals, Inc.) con la finalidad de eliminar la humedad presente en el gas.

4.2.2 Determinación de la concentración de CO₂ disuelto en el caldo de cultivo

La concentración de CO₂ (disuelto) en el caldo de cultivo se estimó mediante la ecuación propuesta por Royce y Thornhill (1991). Tomando en cuenta que la concentración de

CO₂ (disuelto) en el caldo de cultivo, se puede calcular, asumiendo que el CO₂ en el caldo de cultivo está en equilibrio con el gas a la salida del fermentador.

$$[CO_2]_{eq} = \frac{\%CO_2^{out}}{100} * \frac{(P - P_w)}{H\{CO_2\}}$$

Donde:

%CO₂^{out}= Presión parcial de CO₂ en la salida de los gases.(atm)

H{CO₂}= Constante de la ley de Henry para CO₂ = 33.555 atm·l·mol⁻¹

P= Presión total en el fermentador = 1 atm

P_w= Presión parcial del agua en el gas de salida =6.1781x10⁻² atm (Royce, 1992)

4.2.3 Determinación de sacarosa por el método de β-fructofuranosidasa-DNS

Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando una invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS), formando un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

a) Soluciones empleadas

Solución de DNS: Pesar 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y potasio, y 10 g de DNS y mezclar en este orden en 1.0 L de agua destilada, calentando para una disolución total.

Solución enzimática: Mezclar 2.5 mg de la enzima β-fructofuranosidasa (Cist-Brocades con una actividad de 243 U/mg a 40°C) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6).

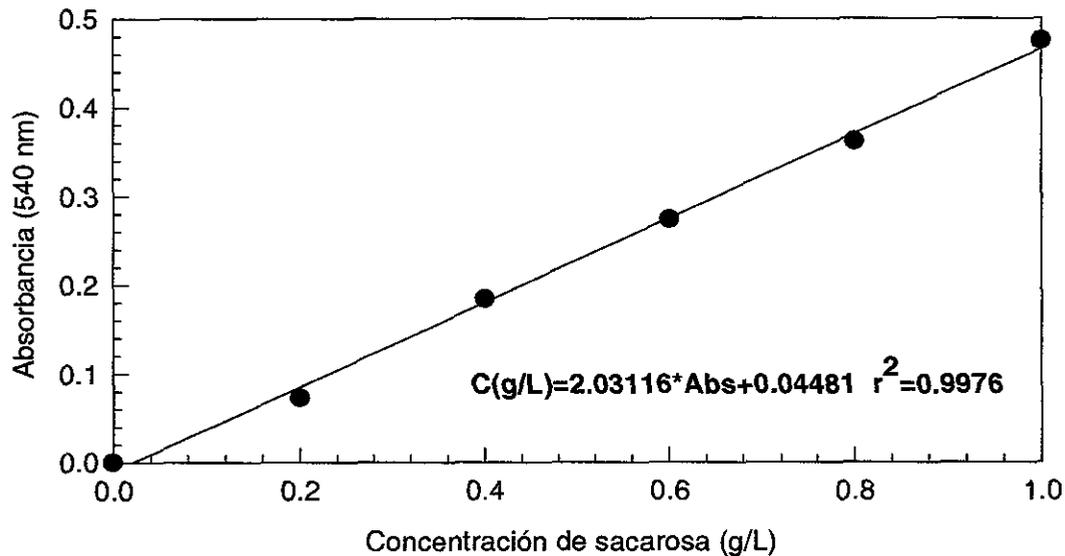


Figura 4.2 Curva estándar para la determinación de sacarosa

b) Procedimiento

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/25 con agua destilada. De aquí, se depositaron 0.9 mL en tubos de ensaye y se mezclaron con 0.1 mL de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y posteriormente se adiciono 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Chemical Co.). Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 min e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm contra un blanco de reactivos. Los valores se extrapolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2 a 1.0 g/L (**figura 4.2**).

4.2.4 Determinación de biomasa

La determinación de biomasa fue por un método gravimétrico y los resultados obtenidos se expresan en g/L de peso seco.

a) Soluciones empleadas

Solución de EDTA (0.1 M): Disolver 1.9 g de etilendinitrotetracetato disódico (EDTA) en 50 mL de agua destilada.

Solución de cloruro de sodio (1.0 M): Disolver 2.92 g de cloruro de sodio en 50 mL de agua destilada.

b) Procedimiento

Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL de EDTA (0.1M) y 1 mL de NaCl (1.0M). La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga (Beckman J2HS), usando el rotor JA20. Posteriormente, se separó el sobrenadante y el paquete celular fue lavado 3 veces con una mezcla de EDTA/NaCl 1:1 (v/v). Enseguida, el paquete celular fue filtrado al vacío a través de membranas *Nucleopore* con tamaño de poro de 0.45 μm (puestas con anterioridad a peso constante). La membrana conteniendo la muestra fue secada por 24 horas a 70°C en una estufa.

4.2.5 Extracción y cuantificación de alginato (Jarman *et al.*, 1978)

La técnica se basa en la precipitación del alginato con isopropanol y cuantificación gravimétrica del mismo.

a) Procedimiento

Se mezclaron 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm (centrífuga Beckman J2-HS) durante 20 min. Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 mL de isopropanol para la precipitación del producto. Por filtración se separó el precipitado y se resuspendió en 10 mL de agua desionizada por 10 minutos con agitación constante y se volvió a precipitar con el mismo volumen de isopropanol. El producto se filtró en membranas Whatman (No. 1, 1.6 µm de diámetro de poro), las cuales se secaron a 60°C por 24 h (hasta peso constante). Finalmente se pesó el filtro y se calculó la concentración de polisacárido en el medio.

4.2.6 Determinación de la viscosidad

La viscosidad del caldo de cultivo se midió en un viscosímetro de cono y plato (Wells-Brookfield LVT, Series 82198). Todas las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente (25°C) a 6 r.p.m. y usando el cono CP-52, lo cual corresponde (de acuerdo a los datos del fabricante) a una velocidad de deformación de 12 s⁻¹.

4.2.7 Distribución de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de filtración en gel (CFG) usando una serie de columnas Ultrahidrogel (UG 500 y 2000, Waters) de 7.8 mm (diámetro interno) por 300 mm, acopladas a un equipo de HPLC (Waters 625) con un detector de índice de refracción (Waters, 410). Como fase móvil se usó NaNO₃ 0.1M a 35°C a un flujo de 0.9 mL/min. La señal del detector fue procesada con un programa PC

compatible (Maxima GPC, Waters). La calibración de las columnas se llevó a cabo con un método estándar de calibración utilizando pululanos de *Aureobasidium pullulans* como estándares de peso molecular con un rango 5,800 a 1,600,000 daltones (Peña, 1998).

4.2.8 Medición de actividad alginasa por medio de cromatografía (HPLC)

Ésta técnica se basa en enfrentar alginato comercial con un extracto enzimático (obtenido del sobrenadante de los cultivos realizados), cuantificando los cambios en la distribución de los pesos moleculares del polímero empleado con respecto al tiempo, los cuales son determinados mediante cromatografía de filtración en gel.

a) Soluciones

Solución de TRIS (0.05M): Disolver 18.165 g de TRIS en 3 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con HCl concentrado.

Sustrato (alginato): Pesar 250 mg de ácido algínico y disolverlo en 50 mL de solución TRIS.

b) Procedimiento

1) Mezclar 10 mL de caldo de cultivo con 1 mL de Na₂EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y posteriormente centrifugar a 12,000 rpm (centrífuga Beckman J2-HS) durante 20 min.

2) Colocar el sobrenadante obtenido en membranas preparadas para diálisis y sellarlas con broches.

- 3) Dichas muestras depositarlas en la solución de TRIS con agitación constante a una temperatura de 4°C, durante 12 horas.
- 4) Posteriormente se enfrentan 4 mL de sustrato (solución de alginato) y 1 mL de muestra, en tubos de ensaye.
- 5) De la solución anterior, se toman 200 μL y se calientan a temperatura de ebullición durante 5 minutos (T_0).
- 6) Los tubos se conservan en hielo.
- 7) El resto de la solución se incuba durante 4 horas a temperatura ambiente.
- 8) Se repite el punto número 5.
- 9) Las muestras obtenidas se filtran a través de membranas *Nucleopore* (0.2 μM de diámetro de poro) y posteriormente se inyectaron en el HPLC.

4.2.9 Integración de las curvas de generación de CO_2

Con la finalidad de identificar diferencias entre las condiciones evaluadas con respecto a la generación de CO_2 , se procedió a integrar las curvas de generación de este gas. Para ello, los datos obtenidos (medición del CO_2 en el gas efluente) de las diferentes condiciones fueron procesados mediante el programa Microcoal Origin versión 3.5 bajo ambiente *Windows*. Las áreas obtenidas de la integración de las curvas de CO_2 , fueron normalizadas tomando como unidad el valor promedio obtenido del cultivo testigo.

4.3 Cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos

La velocidad específica de crecimiento (μ) fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$dX/dt = \mu X \quad (4.1)$$

Donde:

dx/dt = Velocidad de crecimiento

μ = Velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial.

De la integral de la ecuación (4.1) se obtiene:

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

Simplificando:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t$$

Posteriormente se graficó el tiempo contra $\ln X$, y la pendiente obtenida representa la velocidad específica de crecimiento.

Las constantes de la ecuación de Luedeking-Piret para producto fueron calculadas de acuerdo con Miranda (1998), donde α se refiere a la producción asociada al crecimiento y β es el término que representa la producción no asociada al crecimiento.

Se partió de la ecuación logística:

$$dX/dt = \mu X (1 - X / X_m) \quad (4.2)$$

Donde:

X_m = Máxima concentración de biomasa

Para la formación de producto se utilizó la siguiente ecuación:

$$dX/dt = \alpha dX/dt + \beta X \quad (4.3)$$

la integración y rearreglo de la ecuación (4.2) genera la siguiente ecuación:

$$X(t) = X_0 e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \quad (4.4)$$

La integración de la ecuación (4.3) y la posterior sustitución en la ecuación (4.4) genera la evolución de P en el tiempo (4.5):

$$P(t) = P_0 + \alpha (X_m / \mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})] \quad (4.5) \\ + \beta X_0 \{e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]\}$$

El parámetro β (constante no asociada al crecimiento) se evaluó a partir de los datos experimentales de dP / dt tomados de la cinética de cultivo en la fase estacionaria.

$$\beta = (dP / dt) X_m$$

El valor (dP / dt) se obtuvo a partir de los incrementos de P (alginato) en el tiempo (t) a partir de los datos experimentales.

El parámetro α se obtiene a partir de la ecuación (4.5) rearmada:

$$P(t) = P_0 + \alpha X_0 \{e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]\} \quad (4.5) \\ + \beta (X_m / \mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]$$

de tal forma que:

$$P(t) - P_0 = \alpha X_0 \{e^{\mu t} / [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]\} \\ + \beta (X_m / \mu) \ln [1 - (X_0/X_m) (1 - e^{\mu t})]$$

Como:

$$X(t) = \{e^{\mu t} / [1 - (X_o/X_m) (1 - e^{\mu t})]\}$$

El parámetro α (constante asociada al crecimiento), se obtuvo de la pendiente que resulta de graficar $P - P_o - \beta (X_m / \mu) \ln [1 - (X_o/X_m) (1 - e^{\mu t})]$ contra $X(o) - X(t)$.

Los rendimientos de biomasa y de producto en base a sacarosa (Y_x/s y Y_p/s), así como las velocidades específicas de síntesis de polímero y las velocidades específicas de consumo de sacarosa fueron calculados a partir de los datos experimentales, mediante los incrementos de las variables involucradas.

Nota:

En el apéndice se presentan ejemplos de los cálculos de la velocidad específica de crecimiento, de rendimientos y de velocidades específicas.

Capítulo V

Resultados y Discusión

5.1 Fermentación testigo

Una de las interrogantes planteadas en el presente trabajo fue: ¿Qué tanto CO₂ es generado por *Azotobacter vinelandii*?. Para responder esta pregunta, se realizaron cultivos en biorreactor controlando la tensión de oxígeno disuelto (TOD) a un nivel de 3 % y sin adición de CO₂ (condición que definiremos como testigo). El control de la TOD se realizó variando las presiones parciales de oxígeno y de nitrógeno en la entrada de los gases, con una velocidad de agitación constante de 700 r.p.m., a un pH de 7.2 y 29°C. Esta condición (3 % de TOD y 700 rpm), fue elegida por ser donde se obtienen las concentraciones máximas del polímero, y el crecimiento del microorganismo ocurre sin limitaciones de tipo difusional (Peña, 1998). Además, el CO₂ en el gas effluente, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y las concentraciones de biomasa, alginato y sacarosa fueron medidos en intervalos regulares durante los cultivos (para más detalles ver materiales y métodos).

En la **figura 5.1** se muestra como, a través del sistema de adquisición y control de datos, se logró mantener -mediante la variación de las presiones parciales de los gases oxígeno y nitrógeno- el valor asignado como *set point* de TOD (3 %) durante la mayor parte del cultivo. También se muestra el adecuado control de pH que se logró durante la fermentación, mediante la adición de NaOH 2N.

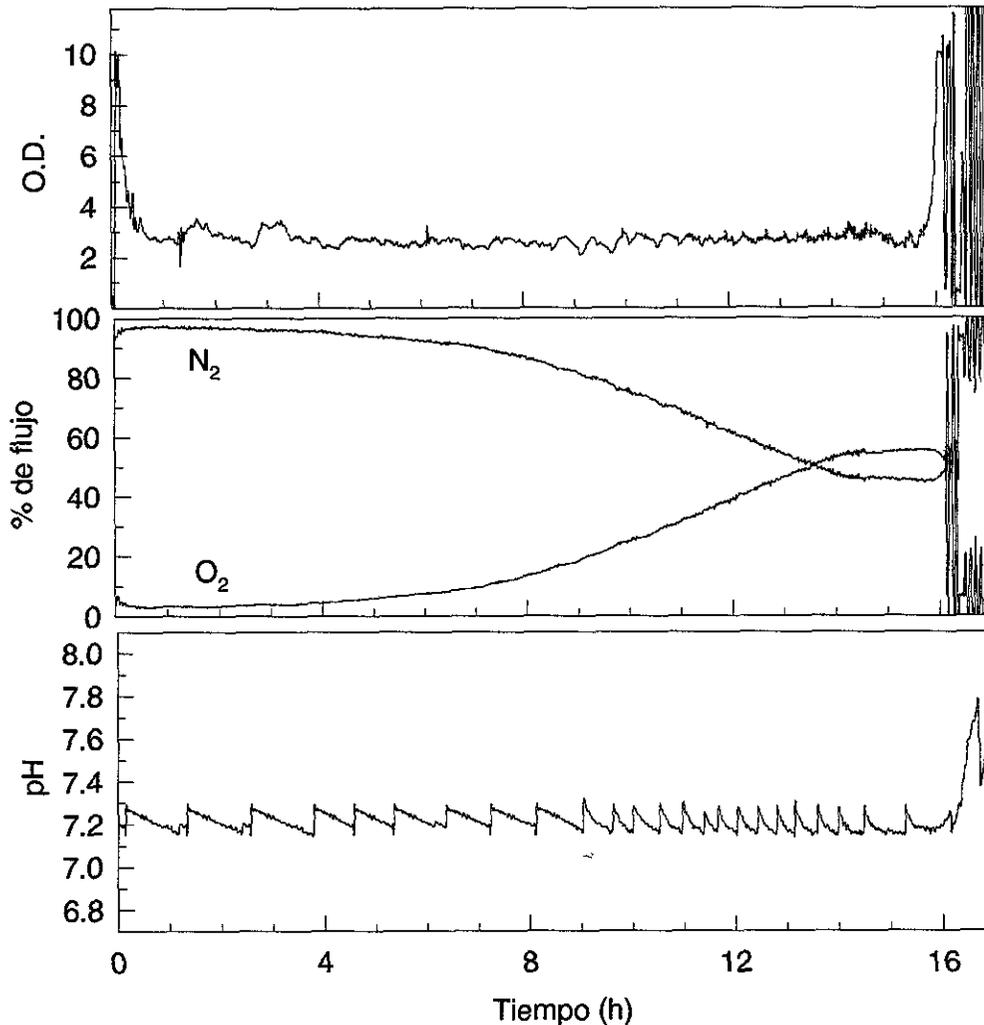


Figura 5.1. Perfiles típicos de oxígeno disuelto, gases (oxígeno y nitrógeno) y pH durante el cultivo testigo (3% TOD, 700 r.p.m. y 29°C) de *A. vinelandii*.

