



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO EN CULTIVOS
MULTIETAPAS Y EN LOTE ALIMENTADO USANDO CEPAS
MUTANTES DE *Azotobacter vinelandii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ANDRÉS GARCÍA ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS F. PEÑA MALACARA, IBT UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

DR. DANIEL G. SEGURA GONZÁLEZ, IBT UNAM Y DR. MAURICIO A.
TRUJILLO ROLDÁN, IIB UNAM

CUERNAVACA, MORELOS, Mayo, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Peña Malacara, en el grupo del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización del mismo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 253834. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto PAPIIT-UNAM IN-100503.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre **Andrés García Jiménez**, gracias por apoyarme incondicionalmente para poder alcanzar mi sueño, por los valores, el impulso y por toda la confianza que tuviste en mí, siempre te llevaré en mi corazón.

A mi madre **María Guadalupe Romero**, gracias por haberme guiado en cada etapa de mi vida, por escucharme siempre y por el apoyo brindado en todo momento para seguir alcanzando mis metas.

Al amor de mi vida **Angélica Medina**, por compartir esta experiencia a mi lado, por su paciencia, amor, cariño, alegría y por ser mi luz en todo momento.

A mi hermana **Cinthia Yazmín**, por formar siempre parte de mi vida, en especial con mucho amor y cariño a mis sobrinitos **Kaleb Fernando y Jazmín** por habernos llenado de felicidad.

A mi cuñado **Fernando Alonso**, por todo el apoyo brindado a mi familia durante los momentos más difíciles.

Este logro es para todos ustedes, los amo de todo corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos F. Peña, mi más sincero agradecimiento por haber confiado en mí desde un principio, por su ayuda, paciencia, consejos e interés en el proyecto. Gracias por haber sido un excelente tutor y apoyarme en todo momento. Estoy infinitamente agradecido.

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por haberme permitido trabajar en su grupo de investigación y por sus valiosas sugerencias durante el proyecto.

Al Dr. Daniel Segura, por sus asesorías, comentarios y sugerencias tan importantes durante el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Celia Flores, gracias por ser una excelente amiga, por todos esos momentos compartidos, por el apoyo incondicional, por la confianza y consejos, pero sobre todo por estar ahí en cualquier momento.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus comentarios y sugerencias durante la realización del proyecto.

Dr. Carlos F. Peña Malacara

Dr. Daniel G. Segura González

Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán

A los miembros del jurado, por sus valiosas observaciones y sugerencias en el manuscrito.

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Marcela Ayala Aceves

Dr. Laura Alicia Palomares Aguilar

Dr. Ángel Romo Uribe

Al Dr. Leobardo Serrano, por sus consejos y sugerencias durante el proyecto, por haberme permitido utilizar la bomba para una parte importante en este trabajo.

A la M en C. Tania Catillo, por su valiosa amistad, por los momentos compartidos, por sus consejos, sugerencias y discusión en gran parte del trabajo.

Al Ing. Modesto Millán Ponce, por su amistad, compañerismo, por las sugerencias en el trabajo y los momentos compartidos.

A Don Antonio Dorante López, por su atención siempre amable, sonriente y muy eficiente. Gracias Don Toño.

A mis amigos de la Maestría, por todos los momentos compartidos, Arlen, Martín, Jorge, Miguel Atl, Karina, Grecia e Irene.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 10, por hacer mi estancia en el laboratorio amena y divertida, en particular a Wendy, Alehli, Diana, Anita, Florencio, Miseli, Karen, Erika, Liz, Melissa y Silvia.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
NOMENCLATURA	xii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Polihidroxicarboxilatos: aspectos generales	5
3.2 Aplicaciones del PHB	6
3.3 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	9
3.3.1 Biosíntesis y regulación de PHB en <i>A. vinelandii</i>	9
3.4 Síntesis de PHB y generación de cepas de <i>A. vinelandii</i> modificadas genéticamente para incrementar su producción	12
3.5 Parámetros que afectan la producción de PHB en <i>A. vinelandii</i>	14
3.6 Composición del medio de cultivo	16
3.7 Producción de PHB a nivel reactor agitado	17
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21