La **figura 5.2** muestra la evolución de CO_2 , la cinética de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa para estos cultivos (700 r.p.m., 3 % de TOD, sin adición de CO_2). Cada uno de los puntos representados en la gráfica representa el promedio de dos fermentaciones bajo esa misma condición, con su respectiva barra de error.

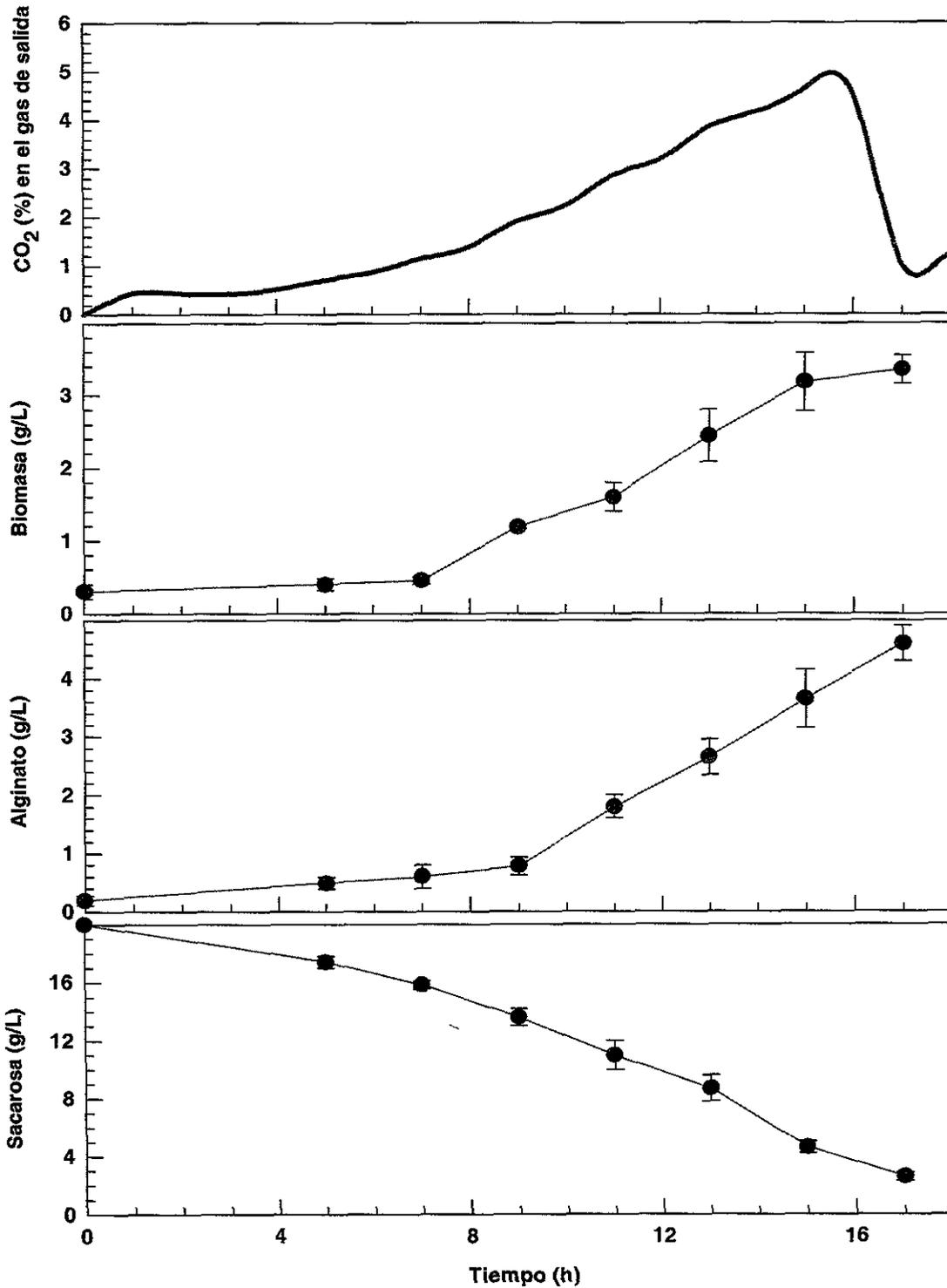


Figura 5.2. Evolución de CO₂, cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en el cultivo control.

En la **figura 5.2** se puede observar que la concentración máxima alcanzada de biomasa fue de 3.4 g/L, lo cual ocurrió a las 17 horas del cultivo. La producción de alginato fue asociada al crecimiento celular, alcanzándose una concentración del polímero de 4.65 g/L, al final del cultivo. El consumo de sacarosa al término de la fermentación (17 horas) fue de un 87.5 %.

La **figura 5.2** muestra que el valor de CO₂ medido en el gas de salida del biorreactor estuvo relacionado con la concentración celular en el fermentador. El nivel de CO₂ se incrementó conforme el microorganismo crecía, alcanzando una concentración de máxima 4.8 % de CO₂ (a las 16 horas), disminuyendo hasta valores de 1 % cuando finalizó el crecimiento del microorganismo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron semejantes a los reportados por Peña (1998). Este autor reporta (para las mismas condiciones) concentraciones máximas de 3.3 g/L y 5.0 g/L para biomasa y alginato, respectivamente. Además, la velocidad específica de crecimiento calculada en el presente trabajo (0.225 h⁻¹) es igual a la reportada previamente por Peña (1998).

Como se explicó con anterioridad, la concentración máxima de CO₂ generada por *A. vinelandii* en el cultivo testigo, fue de 4.8 % en el gas efluente del fermentador. Este valor se encuentra abajo del límite tolerable (5 %) por una gran cantidad de microorganismos (Jones y Greenfield, 1982). Sin embargo, este nivel de CO₂ generado es

inferior al producido por otros sistemas biológicos como *Penicillium chrysogenum* (Ho y Smith, 1987) y *Aspergillus niger* (McIntyre y McNeil, 1998). Estos microorganismos generaron valores de CO₂ de hasta 8 %. El CO₂ es un producto de particular importancia para *A. vinelandii*, ya que este gas es generado como resultado de un proceso en el cual el microorganismo incrementa su respiración para disminuir el oxígeno presente en el medio, con el propósito de proteger su sistema de nitrogenasas.

Este cultivo testigo, además de permitir conocer cual es el nivel de CO₂ generado por *A. vinelandii*, permiten tener un punto de referencia para evaluar los cultivos llevados a cabo con adición de diferentes niveles de CO₂ en el gas influente, los cuales se presentarán a continuación.

5.2 Fermentaciones adicionando diferentes niveles de CO₂ en el gas influente

Con la finalidad de conocer el efecto del CO₂ sobre los cultivos de *A. vinelandii* se desarrollaron una serie de cultivos bajo condiciones de operación constantes a 3 % de TOD. Además, se usó una mezcla de gases con el fin de llevar a cabo los cultivos bajo condiciones de 4, 8, 13 y 25 % de CO₂ con respecto al total de los gases suministrados al cultivo, a 0.8 vvm y a una presión de 1.0 atm.

El nivel más bajo evaluado fue de 4 % de CO₂ en el gas influente. Esta condición fue elegida en base a que en ciertos microorganismos, niveles de CO₂ menores a 5 % en la mezcla de gases influentes han mostrado estimulación del crecimiento para especies como

Pseudomonas fluorescens (Gill y Tan, 1979), *Sclerotium rolfsii* (Kritzman *et al.*, 1977), *Escherichia coli* (Repaske y Clayton, 1978; Lacousiere *et al.*, 1986). En algunos casos, (en la producción de enzimas) con la adición de este gas se incrementó la actividad del metabolito (Gandhi y Kjaergaard, 1975). A estos niveles existía la posibilidad de observar algún efecto positivo sobre los cultivos de *Azotobacter vinelandii*. Los resultados presentados en la **figura 5.3** muestran que el crecimiento celular y el consumo de sacarosa no fueron afectados por la adición del CO₂. Parece existir una ligera disminución en la producción del polímero, la cual es observada hasta el final del cultivo. Sin embargo, esta diferencia no parece ser significativa. La estimulación del crecimiento en algunos microorganismos se ha asociado al tipo de medio de cultivo empleado (Jones y Greenfield, 1982). En medios simples, el CO₂ suministrado en niveles menores al 5 % puede ser carboxilado, y de esta manera participa en la generación de intermediarios en la síntesis de aminoácidos y de otros compuestos esenciales (que no se encuentran en el medio de cultivo) para el crecimiento (Gill y Tan, 1979). Sin embargo, para el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* se descarta esta posibilidad al ser crecido en un medio complejo.

Se decidió experimentar un nivel intermedio de CO₂ (8 %), semejante al máximo generado por otros microorganismos como *Penicillium chrysogenum* (Ho y Smith, 1986 a, b) y *Aspergillus niger* (McIntyre y McNeil, 1998). Los resultados se presentan en **figura 5.4**.

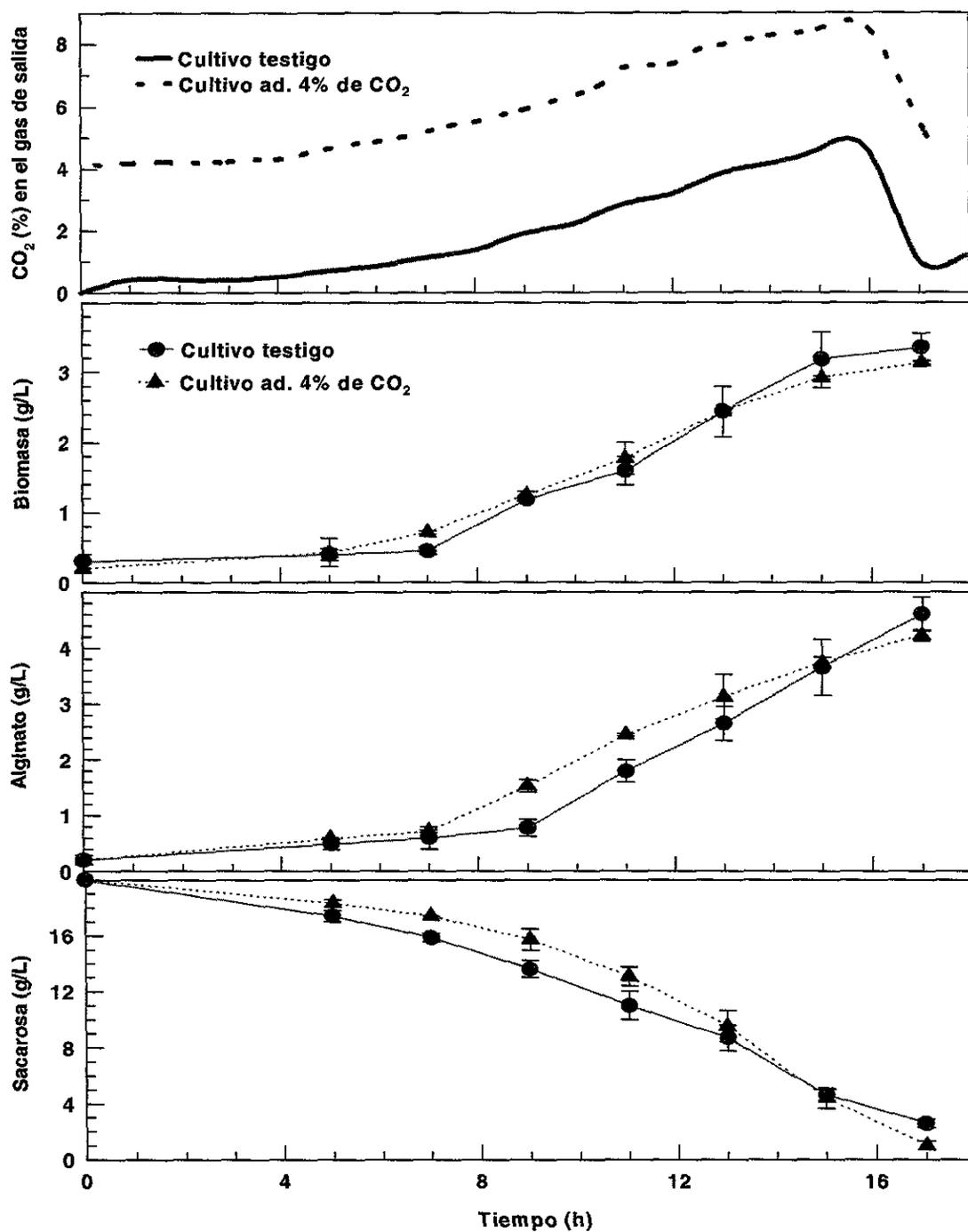


Figura 5.3 Evolución de CO₂, cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en el cultivo testigo y en el cultivo con adición de 4% de CO₂ en el gas influente.

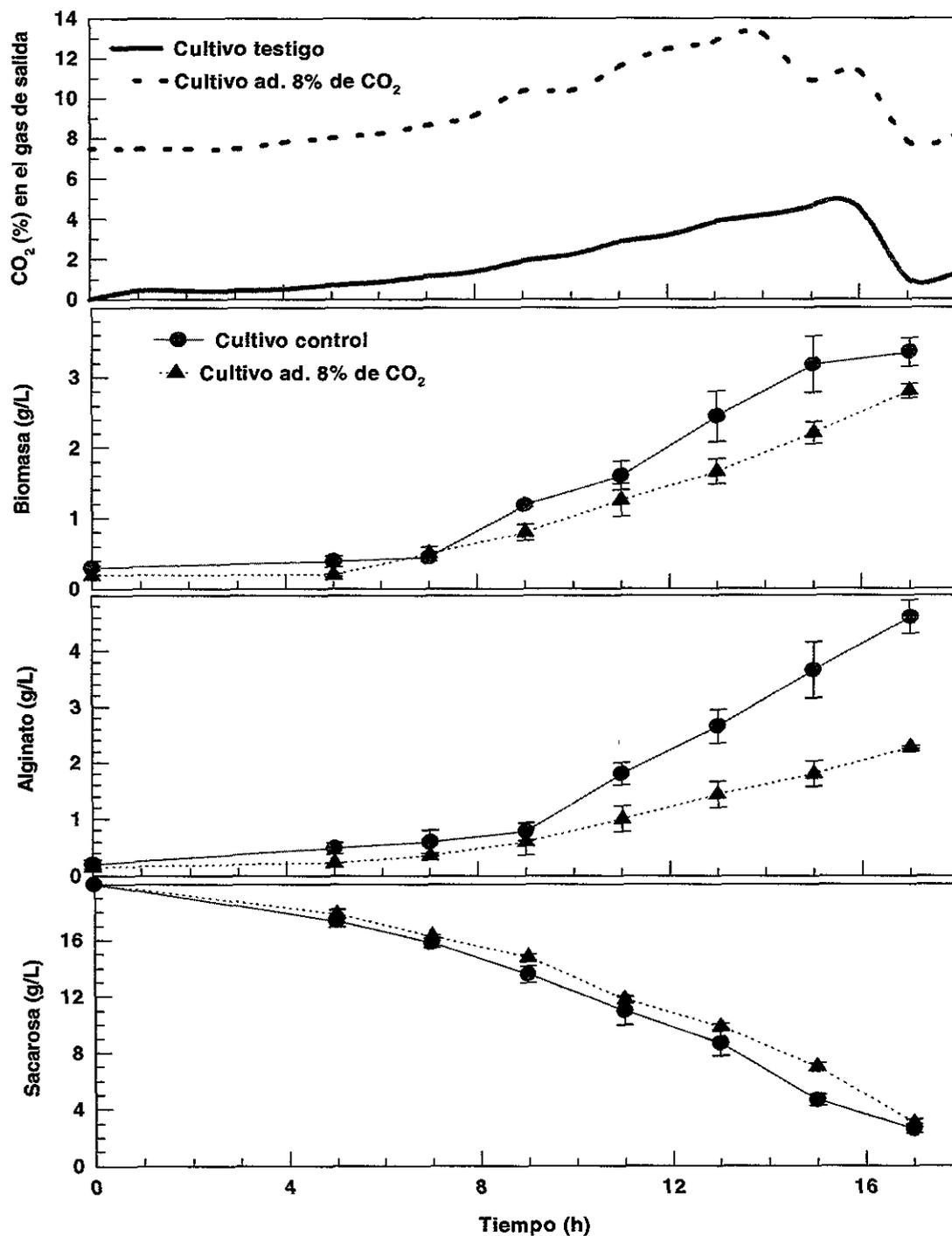


Figura 5.4 Evolución de CO₂, cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en el cultivo testigo y en un cultivo con adición de 8 % de CO₂ en el gas influente.

La **figura 5.4** muestra la evolución del cultivo (CO_2 , biomasa, alginato y sacarosa) expuesto continuamente a una concentración de entrada en la mezcla de gases de CO_2 de 8 %. Bajo estas condiciones, la concentración máxima de biomasa fue de 2.83 g/L (85 % del máximo alcanzado en el cultivo estándar). La concentración máxima de alginato (2.23 g/L) fue 49 % del valor obtenido en la fermentación control. El consumo de sacarosa fue semejante al obtenido en el cultivo control (sin adición de CO_2).

Los resultados presentados en la **figura 5.4** indican que si el cultivo de *A. vinelandii* se escalara a un reactor industrial, se obtendrían inhibiciones en el crecimiento de la biomasa y de la producción del polímero en el fondo del reactor. En fermentadores industriales conteniendo medio líquido arriba de 10 metros y con una presión en la parte superior de 1.5 atm Abs., las concentraciones que se pueden alcanzar en el fondo del biorreactor son semejantes a los niveles simulados con una mezcla de gases conteniendo 8 % de CO_2 (Onken y Liefke, 1989).

La **figura 5.5** presenta los resultados de la fermentación de *Azotobacter vinelandii*, continuamente expuesta con una mezcla de gases conteniendo 13 % de CO_2 . Su comportamiento fue muy particular, debido a que se obtuvieron valores de alginato de 3.35 g/L, los cuales fueron superiores a los obtenidos en la fermentación donde se adicionó 8 % de CO_2 (2.23 g/L). La concentración máxima de biomasa (3.05 g/L), fue semejante a la encontrada en la fermentación control (3.34 g/L) y en las fermentaciones

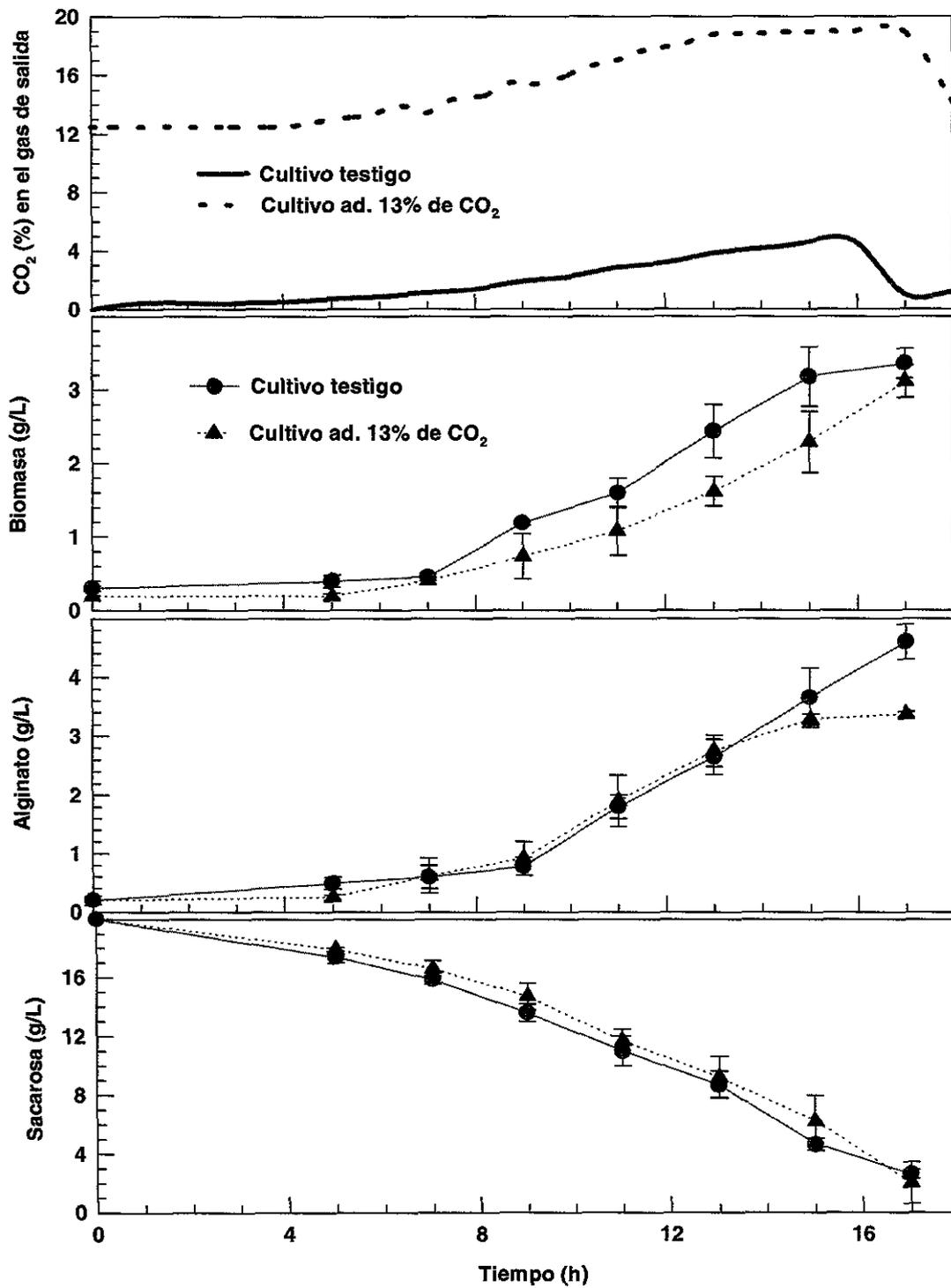


Figura 5.5 Evolución de CO₂, cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en el cultivo testigo y en el cultivo con adición de 13 % de CO₂ en el gas influente.

donde se adicionaron 4 % y 8 % de CO₂, obteniéndose 3.07 g/L y 2.83 g/L, respectivamente. A pesar de la alta proporción de CO₂, el cultivo a 13 % de CO₂ finalizó en el mismo período de tiempo y consumió niveles semejantes de sacarosa, si se compara con las condiciones anteriormente evaluadas (0, 4 y 8 % de CO₂).

Cuando la fermentación de alginato se mantuvo bajo exposición continua del 25% de CO₂ (**figura 5.6**), la naturaleza inhibitoria del CO₂ sobre el metabolismo de *Azotobacter vinelandii* y sobre la producción de alginato fueron evidentes. Se observó una inhibición total tanto en el crecimiento, la producción del polímero y el consumo de sacarosa.

Algunos de los efectos principales son resumidos en la **figura 5.7**. En esta figura se observa que no existe un efecto marcado del CO₂ sobre el crecimiento celular para las condiciones de 4, 8 y 13 % de adición de CO₂, comparados con el testigo (sin adición de CO₂). Algunos de estos valores de CO₂ en la corriente de entrada de gases (8, 13 %) son superiores a los niveles de CO₂ encontrados en el espacio de cabeza de matraces en otros modelos biológicos (Kato y Tanaka, 1998). A una concentración de 25 % de CO₂, el crecimiento y la producción del alginato fueron totalmente inhibidos. La **figura 5.7** también muestra los rendimientos de alginato en base a la biomasa ($Y_{p/x}$). Para la condición donde se adiciona 4 % de CO₂, el comportamiento fue muy semejante a la fermentación testigo. No existen diferencias estadísticas entre estas dos condiciones. El menor rendimiento fue obtenido en la condición donde se adicionó 8 % de CO₂ y está relacionado con los niveles más bajos de biomasa y alginato obtenidos. También, se sugiere una posible estimulación del rendimiento

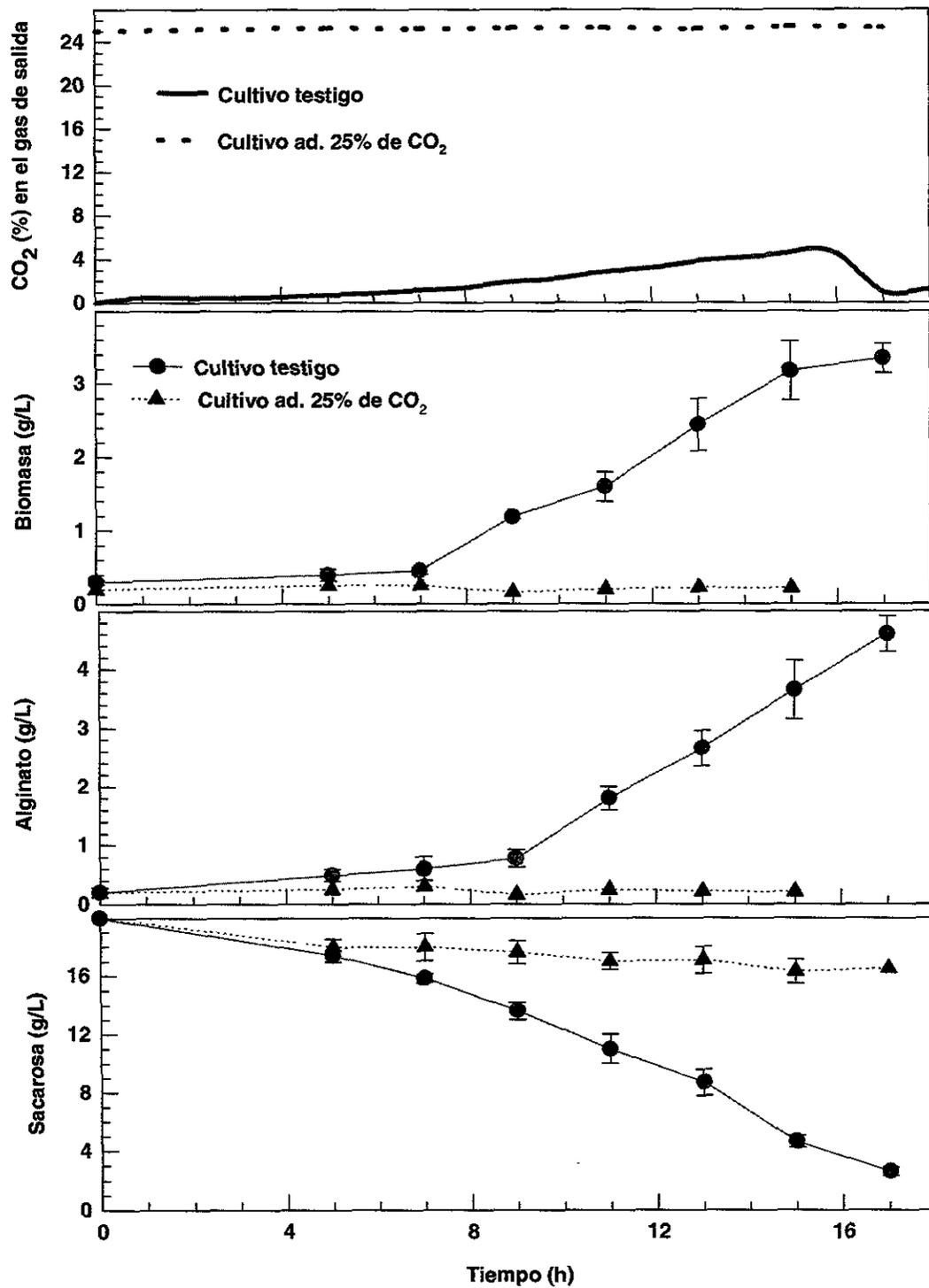


Figura 5.6 Evolución de CO₂, cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en el cultivo testigo y en el cultivo con adición de 25 % de CO₂ en el gas influente.

para el nivel de 13 % (en comparación con el testigo), para lo cual se evaluaron los datos estadísticamente mediante la prueba de *t* de Student, con 95 % de confianza, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con base a este análisis. En la **tabla 5.1** se muestran los resultados de esta prueba. Lo anterior sugiere la existencia de un comportamiento de tipo inhibitorio-estimulador promovido por los niveles de adición de CO₂ de hasta 13 %.

McIntyre y McNeil (1997a) encontraron un comportamiento semejante al mostrado en el presente trabajo de tipo, inhibitorio-estimulador, para el crecimiento de *Aspergillus niger*. Estos autores indican que, conforme se adiciona más CO₂ (5, 7.5, 12 y 15 %), el consumo de sacarosa, producción de citrato y crecimiento del microorganismo se ven disminuidos al compararlos con un cultivo sin adición de CO₂. Sin embargo, se aprecia una tendencia estimuladora con respecto al crecimiento del hongo, cuando el cultivo se somete a una concentración de 12 % de CO₂. En un nivel semejante (13 %), experimentada en el presente estudio, se observó una estimulación del crecimiento. Sin embargo, los autores (McIntyre y McNeil, 1997 a), similar a lo que sucede en el presente trabajo, no cuentan con los suficientes argumentos para explicar este comportamiento.

Al analizar las velocidades específicas de crecimiento (**figura 5.8**), se observa que la condición en la cual el microorganismo creció más rápidamente fue en el cultivo testigo. Fue clara una disminución en las velocidades específicas de crecimiento (μ) conforme se adicionaba más CO₂ en la entrada de los gases (hasta 8 %). Sin embargo, a 13 % existe un

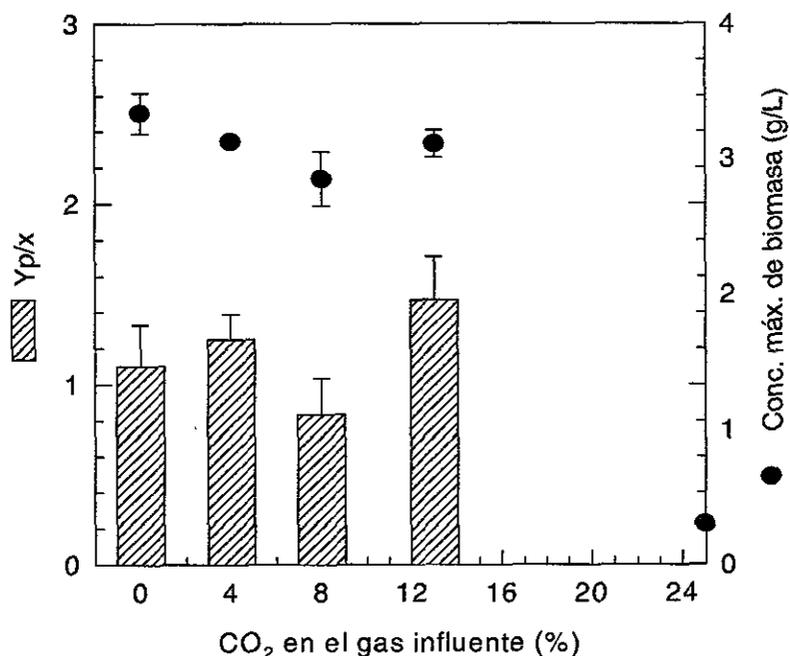


Figura 5.7. Rendimientos ($Y_{p/x}$) y concentraciones máximas de biomasa, en cultivos de *Azotobacter vinelandii* adicionando 0, 4, 8, 13 y 25 % de CO_2 en el gas de entrada.