7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Materiales	23
7.1.1 Cepas	23
7.1.2 Medios de cultivo	23
7.2 Cultivos en matraces agitados	24
7.3 Cultivos en biorreactor de 3.0 L	24
7.3.1 Cultivos en lote	24
7.3.2 Cultivos exponencialmente alimentados	25
7.3.3 Perfiles de alimentación exponencial	26
7.3.4 Cultivos alimentados con pulsos	27
7.4 Desarrollo de los cultivos	27
7.5 Métodos analíticos	28
7.5.1 Determinación de la biomasa por peso seco	29
7.5.2 Determinación de la biomasa por turbidimetría	29
7.5.3 Cuantificación de la proteína	29
7.5.4 Cuantificación de sacarosa por el método de β - fructofuranosidasa- DNS	29 30
7.5.5 Cuantificación de PHB	30
7.6 Desarrollo de modelos matemáticos	32
7.6.1 Aspectos cinéticos	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
8.1 Cultivos a nivel matraz con diferentes medios de cultivo	35
8.2 Influencia de la TOD sobre el crecimiento y la producción de PHB	40
8.3 Cultivos en lote a 4 % de TOD con la cepa OPNA	51
8.4 Cultivos alimentados exponencialmente con la cepa OPNA	55
8.5 Cultivos alimentados con pulsos	60
9. CONCLUSIONES	70
10. PERSPECTIVAS	71
11. REFERENCIAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1	Estructura química de los PHA's más comunes. 5
Figura 3.2	Ruta de biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> . 10
Figura 3.3	Organización del operón <i>phbBAC</i> en <i>A. vinelandii</i> . 11
Figura 3.4	Sistemas de regulación del PHB en <i>A. vinelandii</i> . 12
Figura 6.1	Estrategia experimental desarrollada para el estudio del crecimiento y producción de PHB en cepas de <i>A. vinelandii</i> productoras de PHB. 22
Figura 7.1	Descripción del biorreactor <i>Applikon</i> que se utilizó en el presente trabajo. 25
Figura 7.2	Curva patrón para la cuantificación de proteína. 30
Figura 7.3	Curva patrón para la cuantificación de sacarosa. 31
Figura 7.4	Curva patrón para la cuantificación de PHB. 32
Figura 8.1	Cinéticas de crecimiento celular (con base en proteína) en cultivos en matraz con las cepas OP y OPNA de <i>A. vinelandii</i> en medio BS y PY. 36
Figura 8.2	Consumo de sustrato en cultivos en matraz con las cepas OP y OPNA de <i>A. vinelandii</i> en medio BS y PY. 37
Figura 8.3	Concentración de PHB a las 36 h de cultivo con las cepas OP y OPNA de <i>A. vinelandii</i> en medio BS y PY. 38
Figura 8.4	Cinéticas de crecimiento celular en peso seco (a), proteína (b) y consumo de sacarosa (c), en cultivos en lote con la cepa OP de <i>A. vinelandii</i> bajo diferentes TOD's. 41
Figura 8.5	Porcentaje de PHB en cultivos en lote con las cepas <i>A. vinelandii</i> OP y ATCC9046, bajo diferentes TOD's. Datos tomados de Castillo <i>et al</i> , (2012). 43
Figura 8.6	Producción volumétrica de PHB en cultivos en lote con la cepa <i>A. vinelandii</i> OP, bajo diferentes TOD's. 44

Figura 8.7	Perfiles de TOD (a), Flujo de O ₂ y N ₂ (b) y control de pH (c) en cultivos en lote desarrollados con la cepa <i>A. vinelandii</i> OP bajo diferentes TOD's.	46
Figura 8.8	Influencia de la TOD sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno en cultivos con las cepas <i>A. vinelandii</i> OP y ATCC9046 (Flores, 2012).	48
Figura 8.9	Parámetros obtenidos a partir de los cultivos desarrollados con la cepa <i>A. vinelandii</i> OP bajo diferentes TOD (4, 8 y 15%).	49
Figura 8.10	Cinética de crecimiento celular con base en proteína (a), biomasa (b) y consumo de sustrato (c), en cultivos a 4 % de TOD, con la cepa <i>A. vinelandii</i> OP y OPNA.	51
Figura 8.11	Producción volumétrica y porcentaje de PHB en cultivos en lote con la cepa <i>A. vinelandii</i> OP y OPNA, a 4 % de TOD.	52
Figura 8.12	Control de oxígeno (a), Apertura de la válvula de oxígeno (b), control de pH (c), cinética de crecimiento celular con base en proteína (d), peso seco (e) y consumo de sustrato (f), en cultivos alimentados a 4 % de TOD con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	54
Figura 8.13	Producción de PHB en cultivo lote alimentado con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA, a 4 % de TOD.	55
Figura 8.14	Cinética de crecimiento celular con base en proteína (a), peso seco (b) y consumo de sustrato (c), en el primero (F1) y segundo (F2) cultivos alimentados a 4 % de TOD, con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	57
Figura 8.15	Producción de PHB en el primero (F1) y segundo (F2) cultivo alimentado con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA, a 4 % de TOD.	59
Figura 8.16	Cinéticas de crecimiento celular con base en proteína (a), peso seco (b), producción de PHB (c) y consumo de sacarosa (d), en los cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD, con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA con pulsos de 10 y 15 g/L de sacarosa. Con flechas se señala el momento en que se realizaron los pulsos.	61
Figura 8.17	Cinéticas de crecimiento celular con base en proteína (a), peso seco (b), producción de PHB (c) y consumo de sacarosa (d), con una concentración inicial de 20 y 40 g/L de extracto de levadura y sacarosa respectivamente, en cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD, con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA. Con flechas se señala el momento en que se realizaron los pulsos.	63

Figura 8.18	Rendimiento de PHB con base en sustrato en cada una de las etapas de los cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD (Cultivos A y B), con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	64
Figura 8.19	Producción y porcentaje de acumulación de PHB (a) y proteína (b), en los cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD (Cultivos A y B), con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	65
Figura 8.20	Correlación de la velocidad específica de crecimiento y rendimiento mg PHB/mg proteína, en cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD (Cultivos A y B), con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	65
Figura 8.21	Producción (a) y productividad de PHB (b) calculada en cada una de las etapas de los sistemas de cultivos (cultivos A y B).	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Cuantificación de proteína y PHB en cepas mutantes de <i>A. vinelandii</i> , en cultivos en matraz con medio BS.	14
Tabla 7.1	Composición del medio Burk-sucrose (BS)	24
Tabla 7.2	Composición del medio peptone-yeast extract (PY)	24
Tabla 8.1	Parámetros obtenidos a partir de los cultivos realizados en matraz con las cepas OP y OPNA de <i>A. vinelandii</i> en medio BS y PY.	39
Tabla 8.2	Resumen de la producción de PHB por diferentes bacterias.	68