Tabla 5.1 Resultados de la prueba t de *student* entre las condiciones evaluadas

Comparación entre tratamientos	t calculada	t tabla > 95 %	Resultado
Testigo - 4 %	1.41	1.81	*
Testigo - 8 %	2.03	1.83	**
Testigo - 13 %	2.38	1.86	**
4 % - 8 %	3.97	1.83	**
4 % - 13 %	1.56	1.86	*
8 % - 13 %	4.20	1.99	**

*No existe diferencia estadística, ** diferencia estadística.

incremento en la μ , lo cual es otro indicativo del comportamiento inhibitorio-estimulador. Se llegó a la inhibición total del crecimiento cuando se expuso el cultivo a una concentración de 25 % de CO_2 .

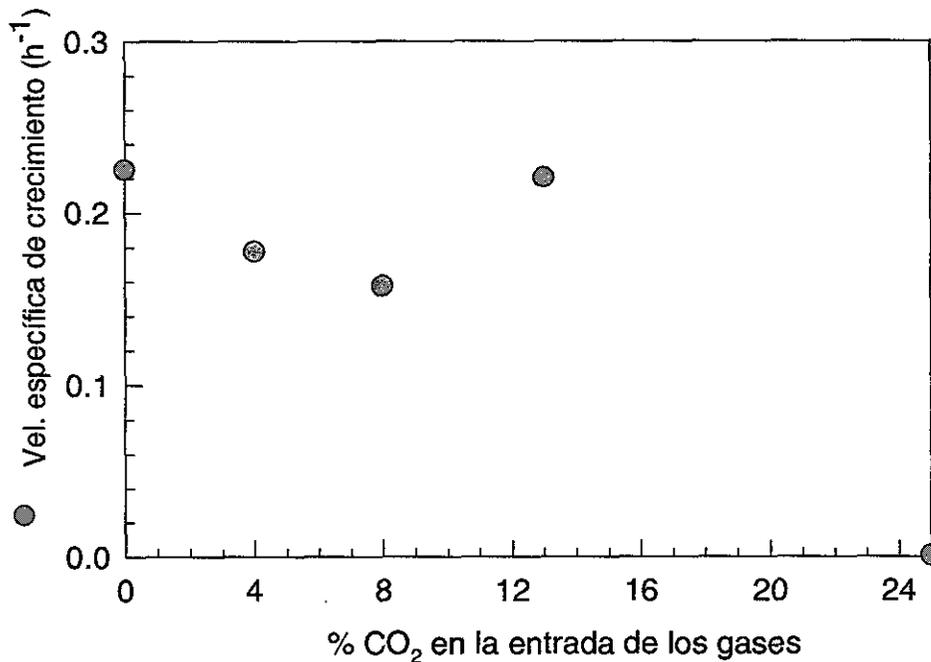


Figura 5.8. Velocidades específicas de crecimiento (μ) a diferentes niveles de CO_2 empleados en los cultivos de *A. vinelandii*.

En la **tabla 5.2** se muestra, junto con las velocidades de crecimiento, las constantes de la ecuación de Luedeking-Piret para producto (α se refiere a la producción asociada al crecimiento y β es el término que representa la producción no asociada al crecimiento). Estas constantes fueron calculadas de acuerdo a Miranda (1998). Además, se presentan los rendimientos de biomasa y de producto en base a sacarosa ($Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$), así como las velocidades específicas de síntesis de polímero y las velocidades específicas de consumo de sacarosa.

Tabla 5.2. Velocidades específicas de crecimiento, constantes de la ecuación de Luedeking-Piret y rendimientos.

FERMENTACION	μ (h ⁻¹)	α g Alg/g Biomasa	β g Alg/g Biomasa h	Y x/s g Biom/ g Sac	Y p/s g P/g Sac	(dp/dt)/dx g Alg h ⁻¹ / g Biom	(ds/dt)/dx g Sac h ⁻¹ / g Biom
CONTROL	0.2250	1.531	0	0.1855	0.2566	0.1197	0.4320
4 %	0.1775	1.340	0	0.1647	0.2221	0.0807	0.3814
8 %	0.1575	0.893	0	0.1286	0.1164	0.0702	0.4546
13 %	0.2200	1.165	0	0.1727	0.1872	0.0893	0.6007
25 %	-	-	-	-	-	-	-

La producción del polímero para todas las condiciones evaluadas fue totalmente asociada al crecimiento ($\alpha > 0$) y los valores de β (constante no asociada al crecimiento) fueron de cero. Esto es una consecuencia de la ausencia de producción de alginato en la fase estacionaria de crecimiento. Los máximos rendimientos (Yx/s y Yp/s) en base al consumo de sacarosa se obtuvieron en la fermentación control, seguido por los obtenidos en el cultivo donde se adicionó 13 % de CO₂. Los menores rendimientos en todos los casos fueron obtenidos en los cultivos donde se adicionó 8 % de CO₂.

La **figura 5.9** muestra la evolución del CO₂ en las diferentes condiciones evaluadas. Las tendencias fueron muy similares. En la **tabla 5.3** se muestran las áreas obtenidas de la integración de las curvas de CO₂, las cuales fueron normalizadas tomando como unidad el valor obtenido del cultivo testigo. Para los cultivos control y adicionando 4 % de CO₂, la generación del gas es similar para estas dos condiciones, lo cual concuerda con las seme-

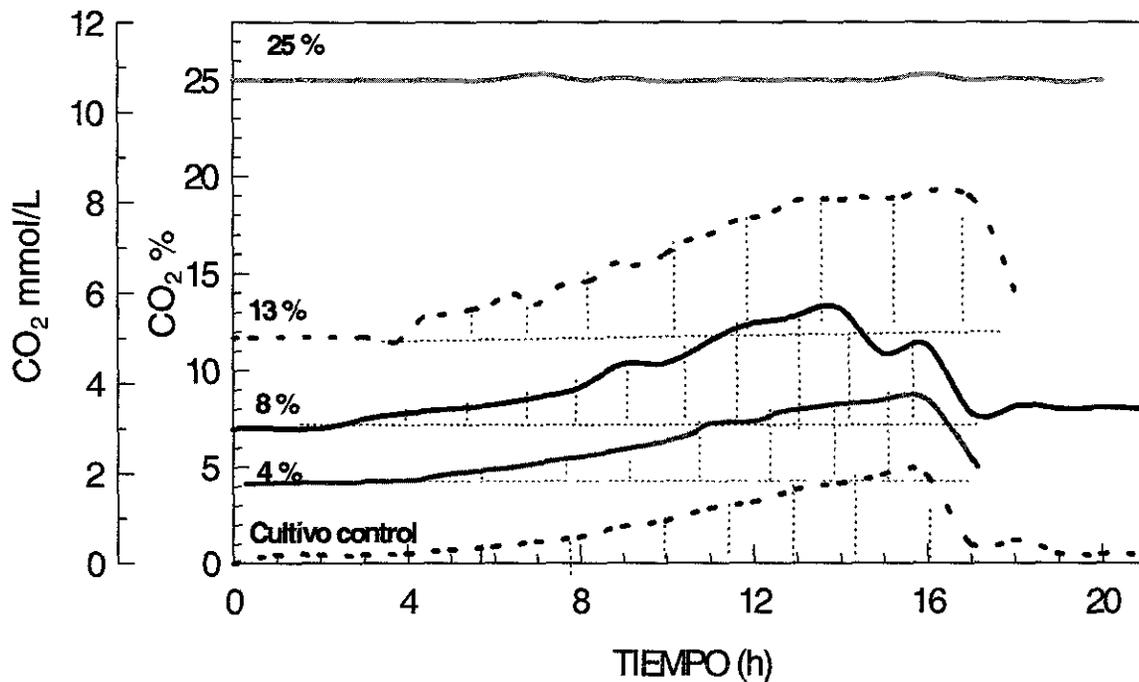


Figura 5.9. CO₂ a la salida de gases en diferentes cultivos, sin adición de CO₂ y adicionando 4, 8, 13 y 25% de CO₂ en el gas influyente y concentración de CO₂ en el seno del líquido en mmol/L (calculada de acuerdo con Royce y Thornhill, 1991).

janzas observadas en las cinéticas de crecimiento, producción del polímero, consumo de sacarosa y en los rendimientos anteriormente presentados. Lo anterior confirma que concentraciones hasta de 4 % en el gas influyente no afectan el metabolismo celular de *Azotobacter vinelandii*. También se muestra que conforme más CO₂ se adiciona (en el rango de 8 a 13 %), más CO₂ es producido, obteniéndose para la condición de 8 % de

CO₂, que el microorganismo genera 19 % más CO₂ que para la condición control. En la condición de 13 % de CO₂ se produce 63 % más que en la condición control.

Tabla 5.3 Áreas (normalizadas al cultivo testigo) obtenidas de la integración de las curvas de CO₂

Condición (% de CO ₂)	Control (0 %)	4 %	8 %	13 %
Área integrada	1	0.99	1.19	1.63

Estos datos están relacionados con los consumos específicos de sacarosa (dS/dt)/dx (tabla 5.2): el sistema que consume más sacarosa por gramo de biomasa en un determinado tiempo es el cultivo sometido a una concentración de 13 % de CO₂, seguido por la fermentación de 8 %. Esto sugiere que gran parte de la fuente de carbono que no es utilizada en la síntesis de alginato es desperdiciada en forma de CO₂.

La cantidad de dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo se puede predecir mediante la expresión propuesta por Royce y Thornhill (1991), la cual fue descrita en la metodología. Este método constituye sólo un acercamiento a los valores reales de CO₂ disuelto, ya que al emplear esta expresión se asume que la concentración de CO₂ disuelto se encuentra en equilibrio con el gas saliente del fermentador. La concentración del CO₂ disuelto en el caldo de cultivo determinada experimentalmente mediante sensores, en general es mayor que la calculada, asumiendo que el CO₂ disuelto en el caldo de cultivo

está en equilibrio con el gas proveniente del fermentador (Royce y Thornhill, 1991). Este desfase generalmente es de 10-30 % superior al predecido mediante a la expresión propuesta por estos autores. Para condiciones de poca aireación y elevados coeficientes de transferencia de masa, la concentración de CO₂ disuelto puede ser únicamente 10 a 20 % mayor que si se asume el equilibrio (Royce y Thornhill, 1991).

5.3 Viscosidades obtenidas en las diferentes condiciones evaluadas

En la **figura 5.10** se presentan las viscosidades de los caldos de fermentación encontradas

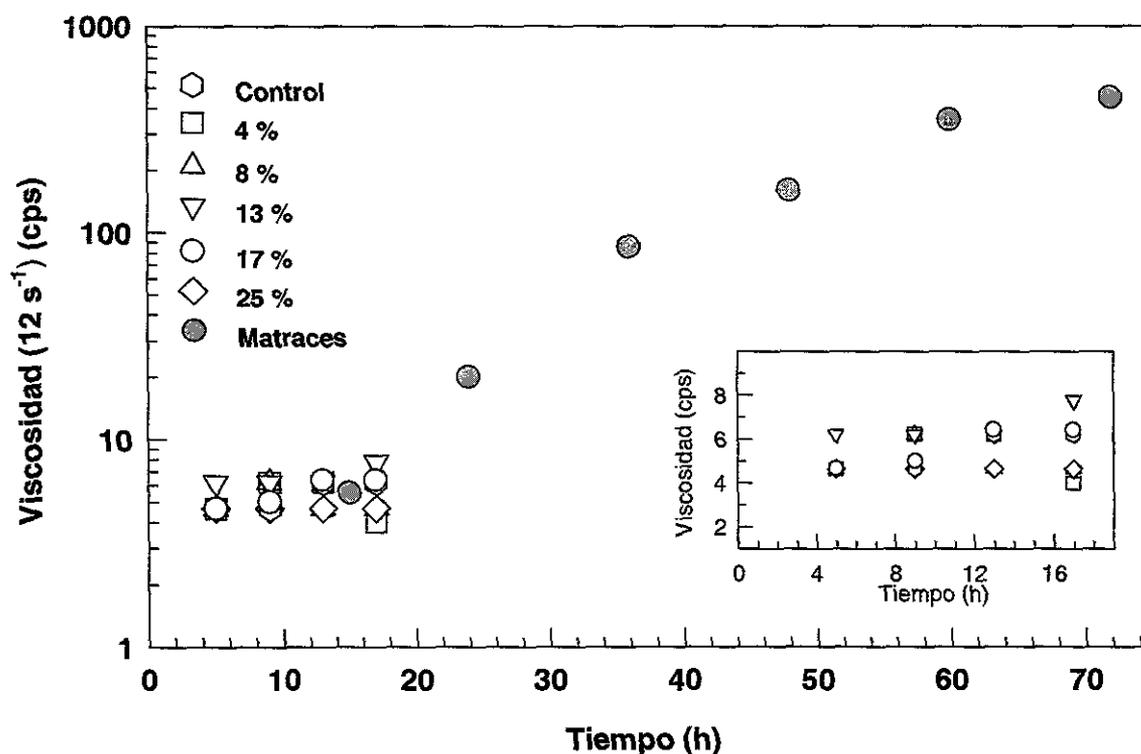


Figura 5.10 Evolución de la viscosidad de los diferentes caldos de fermentación de *A. vinelandii*.

bajo las condiciones evaluadas. Como se observa, la viscosidad del caldo de cultivo, no fue afectada por los diferentes niveles de CO₂ en la corriente de los gases introducidos en los cultivos. Para todos los cultivos se encontraron viscosidades muy bajas (menores a 10 cps).

Una manera de comparar las viscosidades obtenidas en los cultivos en biorreactor a diferentes niveles de CO₂ es compararlos con los valores obtenidos en matraces convencionales (Peña *et al.*, 1997). Esta comparación se basa en la hipótesis planteada al inicio del presente trabajo, donde se pensaba que las altas viscosidades alcanzadas (y por ende los pesos moleculares encontrados en este sistema) son causados por las concentraciones de CO₂ presentes dentro de los matraces. Sin embargo, como se observa en la **figura 5.10**, las viscosidades alcanzadas al final del cultivo en matraces, son superiores hasta por dos órdenes de magnitud a las encontradas al finalizar los cultivos en biorreactor.

Lo anterior descarta la posibilidad de que en matraces las viscosidades obtenidas sean influenciadas importantemente por el CO₂ presente en el ambiente interno del matraz. Este fenómeno puede estar relacionado con problemas más complejos de mezclado y cambios en las presiones parciales de oxígeno y de bióxido de carbono dentro del ambiente imperante en los cultivos en matraz.

5.4 Pesos moleculares promedio (PMP)

Los productos obtenidos en los cultivos realizados bajo las diferentes condiciones de adición de CO_2 fueron caracterizados en términos del peso molecular promedio (PMP).

La **figura 5.11** muestra el comportamiento de los pesos moleculares a través del tiempo de cultivo, para las diferentes condiciones evaluadas. Se puede observar que, hasta las 13

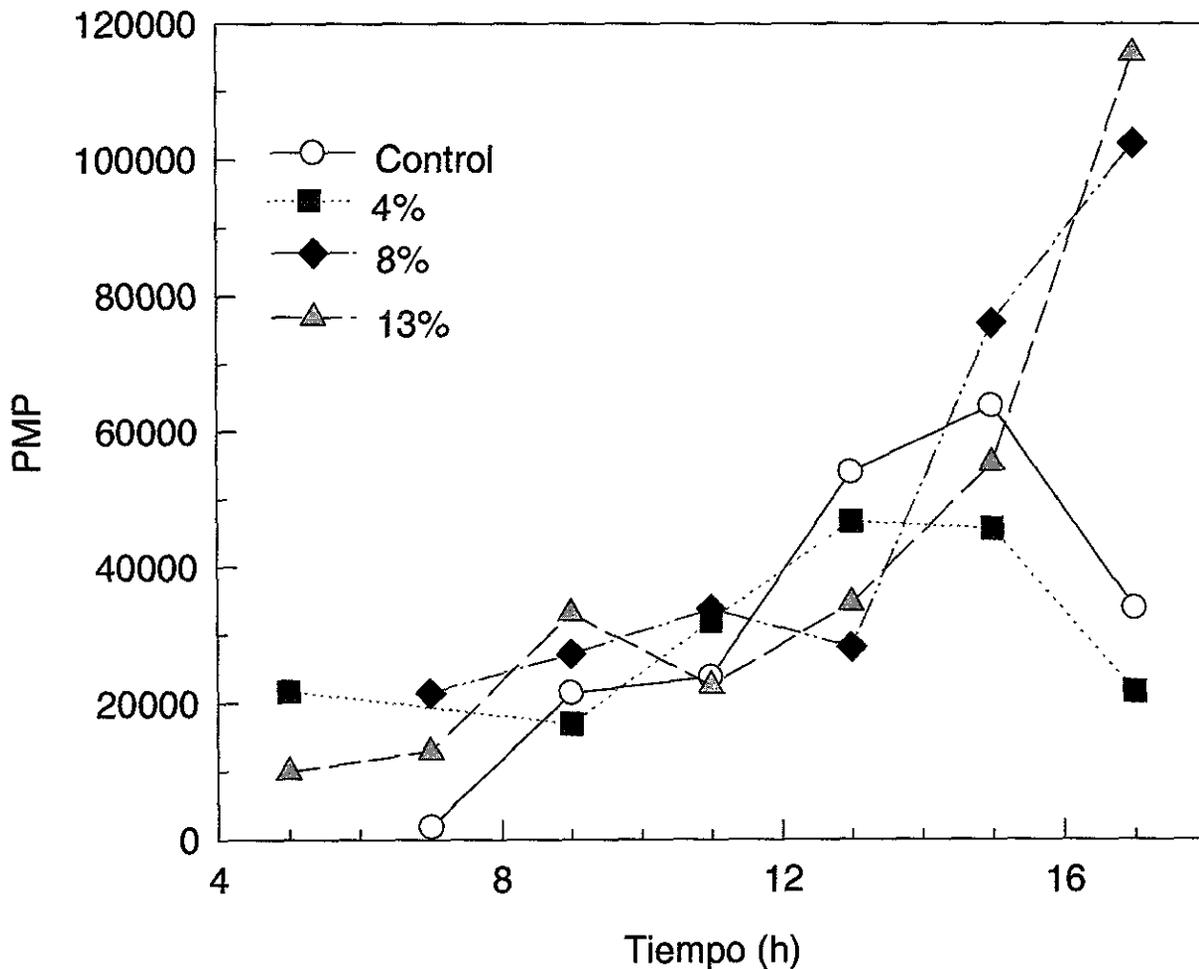


Figura 5.11. Evolución del peso molecular promedio del alginato aislado en las diferentes condiciones de CO_2 evaluadas (0, 4, 8 y 13 %).

horas de cultivo los pesos moleculares promedio de todas las condiciones tuvieron un comportamiento similar. Posteriormente, se distinguen dos comportamientos definidos. Uno de ellos es el representativo de los cultivos sometidos a los niveles de 0 y 4 % de CO₂, en donde en ambas condiciones se presentaron pesos moleculares bajos (menores de 70,000 Daltones). Asimismo, en los dos casos se alcanza un máximo en el peso molecular entre las 13 y las 15 horas de cultivo. El producto de la fermentación testigo alcanzó un peso de 64,000 Daltones. Por otra parte, el máximo peso molecular promedio, para los cultivos con adición de 4 % de CO₂, fue de 46,000 Daltones. Estos pesos moleculares fueron obtenidos a las 15 horas de cultivo. Sin embargo, al final del cultivo (17 horas) se observa una caída de más del 50 % en los pesos moleculares promedio. Estas caídas en los pesos moleculares ya habían sido descritas por Trujillo *et al.*, (1998) para cultivos realizados a 700 rpm y diferentes tensiones de oxígeno disuelto (1, 3, 5 y 7 %). También, estos autores reportaron este comportamiento en cultivos llevados a cabo a 700 rpm y con TOD oscilante. Estas reducciones en los pesos moleculares promedio posiblemente estén mediadas por la acción de las enzimas alginato liasas, las cuales parecen ser liberadas en respuesta a determinados niveles de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo y mediados por la edad del cultivo (Peña, 1998).

En los cultivos donde se adicionaron 8 y 13 % de CO₂, se observó un aumento en el peso molecular promedio de más (de 40,000 Daltones) en los tiempos finales de la fermentación (después de las 15 horas), obteniéndose 102,000 y 115,000 Daltones para 8 y 13 % de adición de CO₂, respectivamente. Esto contrasta drásticamente con lo que

sucede para las condiciones de 0 y 4 % de adición de CO₂, donde se observa una caída en los pesos moleculares promedio al final del cultivo. Estos resultados constituyen el primer reporte en donde no se observó caída de los pesos moleculares al final del cultivo, en experimentos realizados bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto y agitación (*i.e.* 700 r.p.m. y 3% de TOD, Peña, 1998; Trujillo *et al.*, 1998). Lo cual puede ser explicado de la siguiente manera: es posible que niveles altos de CO₂ (8 y 13%), sean suficientes para inactivar a las enzimas liasas encargadas de degradar el polímero; sin embargo, para confirmar esta propuesta se necesitarían realizar experimentos dirigidos a cuantificar las cantidades y actividades de las enzimas con actividad liasa.

La polidispersión es un reflejo de la distribución de los pesos moleculares que se encuentran en una determinada muestra. Mientras menor sea el número de polidispersión, más moléculas del mismo peso molecular existirán en una población. La **tabla 5.4** muestra las polidispersiones de los alginatos obtenidos en los diferentes cultivos. Para la fermentación testigo, al inicio y al final del cultivo se encuentran familias homogéneas, mientras que en la parte intermedia del cultivo, la distribución de las familias de pesos moleculares es muy extensa. Lo mismo sucede con el cultivo donde se adiciona 4 % de CO₂: en la parte final del cultivo es donde se encuentran las familias de peso molecular más uniforme del polímero, lo que apoya nuevamente la posibilidad de la acción de las enzimas liasas sobre el polímero, al disminuir el peso molecular promedio y homogeneizarse las tallas moleculares.

Para las condiciones de mayor adición de CO₂ (8 y 13 %), durante todo el cultivo se obtienen familias heterogéneas de pesos moleculares y no existe caída del peso molecular promedio.

Tabla 5.4 Índices de polidispersión de los alginatos obtenidos en los cultivos con adición de CO₂ (0, 4, 8 y 13 %).

Tiempo (h)	CO ₂ (%) adicionando			
	0	4	8	13
7	1.6	-----	16.8	20.0
9	22.3	16.3	14.3	46.4
11	26.0	20.2	18.6	25.4
13	30.2	11.9	14.7	26.9
15	41.8	13.8	40.0	27.6
17	9.0	5.1	23.1	27.0

La **figura 5.12** muestra la distribución de los pesos moleculares al final del cultivo, de las fermentaciones expuestas a diferentes proporciones de CO₂. Para las condiciones control y el cultivo adicionando 4 % de CO₂, se aprecia la existencia de 3 familias de pesos mole-

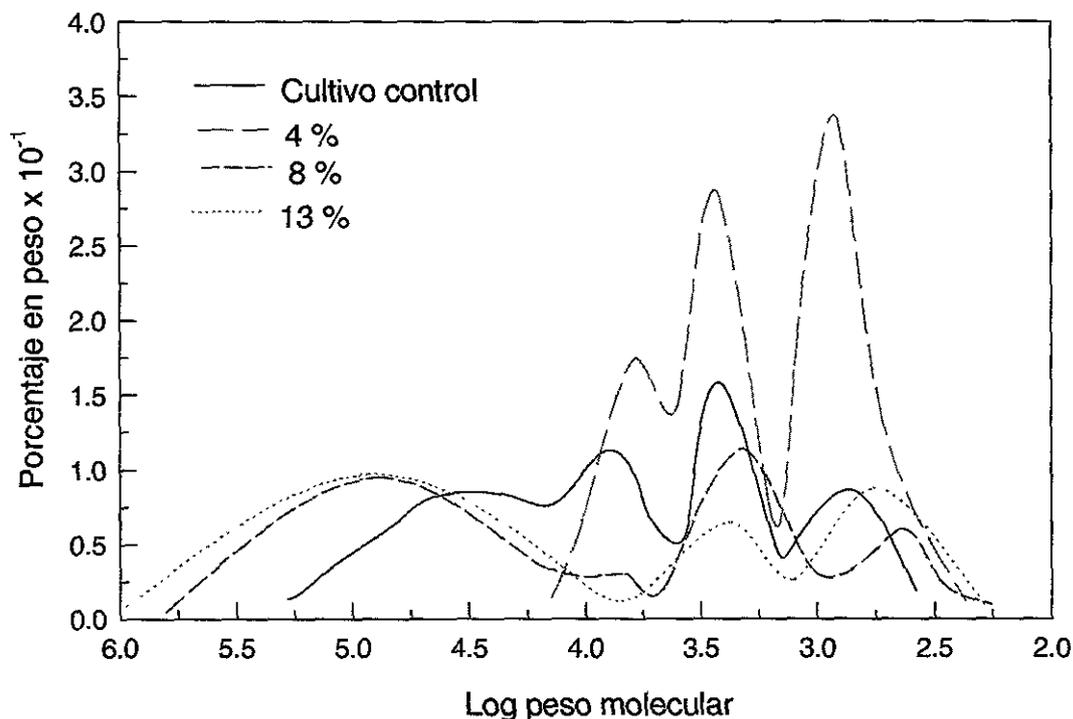


Figura 5.12. Distribución de los pesos moleculares del alginato aislado en las diferentes condiciones de CO₂ evaluadas (0, 4, 8 y 13 %).

culares bien definidas. Estas fracciones corresponden a pesos moleculares menores a 10,000 Daltones. Como se había indicado anteriormente, los pesos moleculares se incrementan conforme se adiciona más CO₂. En los cultivos donde se adicionó 8 y 13 % de CO₂, existen comportamientos muy semejantes entre sí, con respecto a la distribución de los pesos moleculares se aprecia una familia correspondiente a los 100,000 Daltones para ambas condiciones, mientras que, en la parte derecha de la gráfica se aprecian otras dos fracciones de peso molecular de baja talla molecular (inferiores a los 2,000 Daltones).

5.5 Expresión de liasas a altas concentraciones de CO₂

Una de las razones que podrían estar determinando las diferencias de pesos moleculares en los experimentos descritos en la sección anterior (5.4) es que altas concentraciones de CO₂ sean suficientes para inhibir el proceso de degradación del polímero. Por lo cual, a concentraciones mayores a 8 % de CO₂ se promueven PMP superiores a los obtenidos a bajas concentraciones de adición de este gas. En base a esto se realizó un experimento adicional, con un doble propósito: por una parte cuantificar la actividad depolimerizante al final del cultivo y por el otro, determinar si niveles mayores a 13 % de CO₂ inhiben ya sea el crecimiento o la producción del alginato. En consecuencia se llevó a cabo un cultivo adicionando 17 % de CO₂ en el gas de entrada (concentración superior a las concentración donde se observaron los PMP más altos). En este experimento solo fue posible evaluar las muestras finales.

Los resultados de este experimento indicaron que *A. vinelandii* fue capaz de crecer y producir polímero. Lo anterior muestra la resistencia de este microorganismo a niveles tan altos de CO₂, situándolo entre uno de los microorganismos más tolerantes a este gas, junto con levaduras y por encima de hongos y de una amplia variedad de bacterias (Jones y Greenfield, 1982).

Para estos estudios, se determinó el PMP al final del cultivo (24 horas), obteniéndose un valor de 90,000 Daltones, muy parecido a los PMP encontrados en los cultivos donde se adicionó 8 y 13 % de CO₂. Con la finalidad de buscar una explicación al comportamiento

encontrado en relación a los PMP, se partió de la premisa de que, concentraciones superiores al 8 % de CO₂ inhiben la acción de enzimas depolimerizantes y por lo tanto se evita la caída de los PMP. Con la finalidad de esclarecer lo anterior, se determinó la actividad lítica del cultivo, la cual fue comparada con resultados previamente obtenidos en un cultivo realizado sin adición de CO₂ (3 % de TOD y 700 rpm). Después de incubar durante 4 horas el extracto enzimático (sobrenadante dializado, obtenido de muestras al final del cultivo) con alginato comercial de alta viscosidad, se procedió a determinar los cambios en la distribución de los pesos moleculares, durante un determinado tiempo de incubación, mediante cromatografía de permeación en gel.

En la **figura 5.13** se aprecia que no existe efecto alguno sobre el polímero al ser enfrentado con el extracto enzimático obtenido del cultivo con adición de 17 % de CO₂, al compararlo con la muestra control (polímero al que se le adicionó el extracto enzimático, e inmediatamente la muestra fue inactivada mediante la exposición a temperatura de ebullición por 5 minutos). Esto contrasta con lo que le sucede al alginato que se incuba con el extracto proveniente del cultivo testigo, donde 4 horas fueron suficientes para demostrar el efecto lítico de las enzimas presentes en el extracto, disminuyendo el PMP de 375,000 a 307,000 Daltones del alginato empleado.

Aún cuando estos resultados son preliminares, sugieren una alternativa que permitiría evitar la caída en los pesos moleculares del polímero a nivel de biorreactor. Esto sería mediante la inyección de CO₂ al caldo de cultivo, momentos antes de que las enzimas

responsables de la depolimerización del polímero sean liberadas por el microorganismo al caldo de cultivo. De esta manera se evitarían las disminuciones no deseables de los PMP. Además, si se confirma este efecto, se abre otra serie de interrogantes respecto a los mecanismos de acción de este gas sobre las enzimas líasas.

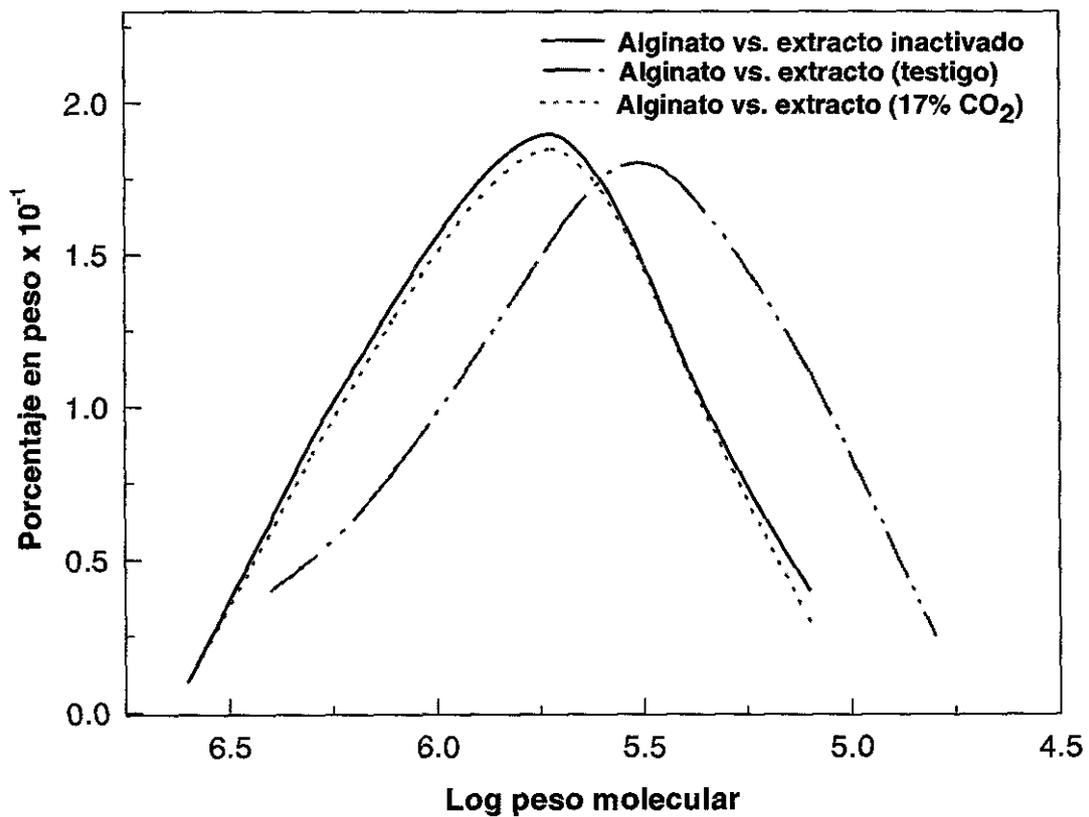


Figura 5.13. Distribución de los pesos moleculares del alginato comercial enfrentado con extracto enzimático de los cultivos testigo y con adición de CO₂ de 17 %.