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado	Unidades
°C	Grado Celsius	---
ATCC	American Type Culture Collection	---
BS	Medio Burk-sucrose	---
g	Gramo	---
h	Hora	---
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	(s^{-1} , h^{-1})
L	Litro	---
ml	Mililitro	---
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico	---
O ₂	Oxígeno gaseoso a la entrada del biorreactor	---
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno	(mmol O ₂ /L h)
PHB	Poli-β-hidroxi butirato	---
PHA	Polihidroxi alcanoatos	---
PM	Peso molecular	(kDa)
qsac	Velocidad específica de consumo de sacarosa	(gsac/gproteína h)
qO ₂	Velocidad específica de consumo de oxígeno	(mmol O ₂ /gproteína h)
rpm	Revoluciones por minuto	(min ⁻¹)

RQ	Coeficiente respirométrico	(mmolCO ₂ / mmolO ₂)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	(%)
V _L	Volumen de trabajo	(L)
vvm	Volumen de gas por volumen de medio por minuto	(L _{gas} /L _{liquido} min)
Y x/s	Rendimiento de biomasa en base a sacarosa	(g _{biom} /g _{sac})
Y p/x	Rendimiento de producto en base a sacarosa	(g _{PHB} /g _{sac})
Y p/x	Rendimiento de producto en base a biomasa	(g _{PHB} /g _{biom})
α	Constante de Luedeking-Piret asociada al crecimiento	(g _{PHB} /g _{biom})
β	Constante de Luedeking-Piret no asociada al crecimiento	(g _{PHB} /g _{biom} h)
μ	Velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)

1. RESUMEN

Debido a que el poli- β -hidroxibutirato (PHB) es un material biocompatible y biodegradable, se ha buscado la manera de introducirlo en el mercado de los plásticos industriales de gran demanda. Sin embargo, la producción del polímero en *Azotobacter vinelandii* es pobre en comparación con otras bacterias (Díaz-Barrera *et al.*, 2007). Por ello, en el presente trabajo se buscó maximizar la producción del polímero mediante el uso cepas mutantes de *A. vinelandii* capaces de incrementar la producción de PHB, asimismo se implementaron estrategias de fermentación para aumentar la producción del polímero.

Diversos estudios han permitido identificar cómo se regula la síntesis del PHB en *A. vinelandii* (Segura *et al.*, 2003). Se sabe que las proteínas IIA-Ntr y RsmA actúan como reguladores negativos; la inactivación de los genes que codifican para estas proteínas resultó en la cepa OPNA que acumula grandes cantidades de PHB cuando se crece en placas o en matraces (Ramírez, 2011). Uno de los parámetros críticos para la producción de PHB es la producción de biomasa y ésta, al igual que la acumulación del polímero, depende de la tensión de oxígeno disuelto (TOD). Se sabe que en condiciones limitantes de oxígeno, la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 acumula altas concentraciones de PHB; en contraste, si la TOD es mayor al 5 % existe un mayor crecimiento celular (Galindo *et al.*, 2007). Por otro lado, es importante destacar que las estrategias de cultivo celular en sistemas multietapas y/o cultivos en lote alimentado son herramientas útiles que permiten optimizar el crecimiento celular y la producción de metabolitos intracelulares como el PHB. Por ello, en el presente trabajo se propuso trabajar con la cepa OPNA donde se implementó una estrategia de cultivo en lote alimentado para incrementar la producción volumétrica de biomasa y PHB.

El trabajo se dividió en tres etapas. En la primera etapa, se realizaron cultivos en matraz con la cepa control OP (mutante espontánea que tiene interrumpido el gen *algU*, el cual codifica para un el factor σE que está implicado en la síntesis de alginato, por lo tanto está cepa sólo produce PHB) y su derivada la cepa OPNA, en diferentes medios de cultivo (BS y PY). En la segunda etapa del proceso se desarrollaron cultivos en lote con la cepa OP a diferentes TOD's (4, 8 y 15 %). Finalmente, en la tercera etapa del proceso se realizaron cultivos exponencialmente alimentados con la cepa OPNA y realizando una alimentación intermitente de sacarosa y extracto de levadura.

Se observó que a nivel matraz los componentes presentes en el medio PY mejoraron sensiblemente el rendimiento de biomasa y PHB en las cepas OP y OPNA. En cuanto a los cultivos en lote a 4 % de TOD, la bacteria canalizó la fuente de carbono hacia un mayor crecimiento y producción de PHB con un rendimiento de $0.31 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$. Por otro lado, en los cultivos exponencialmente alimentados con la cepa OPNA se incrementó al triple la producción volumétrica de biomasa y al doble la producción de PHB en relación con los cultivos en lote. Posterior a la etapa de la alimentación exponencial de los cultivos, la producción de PHB incrementó 9 veces (30 g/L) a las 60 h de cultivo al adicionar pulsos de sacarosa y extracto de levadura. A través del desarrollo del presente trabajo se estableció un proceso de fermentación, basado en el control de la TOD y en un sistema de cultivo lote alimentado con pulsos para incrementar la producción de PHB. Asimismo, se encontró la importancia de utilizar cepas mutantes de *A. vinelandii* con capacidades mejoradas para la producción de PHB.

2. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres naturales producidos por diversas bacterias y arqueas como material de reserva de nutrientes y energía (Kung *et al.*, 2007). Estos biopolímeros tienen un gran potencial industrial, pues tienen propiedades termoplásticas similares a las de plásticos y elastómeros sintéticos derivados del petróleo, con la ventaja de ser completamente biodegradables, biocompatibles y de producirse a partir de recursos renovables (Lee, 1994; Steinbüchel, 2003). Por esta razón, algunos PHAs ya son producidos a escala industrial para la fabricación de plásticos biodegradables (Aldor y Keasling, 2003). Asimismo, los PHAs se comienzan a utilizar en productos con aplicaciones médicas, como prótesis y dispositivos para ingeniería de tejidos (Zinn *et al.*, 2001).

Existen bacterias que llegan acumular hasta el 90 % de PHA en base a su peso seco. Entre estas bacterias destaca *Azotobacter vinelandii*, la cual sintetiza poli-β-hidroxibutirato (PHB), un PHA compuesto por unidades de hidroxibutirato. *A. vinelandii* presenta características interesantes para la producción de PHB, como su capacidad para crecer en gran variedad de sustratos (Page, 1992; Page y Cornish, 1993; Chen y Page 1997). Actualmente ya se conocen los genes que codifican para las tres enzimas que participan en la biosíntesis de PHB (*phbBAC*). Recientemente se han identificado los genes cuyos productos regulan de manera positiva o negativa, la producción de PHB. Dentro de los sistemas reguladores negativos más importantes, se encuentran los sistemas PTS^{Ntr} y RsmA/RsmZY (Noguéz *et al.*, 2006; Hernández-Eligio *et al.*, 2012). La inactivación de los genes que codifican para estas proteínas dio como resultado la generación de la cepa OPNA, la cual acumula grandes cantidades de PHB cuando se crece en placas o en matraces (Ramírez, 2011). Por otro lado, se sabe que uno de los parámetros críticos en la producción del PHB es la producción de biomasa y esta, al igual que la acumulación del polímero, depende de la tensión de oxígeno disuelto (TOD).

Por ejemplo, cuando se crece la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 en condiciones limitantes de oxígeno acumula altas concentraciones de PHB; en contraste, si la TOD es mayor al 5 % existe un mayor crecimiento celular (Galindo *et al.*, 2007). Por otro lado, es importante señalar que las estrategias de cultivo celular en sistemas en multietapas y/o cultivos en lote alimentado resultan adecuadas para la optimización del crecimiento celular y la producción de metabolitos intracelulares como el PHB (Ramírez *et al.*, 1994). Con base en lo anterior en el presente trabajo se propuso trabajar con la cepa OPNA, con la que se implementó una estrategia de cultivo en lote alimentado para incrementar la producción volumétrica de biomasa y PHB.

3. ANTECEDENTES

3.1 Polihidroxicanoatos: aspectos generales

Los polihidroxicanoatos (PHA's) son polímeros naturales producidos por bacterias. Son poliésteres conformados por unidades o monómeros de hidroxiacilos polimerizados en forma lineal. Estos biopolímeros tienen un gran potencial industrial, pues tienen propiedades termoplásticas similares a los plásticos y elastómeros derivados del petróleo. Las bacterias que los producen los utilizan como reserva de energía y nutrientes (Kung *et al.*, 2007). Una de las características de estos polímeros es que son biodegradables, es por ello que se utilizan en la producción de plásticos. Estos polímeros presentan propiedades que van desde plásticos rígidos y quebradizos, hasta los semejantes al hule; además, presentan la ventaja de ser producidos a partir de recursos renovables (Sudesh *et al.*, 2000). Dentro de los PHA's se encuentran grupos de familias que pueden estar conformadas por unidades de 2-, 3-, 4-, 5- o 6-hidroxiacilos (Kessler y Witholt, 2001). En estos polímeros, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del siguiente monómero (figura 3.1).

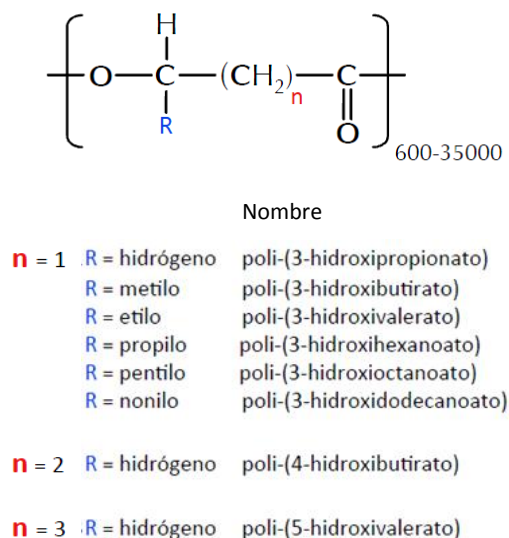


Figura 3.1 Estructura química de los PHA's más comunes (Khanna y Srivastava, 2004).

La diversidad de los PHA's se da principalmente por variaciones en la longitud del alquilo de los monómeros, en las proporciones de los distintos monómeros y por la incorporación de monómeros con otros grupos sustituyentes. Así, los PHA's pueden formar homopolímeros ó copolímeros con dos o más tipos de monómeros. Dependiendo del número de átomos de carbono en la cadena, los PHA's se pueden dividir en: cadenas de longitud corta (PHA_{SCL}), que consisten de 3 a 5 carbonos; cadenas de longitud media (PHA_{MCL}), que consisten de 6 a 14 carbonos, y finalmente los de cadena larga con monómeros de más de 14 carbonos (PHA_{LCL}) (Grage *et al.*, 2009). En este contexto, la naturaleza química de los monómeros, su peso molecular, así como la estructura que presentan determinan las características físicas del polímero y consecuentemente su aplicación en los diferentes sectores industriales (Steinbüchel, 2003).

El poli-β-hidroxibutirato (PHB) fue el primer poliéster descrito y actualmente es el que se encuentra mejor caracterizado. Este polímero está constituido por unidades de 3-hidroxibutirato (figura 3.1). En cuanto a sus propiedades físicas, el PHB tiene la facilidad de formar sólidos que al cristalizarse forman largas estructuras que le dan propiedades mecánicas para el moldeo de plásticos y películas (Kansiz *et al.*, 2007).

Cabe señalar que las especies de microorganismos capaces de sintetizar y degradar PHB son diversas. Actualmente existen más de 300 bacterias productoras de PHB. Sin embargo, sólo algunas se han usado para producirlos. Entre estas destacan *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans* y *Azotobacter vinelandii* (Choi y Lee, 1999). Estas bacterias pueden acumular hasta el 90 % de su peso seco en PHB. En general, en las bacterias productoras de PHB se presenta la acumulación del polímero en respuesta a una limitación de su crecimiento, principalmente por la falta de algún nutriente como: nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno y en presencia de un exceso de fuente de carbono y energía (Anderson y Dawes, 1990). Los gránulos de PHB se alojan en el citoplasma como polímeros líquidos, móviles y amorfos, los cuales están rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y depolimerasas. Por otro lado, se sabe que

existen restricciones físicas que impiden a la célula acumular más polímero a pesar de la disponibilidad de sustrato y la actividad de la enzima PHA depolimerasa (Wang y Lee, 1997).

3.2 Aplicaciones del PHB

La mayor parte de las investigaciones sobre PHB se han hecho con la intención de introducirlos en el mercado de los plásticos industriales de gran demanda. Lo anterior debido a que el PHB, además de ser biodegradable y renovable, tiene características adicionales que lo hacen interesante. No causan efectos tóxicos, son biocompatibles, permitiendo utilizarlos en la producción de materiales para aplicaciones médicas, como el encapsulamiento de fármacos para su liberación controlada o en la obtención de mallas y suturas para el tratamiento de heridas; así como en la fabricación de soportes para el desarrollo de tejidos, soportes para huesos y regeneración de meniscos (Aldor y Keasling, 2003). Recientemente se han investigado nuevas aplicaciones del PHB en una nueva área médica, la ingeniería de tejidos. La intención es generar tejidos, y potencialmente órganos, donde las estructuras de PHB funcionarán como “moldes” al ser recubiertos por factores de crecimiento. En cuanto a las aplicaciones biomédicas, cuando el material se implanta en el cuerpo se hidroliza en metabolitos compatibles, por lo que se ha usado como hilo para sutura. Así mismo, se ha propuesto utilizarlos para la fabricación de jeringas desechables y lubricantes para guantes de cirugía. Otra aplicación del PHB se encuentra en el área de alimentos, específicamente como cubierta para quesos, que comúnmente son materiales no biodegradables con base en polivinil acetato, látex y ácido dibutil maleico (Babel y Steinbuchel, 2001). Por otra parte, en la agricultura el PHB se emplea en dispositivos en los que la degradación natural del polímero permite la liberación de compuestos químicos de manera dosificada, para la aplicación de fertilizantes, fungicidas, herbicidas, etc.

3.3 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

La familia *Azotobacteriaceae* comprende a las bacterias del género *Azotobacter*, las cuales son eubacterias Gram-negativas. Son microorganismos mucoides naturales del suelo, aerobios estrictos, pero pueden crecer a bajas concentraciones de oxígeno. Son móviles a través de flagelos peritricos y tienen la capacidad de fijar nitrógeno a través de un complejo proteico llamado nitrogenasa (Kennedy y Toukdarian, 1987). Son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro. Presentan una morfología variada que va desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y aguas frescas. Comúnmente se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable (Espín, 2002). Se ha establecido que el catabolismo de la fuente de carbono en *A. vinelandii* ocurre principalmente por la vía Entner-Doudoroff (Conway, 1992). Es importante destacar que este microorganismo tiene una maquinaria celular notable para sintetizar dos moléculas de importancia biotecnológica y biomédica: el alginato (polisacárido extracelular), y el poliéster intracelular PHB. La fijación biológica de nitrógeno por *A. vinelandii* depende de la actividad del complejo enzimático nitrogenasa, el cual es altamente sensible al oxígeno (Sabra *et al.*, 2000). No obstante, *A. vinelandii* puede sobrevivir bajo condiciones elevadas de oxígeno, ya que posee diversos mecanismos de protección de la nitrogenasa (Espín, 2002).