5.6 Posibles mecanismos de acción del CO₂

Los valores empleados de CO₂ en la corriente de entrada de gases (8, 13 y 25 %) son superiores a los que en teoría se necesitarían para simular los niveles de CO₂ generados en cultivos realizados en matraces con *Saccharomyces cerevisiae* (Kato y Tanaka, 1998). También supera los valores de CO₂ disuelto que se encontrarían en la base de fermentadores de gran escala (7-12%), donde los altos niveles de CO₂ son resultado del metabolismo microbiano y la presión hidrostática en la base de un fermentador industrial (Onken y Liefke, 1989).

En la mayoría de los sistemas biológicos reportados se ha encontrado que niveles altos de CO₂ actúan principalmente sobre la membrana celular (Dixon y Kell, 1989; Kuriyama *et al.*, 1993) y causan inhibición del crecimiento microbiano. Esto es debido a interacciones del CO₂ con lípidos y proteínas en la membrana celular disminuyen la capacidad de la célula para incorporar iones y la fuente de carbono. Lo anterior se manifiesta por la disminución en el consumo de sustrato de los diferentes sistemas biológicos estudiados: *Bacillus subtilis* (Pirt y Mancini, 1975), *Penicillium chrysogenum* (Ho *et al.* 1987) y *Aspergillus niger* (McIntyre y McNeil, 1998).

Sin embargo, cuando se expone *Azotobacter vinelandii* a niveles de CO₂ del 4, 8 y 13 %, la bacteria consume casi toda la fuente de carbono, con velocidades de consumo de sacarosa muy semejantes. Esto hace pensar que el efecto del CO₂ sobre el microorganismo no se da nivel de los sistemas de incorporación de sustrato carbonado y

muy posiblemente no existe efecto alguno sobre las vías de incorporación de iones necesarios para el crecimiento y producción del polímero. Sin embargo, existe la posibilidad de que el CO₂ y los efectos anestéticos que este gas promueve, se manifiesten sobre los mecanismos encargados de la secreción del polímero.

Una posible explicación del efecto inhibitorio es que la difusión del CO₂ a través de la membrana cause alteración del pH intracelular y que dichos cambios en el pH sean suficientes para afectar el equilibrio enzimático interno (McIntyre y McNeil, 1998) y posiblemente la vía metabólica de la producción de alginato. Lo anterior se apoya en el hecho de que existen efectos en otros microorganismos a nivel del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), y no es difícil pensar que se tenga algún efecto sobre enzimas o pasos definitivos en la generación del polímero.

Jones y Greenfield (1982) demostraron que una gran cantidad de enzimas son inhibidas por CO₂. La fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31), enzima encargada de la descarboxilación del oxalacetato para formar fosfoenolpiruvato, sufre una reducción en la velocidad de la reacción, arriba de 30mM de CO₂ + HCO₃⁻. La piruvato-carboxilasa también es sensible a presiones parciales de CO₂ (posiblemente en la forma de HCO₃⁻). Estas reacciones están íntimamente ligadas a la producción de alginato, ya que la principal vía de formación de alginato es la de Entner-Doudoroff, seguida por la síntesis de fructosa 1,6-bifosfato a partir de dos moléculas de gliceraldehido-3-fosfato, vía

gluconeogénesis. Las enzimas anteriormente descritas juegan un papel importante en la síntesis de estos intermediarios.

Es difícil saber con claridad el mecanismo de acción del CO₂ en *Azotobacter vinelandii*. Sin embargo, una posibilidad, basándonos en los cambios observados en las características finales del producto (entre mayor adición de CO₂ mayor PMP) y tomando en cuenta que no existen grandes diferencias con respecto al crecimiento bacteriano, es posible que el CO₂ (con mecanismos aún por elucidar) actúe sobre las enzimas terminales de la síntesis del alginato (polimerasa, acetilasa, epimerasa o alginasas) y que esos cambios sean suficientes para detectar diferencias en las características del polímero sintetizado y en las productividades de los cultivos.

Mucho se sabe acerca de la fisicoquímica del CO₂ en sistemas líquidos. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios sobre las bases bioquímicas de los efectos producidos por el CO₂ disuelto en microorganismos, es muy difícil identificar claramente un mecanismo primario que pueda explicar los resultados reportados hasta el momento (McIntyre y McNeil, 1998).

Con las variables de respuesta que se midieron en este trabajo no es posible identificar con precisión el sitio o los sitios específicos donde actúa de manera inhibitoria el CO₂, tomando en cuenta que la red de reacciones dentro del microorganismo es amplia y

Capítulo VI

Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- ❖ Concentraciones de hasta 13 % de CO₂ en la entrada de los gases no afectaron el crecimiento del microorganismo, pero si afectaron la producción del alginato. La inhibición total de crecimiento se observó a 25% de CO₂.
- ❖ Las viscosidades obtenidas en biorreactor, durante los cultivos sometidos a diferentes niveles de CO₂ y aún en el cultivo testigo (sin adición de CO₂), en todos los casos fueron menores a 10 cps, siendo inferiores por dos órdenes de magnitud en comparación a las obtenidas en los cultivos realizados en matraces. Lo anterior descarta la posibilidad de que en matraces las viscosidades obtenidas sean determinadas importantemente por el CO₂ presente en el ambiente interno del matraz.
- ❖ En condiciones de adición de hasta 4 % de CO₂ en el gas influente, los pesos moleculares promedio al final del cultivo sufren una caída, probablemente debido a la acción de enzimas líticas. Por otra parte, en cultivos con adición de 8 y 13 % de CO₂ en el gas influente inhiben la caída de los pesos moleculares al término del cultivo. Esto sugiere que estos niveles de CO₂ son suficientes para inhibir la actividad y/o biosíntesis de las enzimas líticas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6.2 Recomendaciones para trabajos futuros

- ❖ Se necesitan realizar más investigaciones encaminadas a esclarecer los mecanismos de acción del CO₂ en *Azotobacter vinelandii*. Entre ellos está el confirmar si existe inactivación de las enzimas líticas mediada por el CO₂. Si así fuera, sería necesario establecer cuál es el nivel mínimo necesario de CO₂ en el gas influente del biorreactor para inactivar las enzimas líasas (con el objetivo de evitar la caída en los PMP), y si es posible inactivar estas enzimas al adicionar este gas en la parte final del cultivo.

Capítulo VII

Bibliografía

- Aguilar-Aguila, A., Valentinotti, S., Galindo, E. y Ramírez, O. T. (1993) Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de biorreactores. **Biotechnología**, **3**, 5, 130-139.
- Brivonese, A.C. and Sutherland, I.W. (1989) Polymer production by mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **39**, 97-102.
- Chen, S. and Gutmanis, F. (1976) Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. **Biotechnol. Bioeng.** **18**, 1455-1462.
- Clementi, F. (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Crit. Rev. Biotechnol.** **17**, 4, 327-361.
- Clementi, F., Fantozzi, P., Mancini, F. and Moresi, M. (1995) Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme Microb. Technol.** **17**, 983-988.
- Dahod, S. K. (1993) Dissolved carbon dioxide measurement and its correlation with operating parameter in fermentation processes. **Biotechnol. Prog.** **9**, 655-660.
- Dixon, N. M. and Kell, D. B. (1989) The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. **J. Appl. Bacteriol.** **67**, 109-136.
- Ertesvag, H., and Skjak-Braek, G. (1996) Genetic and biosynthesis of alginates. **Carbohydrates in Europe**, **14**, 100-104.
- Gacesa, P. (1998) Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. **Microbiology**, **144**, 1133-1143.
- Gandhi, A. P. and Kjaergaard, L. (1975) Effect of carbon dioxide on the formation of α -amilase by *Bacillus subtilis* growing in continuous and batch cultures, **Biotechnol. Bioeng.** **17**, 1109-1118.
- Geraats, S. M. G. (1994) Scaling-up of a lipase fermentation process: A practical approach. **Advances in Bioprocess Engineering**, Galindo, E. and Ramírez O. T. (Eds.) Kluwer Academic, The Netherlands, pp. 41-46.
- Gill, C. O. and Tan, K. H. (1979) Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*. **Appl. Environ. Microbiol.** **38**, (2), 237-240.

- Hansson, G. (1982) Methane production from glucose and fatty acids at 55-85°C: adaption of cultures and effects of pCO₂. **Biotechnol. Lett.** **4**, (12), 789-794.
- Ho, C. S. and Smith, M. D. (1986a) Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: mycelial growth and penicillin production. **Biotechnol. Bioeng.** **28**, 668-677.
- Ho, C. S. and Smith, M. D. (1986b) Morphological alterations of *Penicillium chrysogenum* caused by carbon dioxide. **J. Gen. Microbiol.** **132**, 3479-3484.
- Ho, C. S., Smith, M. D. and Shanahan, J. F. (1987) Carbon dioxide transfer in biochemical reactors. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** **35**, 83-125.
- Ishizaki, A., Shibai, H., Hirose, Y., and Shiro, T. (1971a) Studies on the ventilation in submerged fermentations. Part I. **Agr. Biol. Chem.** **35**, 1733-1740.
- Ishizaki, A., Shibai, H., Hirose, Y., and Shiro, T. (1971b) Studies on the ventilation in submerged fermentations. Part II, **Agr. Biol. Chem.** **35**, 1852-1859.
- Jarman, T. R., Deavin, L., Slocombe S. and Righelato R. (1978) Investigation of the effect environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. **J. Gen. Microbiol.** **107**, 59-64.
- Jarman, T. R. (1979) Bacterial alginate synthesis. En: **Microbial Polysaccharides and Polysaccharases**. Berkeley, R. C. W., Gooday, G. W. and Ellwood, D. C. (Eds.). Academic Press, London, pp. 35-49.
- Jones, R. P. and Greenfield, P. F. (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** **4**, 210-223.
- Ju, L. K. and Chase, G. G. (1992) Improved scale-up strategies of bioreactors. **Biopr. Eng.** **8**, 42-53.
- Ju, L., Ho, C. S. and Shanahan, J. (1991) Effect of carbon dioxide on rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. **Biotechnol. Bioeng.** **38**, 1223-1232.
- Kato, I. and Tanaka, H. (1998) Influence of CO₂ ventilation on microbial cultivation in shake-flasks. **Biotechnol. Techniques**, **12**, (4), 325-328.
- Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H., and Yoshinaga F. (1997) Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated cultures. **J. Ferment. Bioeng.** **84**, (2), 124-127.

- Kritzman, G., Chet, I. and Henis, Y. (1977) Effect of carbon dioxide on growth and carbohydrate metabolism in *Sclerotium rolfsii*. **J. Gen. Microbiol.** **100**, 167-175.
- Kuriyama, H., Mahakarnchanakul, W., Matsui, S. and Kobayashi, H. (1993) The effects of pCO₂ on yeast growth and metabolism under continuous fermentation. **Biotechnol. Lett.** **15**, (2), 189-194.
- Lacoursiere, A., Thompson, B. G., Kole, M. M., Ward, D. and Gerson, D. F. (1986) Effects of carbon dioxide concentration on anaerobic fermentations of *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **23**, 404-406.
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997a) Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth and citrate production in *Aspergillus niger* A60. **Enzyme Microb. Technol.** **20**, 135-142.
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997b) Effect of carbon dioxide effects on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* A60. **Enzyme Microb. Technol.** **21**, 479-483.
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997c) Effect of elevated dissolved CO₂ levels on batch and continuous cultures of *Aspergillus niger* A60: an evaluation of experimental methods. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**, 11, 4171-4177.
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1998) Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **50**, 291-298.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** **31**, 426-429.
- Miranda, L. (1998) Evaluación de cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* en la producción de alginato. **Tesis de Licenciatura**. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mori, H., Kobayashi, T. and Shimizu, S. (1983) Effect of carbon dioxide on growth of microorganisms in fed- batch cultures. **J. Ferment. Technol.** **61**, 2, 211-213.
- Onken, U. and Liefke, E. (1989) Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** **40**, 137-167.
- Peña, C. (1998) Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Doctorado**. Programa de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Peña, C., Campos, N. and Galindo, E. (1997) Changes in molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **48**, 510-515.
- Pirt, S. J. and Mancini, B. (1975) Inhibition of penicillin production by carbon dioxide. **J. Appl. Chem. Biotechnol.** **25**, 781-783.
- Pszczola, D. (1998) Discovering treasures of the deep. **Food Technol.** **52**, 4, 74-80.
- Rehm, B. H. A. and Valla, S. (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **48**, 281-288.
- Repaske, R. and Clayton, M. A. (1978) Control of *Escherichia coli* growth by CO₂. **J. Bacteriol.** **135**, (3), 1162-1164.
- Rocha, J.A. (1999) Efecto de la configuración impulsor-difusor sobre el cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum*. **Tesis de Maestría**, Programa de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Royce, P. N. (1992) Effect of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations. **Biotechnol. Bioeng.** **40**, 1129-1138.
- Royce, P. and Thornhill, N. F. (1991) Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. **AIChE J.** **39**, (11), 1680-1686.
- Sheldon, H. R. (1980) Membrane and cellular actions of anesthetic agents. **Federation Proc.** **39**, 1595-1599.
- Stryer, L. (1982) **Bioquímica**, Segunda Edición, Ed. Reverté S.A., España, p. 871.
- Trujillo, M., Peña, C. and Galindo, E. (1998) A model predicting the effects of non-ideal mixing in the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*, **AIChE Annual Meeting**, Miami, Florida, USA, Paper 188J.
- van Andel, J. G., Zoutberg, G., Crabbendam, P. and Brevre, M. (1985) Glucose fermentation by *Clostridium butyrium* grown a self generated gas atmosphere in chemostat culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **23**, 21-26.

Apéndice

A. Ejemplos de cálculos cinéticos y estequiométricos

Ejemplo A1.

Cálculo de la velocidad específica de crecimiento.

Partiendo de la ecuación: $\ln X = \ln X_0 + \mu t$, se gráfica t contra $\ln X$, y la pendiente obtenida corresponde a μ , datos:

tiempo	X	$\ln X$
7	0.45	-0.7985
9	1.185	0.1655
11	1.595	0.4637
13	2.430	0.8800
15	3.175	1.1500
17	3.350	1.2000

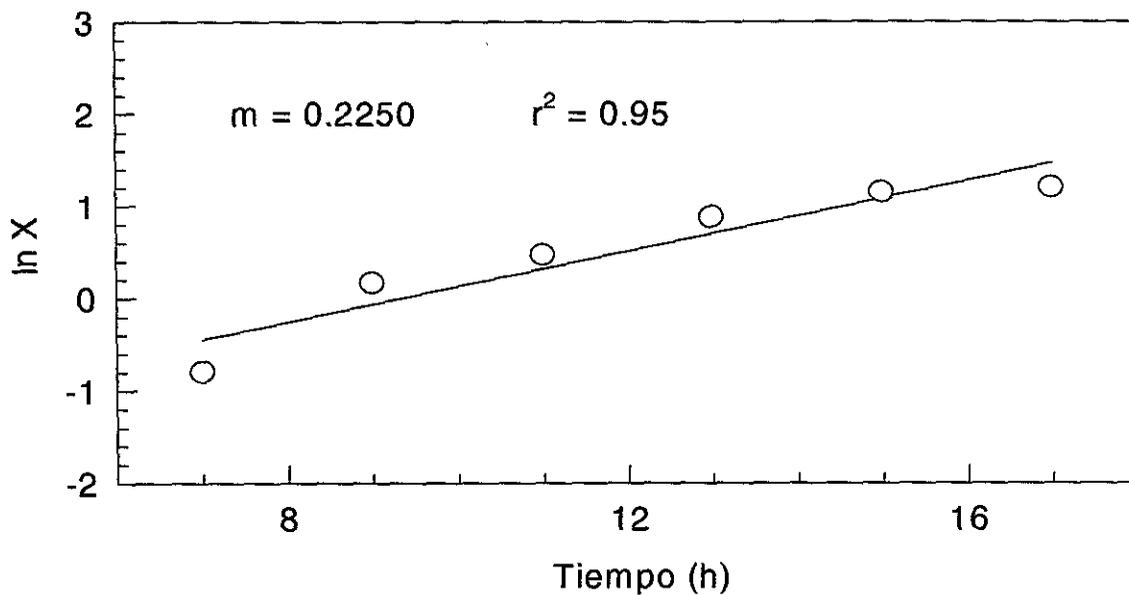


Figura A1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento.