Por otro lado, son varias las funciones que se le atribuyen al PHB en *A. vinelandii*, una de ellas es de constituir un material de reserva de carbono y energía que puede ser utilizado en periodos de limitación de nutrientes en el medio, ya que este polímero almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Otra función propuesta del PHB en *A. vinelandii* está relacionada con la fijación biológica de nitrógeno, específicamente con la protección del sistema nitrogenasa. Se propone que el PHB permite la protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono exógena, al proveer a la célula de una

fuerza de energía y carbono rápidamente oxidable. La utilización de PHB permitiría mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno, contribuyendo así a la protección de la nitrogenasa (Senior *et al.*, 1972). Por último, la síntesis de PHB sirve como regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno (como la requerida para la fijación de nitrógeno) y existe una concentración alta de carbono, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. Estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs, bajo estas condiciones también se sintetiza PHB (Segura *et al.*, 2003).

3.3.1 Biosíntesis y regulación del PHB en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* la síntesis de PHB ocurre en tres pasos enzimáticos a partir del acetil-CoA (figura 3.2). El primer paso de la vía consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la β -cetotilasa para generar acetoacetyl-CoA, el cual es reducido por una acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH para producir β -hidroxibutiril-CoA. Finalmente, las unidades de β -hidroxibutirato son polimerizadas por la PHB sintasa, liberando CoA y obteniéndose PHB (Anderson y Dawes, 1990).

El control de la síntesis de PHB se presenta a varios niveles. El primero que fue descrito se da a nivel enzimático, controlado alostéricamente por la actividad de las enzimas de la vía. Un punto de control importante es la enzima β -cetotilasa. Esta enzima es activada cuando la relación acetyl-CoA/CoA es alta. Dicha situación se puede dar cuando se acumula NADH o NADPH como respuesta a la baja concentración de oxígeno en el medio. Puesto que NADH o NADPH inhiben las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, se disminuye el flujo de carbono hacia este ciclo, lo que genera un incremento de la relación acetyl-CoA/CoA. Esto permite la estimulación de la actividad de la β -cetotilasa para la síntesis del PHB (Senior *et al.*, 1972).

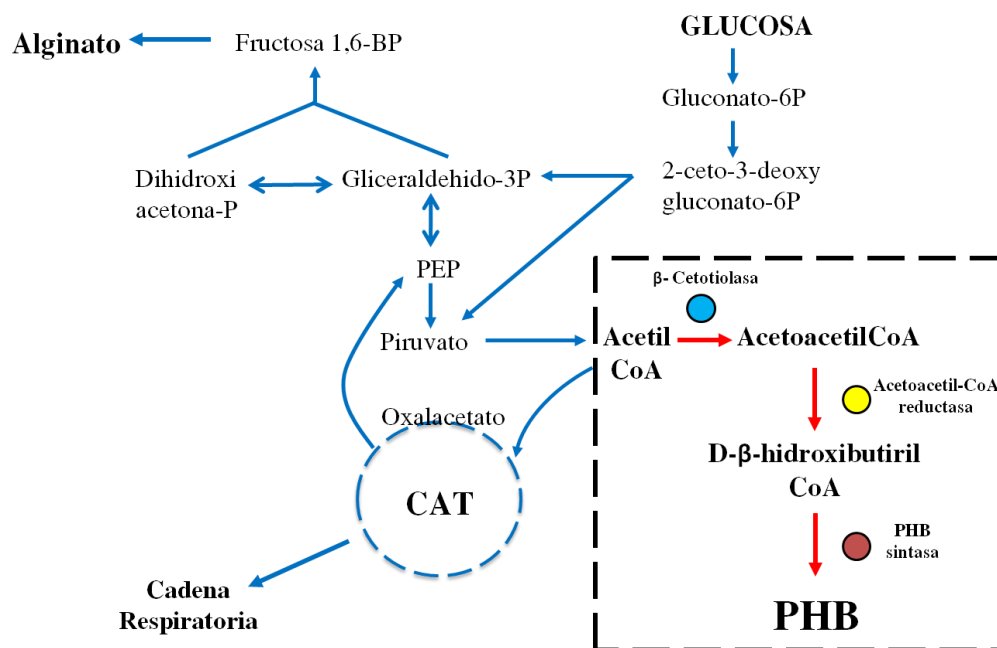


Figura 3.2 Ruta de biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* (Adaptado de Galindo *et al.*, 2007). Con los círculos se indican las enzimas involucradas en la síntesis de PHB.

Por el contrario, cuando la cantidad de oxígeno es adecuada, la concentración de CoA es alta y el acetil-CoA entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos mientras que la β -cetotiolasa es inhibida y consecuentemente la síntesis de PHB cesa (Babel y Steinbuchel 2001). Asimismo, se propone que la síntesis de PHB no sirve solamente como reserva de carbono y energía, sino que es un contenedor de poder reductor, funcionando como un regulador redox dentro de la célula.

Actualmente se conocen los genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de PHB en *A. vinelandii* (figura 3.3). Estos genes están incluidos en el operón *phbBA*. El gen *phbA*, codifica para la β -cetotiolasa específica para la síntesis de PHB. Los genes *phbB* y *phbC* codifican para la segunda y tercera enzimas de la vía (Segura *et al.*, 2003). Por otro lado, de manera divergente y a 512 nucleótidos *upstream* del operón se encuentra el gen *phbR*. Este gen codifica para la proteína PhbR, el cual es un activador

transcripcional del operón *phbBAC*, perteneciente a la familia de activadores transcripcionales *AraC* (Peralta *et al.*, 2002).