Ejemplo A2.

Cálculo del rendimiento de biomasa en base a sacarosa ($Y_{x/s}$), para el cultivo testigo.

$$Y_{x/s} = 3.34 \text{ g biomasa} / 18 \text{ g sacarosa (consumida)} = 0.1855$$

Ejemplo A3.

Cálculo del rendimiento de producto en base a sacarosa ($Y_{p/s}$), para el cultivo testigo.

$$Y_{p/s} = 4.62 \text{ g producto} / 18 \text{ g sacarosa (consumida)} = 0.2566$$

Ejemplo A4.

Cálculo de la producción específica ($(dp/dt)/dx$), para el cultivo testigo.

$$dp = \text{Producto Final} - \text{Producto Inicial} = 4.62 - 0.25 = 4.37 \text{ g}$$

$$dt = \text{Tiempo Final} - \text{Tiempo Inicial} = 17 - 5 = 12 \text{ h}$$

$$dx = \text{Biomasa Final} - \text{Biomasa Inicial} = 3.34 - 0.3 = 3.04 \text{ g}$$

$$(dp/dt)/dx = 0.3641 / 3.04 = 0.11979 \text{ g alginato h}^{-1}/\text{g biomasa}$$

Ejemplo A5.

Cálculo del consumo específico ($(ds/dt)/dx$), para el cultivo control.

$$ds = \text{Sacarosa consumida Final} - \text{Sacarosa consumida Inicial} = 18 - 2.29 = 15.71 \text{ g}$$

$$(ds/dt)/dx = 15.71/12 = 1.3091 \text{ g sacarosa h}^{-1}/\text{g biomasa}$$

B. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato, consumo de sacarosa y evolución del CO₂ de los cultivos realizados.

En las siguientes páginas se presentan las cinéticas de fermentación, así como la evolución del CO₂ para los cultivos desarrollados a diferentes concentraciones de adición de CO₂ en el gas influente (0, 4, 8, 13 y 25 %). Cada repetición se identifica con la letra A o B.

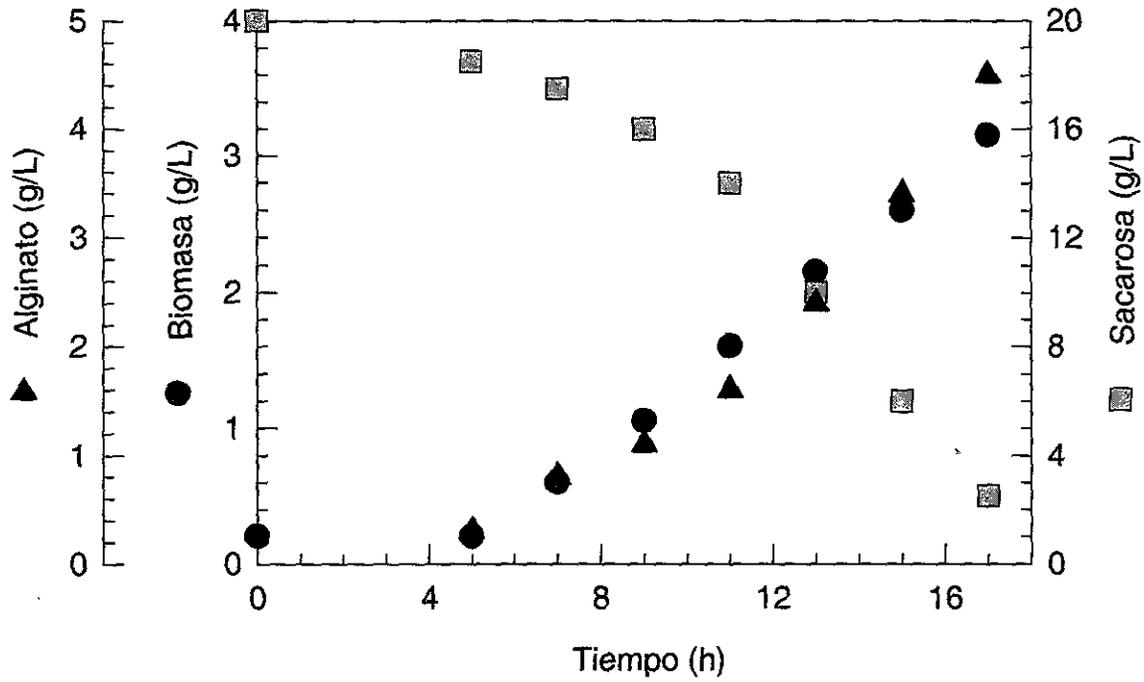


Figura A2. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo control A.

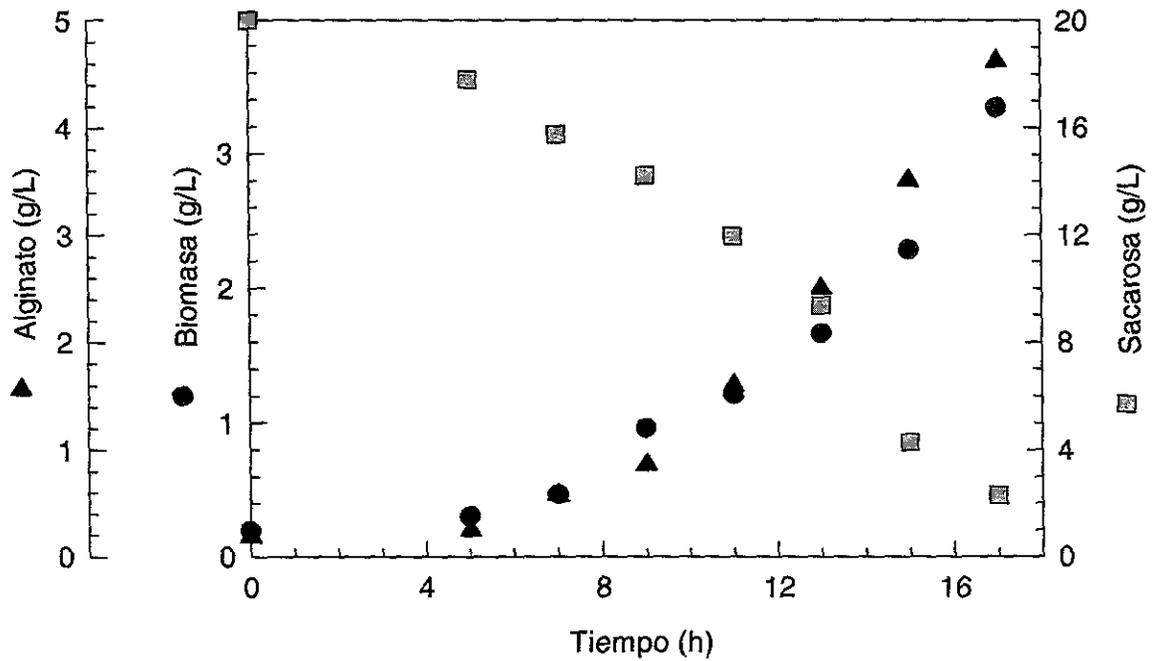


Figura A3. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo control B.

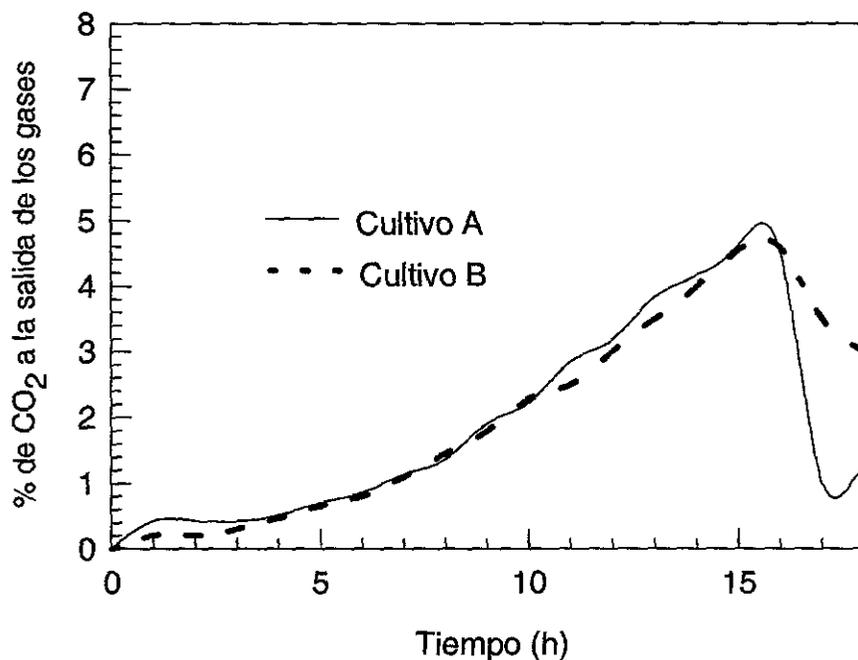


Figura A4. CO₂ a la salida del fermentador para los cultivos control.

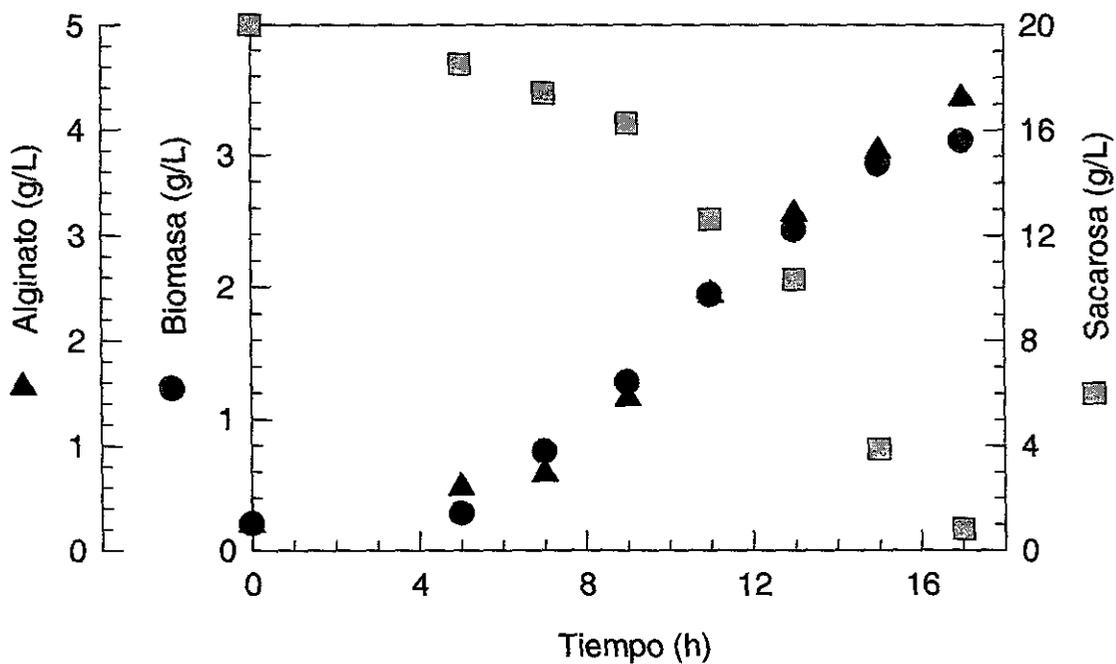


Figura A5. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 4% de CO₂ en el gas influente (A).

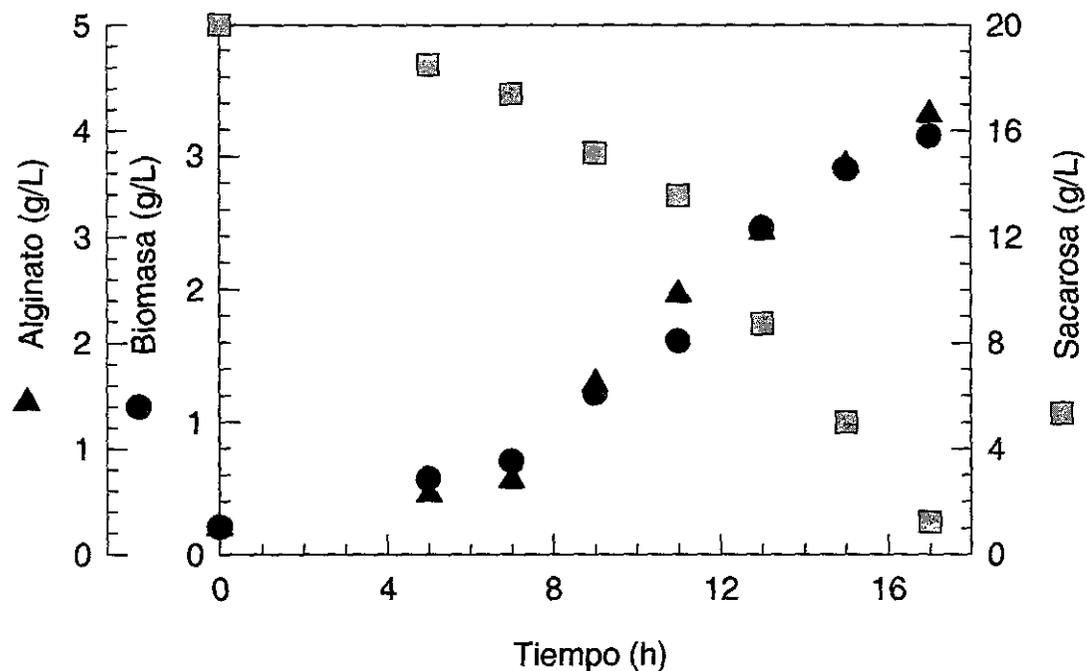


Figura A6. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 4% de CO₂ en el gas influente (B).

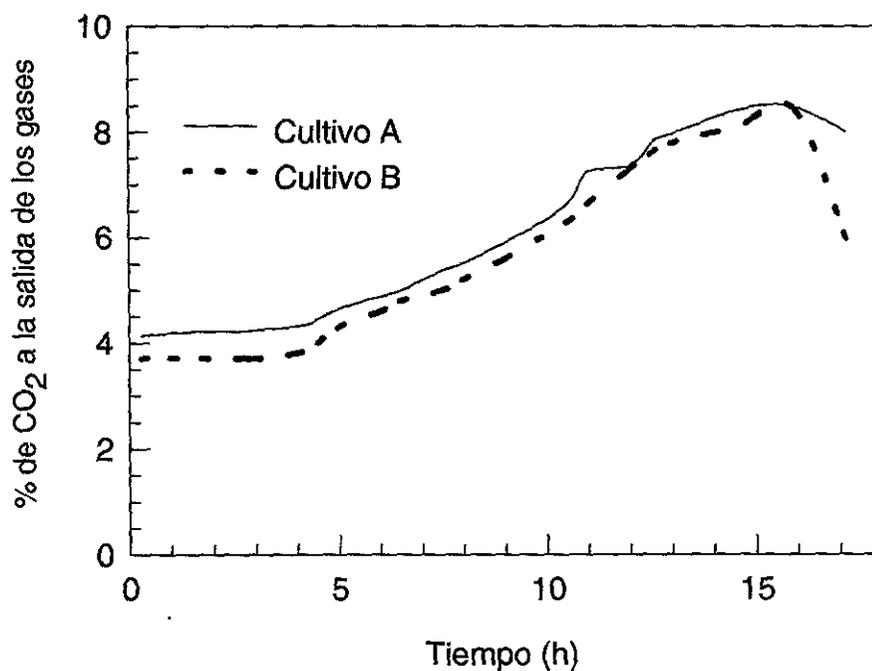


Figura A.7. CO₂ a la salida del fermentador para los cultivos donde se adiciona 4 % de CO₂ en el gas influente.