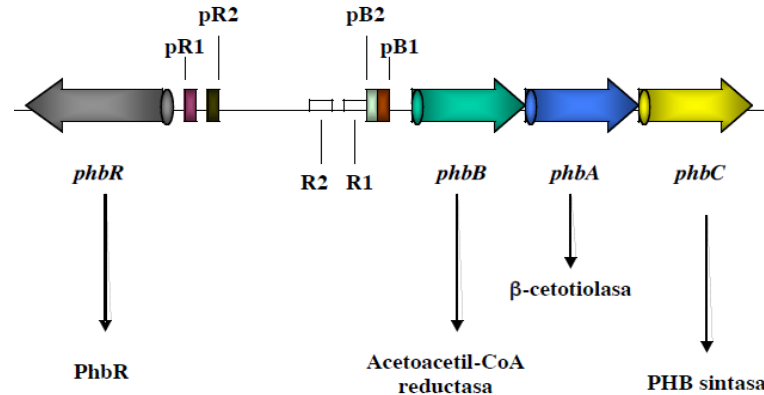


Figura 3.3 Organización del operón *phbBAC* en *A. vinelandii* (Hernández, 2007).

El operón *phbBAC* se transcribe a partir de 2 promotores sobrepuestos pB1 y pB2, en cambio el gen *phbR* se transcribe a partir de los promotores pR1 y pR2. En esta región del genoma de *A. vinelandii* también se encuentra el gen *phbP*, que codifica para una proteína asociada a los gránulos de PHB; y *phbF*, un posible regulador de *phbP*.

En análisis recientes de la secuencia del genoma de *A. vinelandii* (Setubal *et al.*, 2009) se ha demostrado la presencia del gen *phbJ*. Este gen codifica para una enoil-CoA hidratasa, la cual es responsable de la canalización de enoil-CoA (D)-específica derivada de la oxidación de ácidos grasos para la síntesis de PHAs en varias *Pseudomonas* (Fukui *et al.*, 1998). Cabe señalar que en *A. vinelandii* se propone que está enzima produce los precursores para la síntesis de poli (hidroxibutirato/valerato) (PHBV).

3.4 Síntesis de PHB y generación de cepas *A. vinelandii* modificadas genéticamente para incrementar su producción

La síntesis de PHB en *A. vinelandii* depende de diversos factores, como la composición del medio de cultivo, la capacidad metabólica de la bacteria, y los mecanismos de control genético que regulan la expresión de los genes que participan en la síntesis de PHB. El grupo de la Dra. Guadalupe Espín (IBt/UNAM), ha trabajado por varios años en el estudio de los genes que participan en la síntesis y regulación del PHB (Castañeda *et al.*, 2000). Se ha establecido que la regulación de la síntesis del polímero es compleja y puede presentarse a diferentes niveles (figura 3.4). Entre estos niveles destacan el control transcripcional por el activador PhbR (Peralta-Gil *et al.*, 2002), el factor sigma RpoS y el represor CydR (Wu *et al.*, 2001).

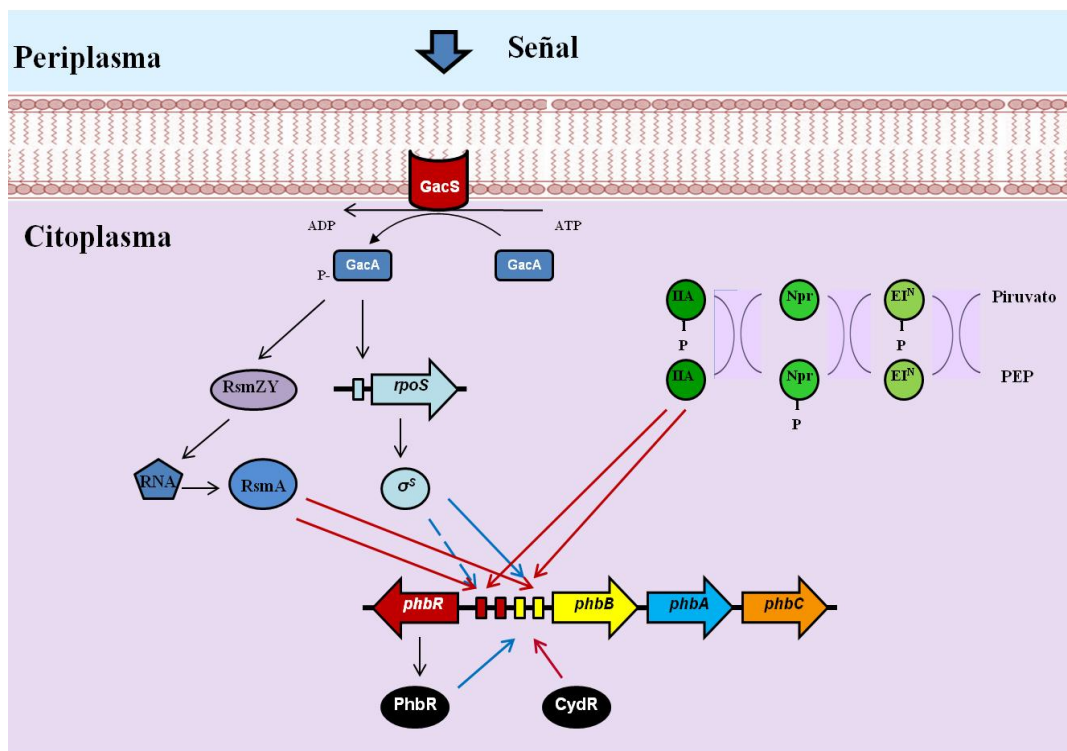


Figura 3.4 Sistemas de regulación del PHB en *A. vinelandii* (Adaptada de Galindo *et al.*, 2007).