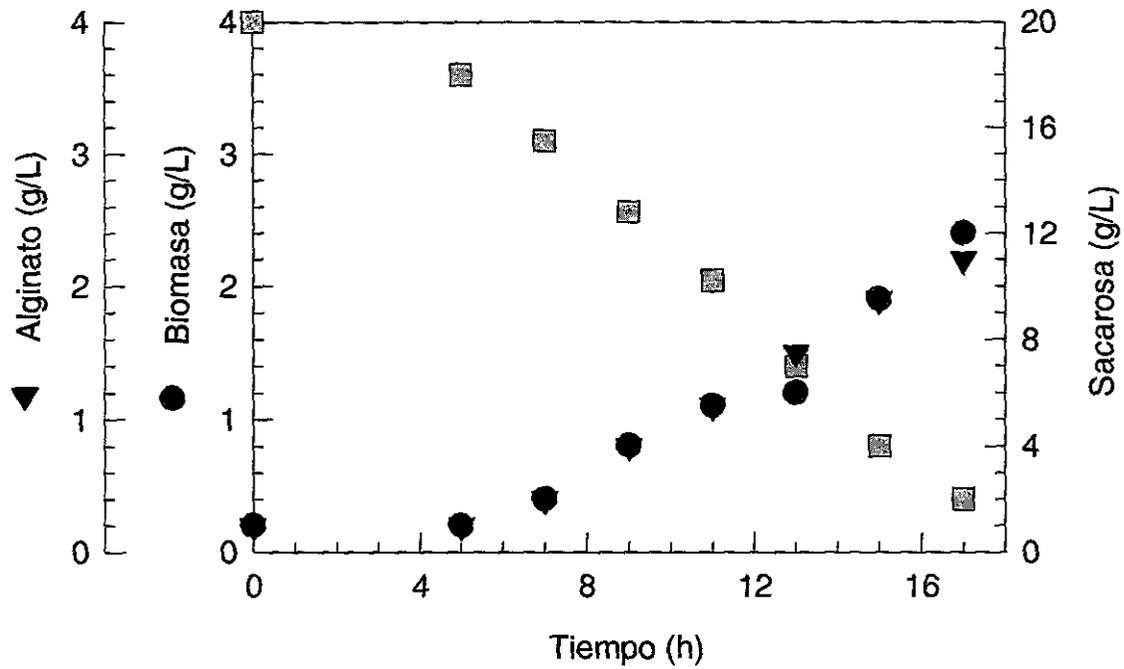


Figura A8. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 8 % de CO₂ en el gas influente (A).

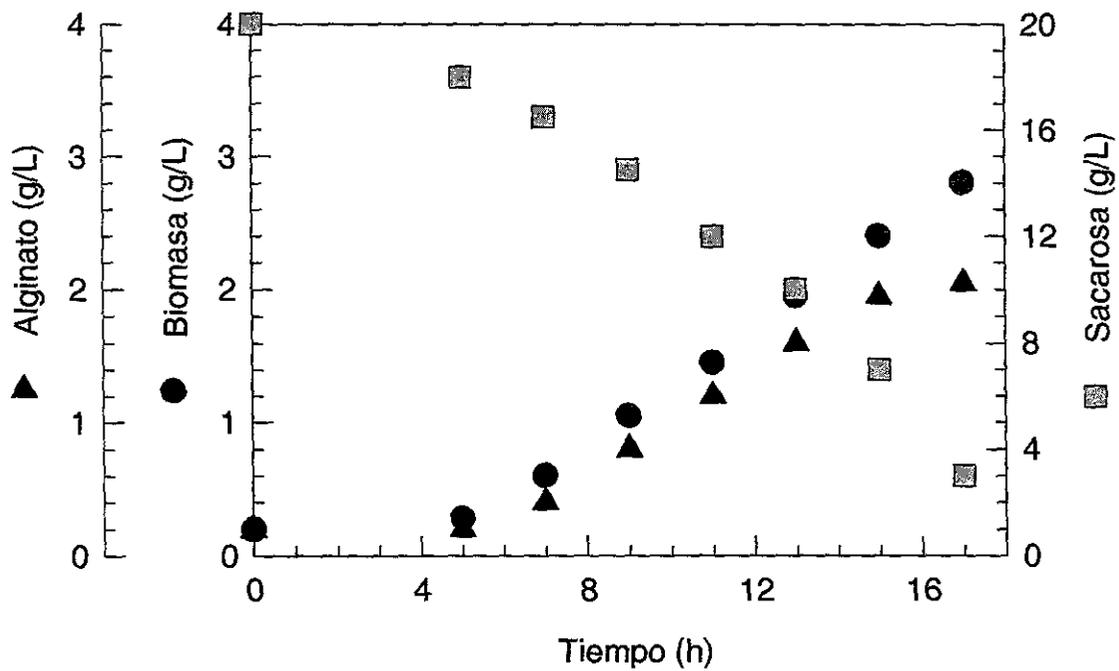


Figura A9. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 8 % de CO₂ en el gas influente (B).

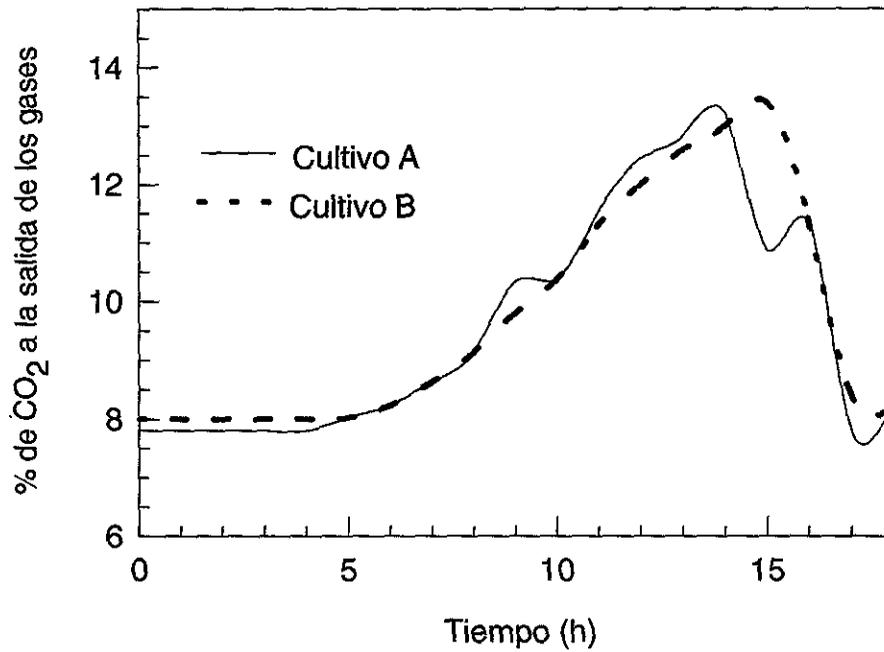


Figura A.10. CO₂ a la salida del fermentador para los cultivos donde se adiciona 4 % de CO₂ en el gas influente.

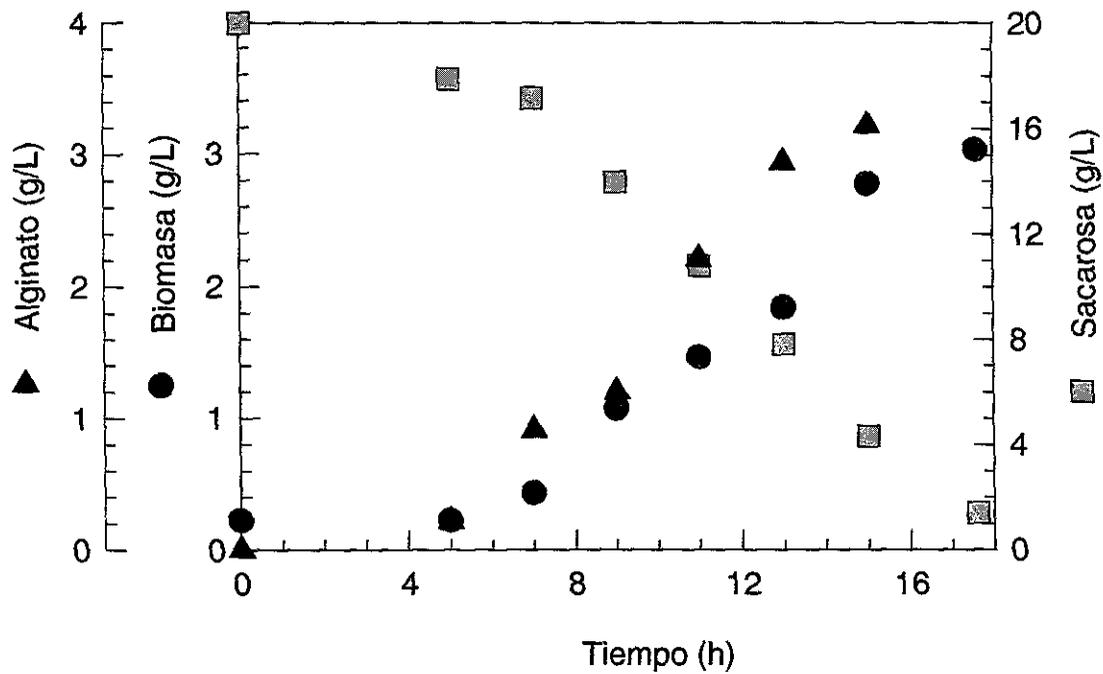


Figura A.11. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 13 % de CO₂ en el gas influente (A).

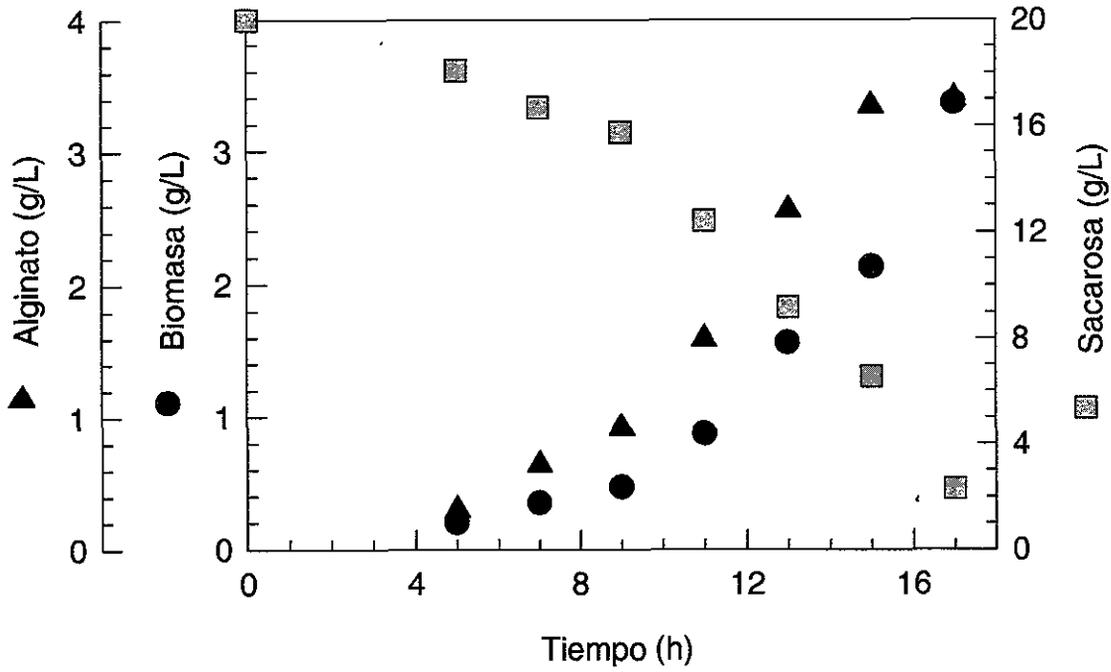


Figura A12. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 13 % de CO₂ en el gas influente (B).

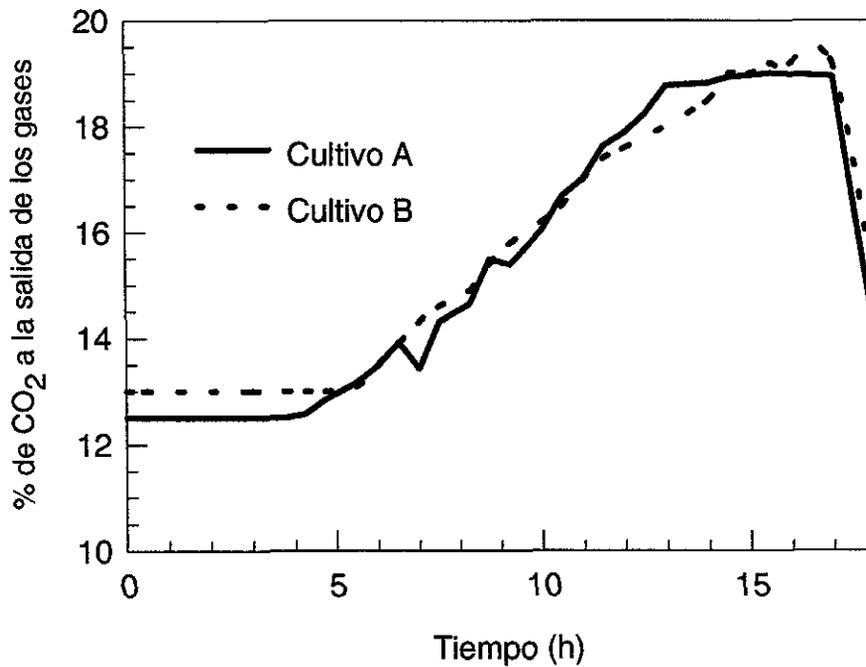


Figura A13. CO₂ a la salida del fermentador para los cultivos donde se adiciona 13 % de CO₂ en el gas influente.

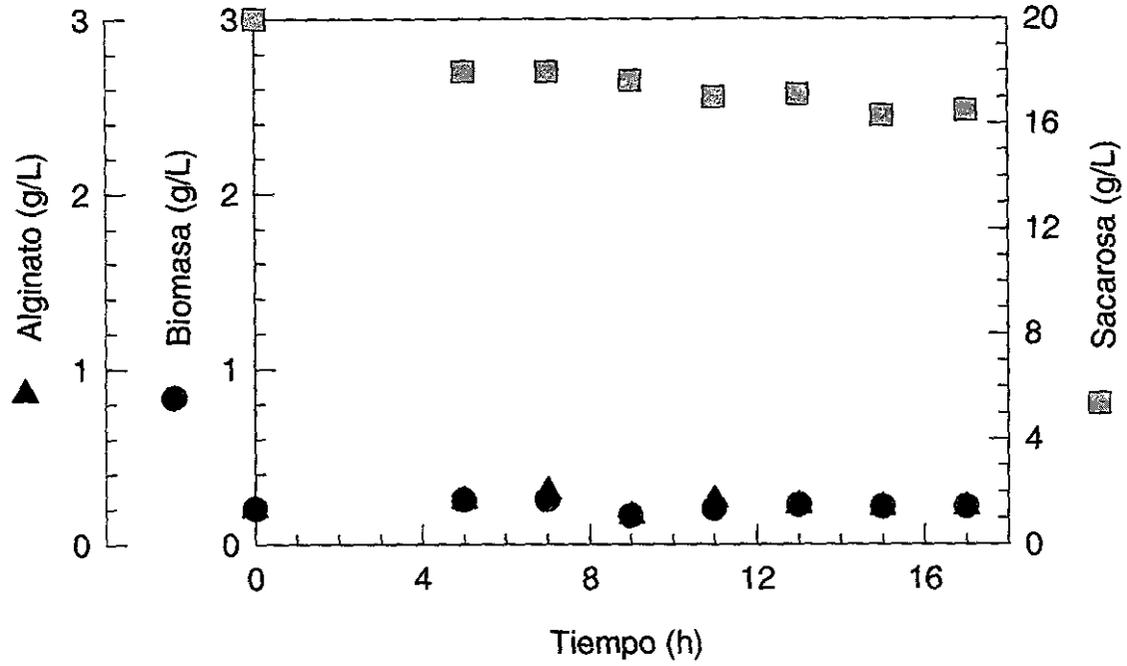


Figura A14. Cinética de crecimiento, producción de aginato y consumo de sacarosa en cultivo adicionando 25 % de CO₂ en el gas influente.