Con círculos se representan las enzimas involucradas. Las líneas rojas indican un efecto negativo y las líneas azules un efecto positivo.

Además de los reguladores transcripcionales existen dos sistemas de regulación global que también controlan la expresión de los genes *phbBAC*, el sistema de dos componentes GacS/GacA (Castañeda *et al.*, 2000) y el sistema PTS^{Ntr} (Noguez *et al.*, 2006). El primero constituye un mecanismo mediante el cual la bacteria responde a los cambios en su ambiente. GacS es una proteína membranal que hipotéticamente detecta una señal ambiental y se autofosforila y posteriormente fosforila al regulador GacA, activándolo. Una vez fosforilado GacA activa la expresión del gen *rsmZY*, cuyo producto es un RNA no codificante, el cual titula una proteína pequeña denominada RsmA, que regula a nivel postranscripcional la expresión de los genes *phbBAC* y *phbR* al unirse a sus RNAs mensajeros inhibiendo su traducción y afectando su estabilidad. RsmA es por lo tanto un regulador negativo en la síntesis de PHB (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

Con la finalidad de generar una cepa de *A. vinelandii* sobreproductora de PHB se construyó una cepa mutante en la que se inactivó el gen *rsmA* en el fondo genético de la cepa OP (mutante espontánea que tiene interrumpido el gen *algU*, el cual codifica para un el factor σE que está implicado en la síntesis de alginato) eliminando así uno de los reguladores negativos de la síntesis de PHB, esta cepa se denominó OPN.

El otro sistema de regulación que participa en el control de la síntesis de PHB es el sistema PTS^{Ntr}, parálogo al sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) de *Escherichia coli*. En *A. vinelandii* se da la transferencia de un grupo fosfato, proveniente del fosfoenolpiruvato a una proteína denominada Enzima EI^{Ntr}. Posteriormente el grupo fosfato pasa a la proteína Npr y finalmente a la Enzima IIA^{Ntr}. Se sabe que la forma no fosforilada de la enzima IIA^{Ntr} afecta de manera negativa los niveles de expresión de los genes *phbR* y *phbBAC* por un mecanismo aun no descrito (Noguez *et al.*, 2006). El descubrimiento de este sistema de control permitió obtener una mutante que sobreproduce PHB mediante la inactivación del gen *ptsN*, la cual elimina el regulador negativo IIA^{Ntr}. Esta cepa mutante se denominó OPN. La tercera cepa que se generó para aumentar la

cantidad de PHB fue la OPNA, la cual contiene mutaciones en los dos sistemas reguladores de la síntesis de PHB: el sistema regulador RsmA (gen *rsmA* inactivado) y la proteína IIA^{Ntr} (gen *ptsN* inactivado) del sistema PTS^{Ntr}. En estudios recientes con estas cepas se encontró que las mutaciones tienen un efecto positivo en la síntesis de PHB (Ramírez, 2011) (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Cuantificación de proteína y PHB en cepas mutantes de *A. vinelandii*, en cultivos en matraz con medio Burk.

Cepa y Condiciones	Genotipo	Proteína total (g/L)	PHB (g/L)	Y p/s (g _{PHB} /g _{sacarosa})
OP	<i>algU</i> - Control	2.3 ± 0.2	8.5 ± 0.5	0.42
OPA	<i>algU</i> - <i>rsmA</i> :: <i>Spe</i> ^r	3.3 ± 0.6	7.5 ± 0.3	0.37
OPN	<i>algU</i> - <i>ptsN</i> :: <i>km</i> ^r	2.5 ± 0.6	9.2 ± 0.2	0.45
OPNA	<i>algU</i> - <i>rsmA</i> , <i>ptsN</i> :: <i>Km Spe</i> ^r	3.3 ± 0.3	9.3 ± 0.3	0.46

Tomada de Ramírez 2011

3.5 Parámetros que afectan la producción de PHB en *A. vinelandii*

La producción comercial de PHB requiere no sólo de un alto rendimiento y productividad, sino también una composición química definida. Se ha observado que la concentración de nutrientes, pH, temperatura y tensión de oxígeno disuelto (TOD) son factores que afectan el crecimiento celular y la producción de PHB en *A. vinelandii* (Peña *et al.*, 2011).

Dada la alta tasa de respiración que presenta *A. vinelandii*, es común que en cultivos donde no existe un control de la TOD se presenten limitaciones en la disponibilidad de oxígeno desde etapas muy tempranas del proceso de fermentación (Díaz-Barrera *et al.*, 2007). Por ello, el oxígeno disuelto adquiere un papel fundamental en el cultivo. La TOD influye en el metabolismo de la bacteria y juega un papel clave en la producción de PHB (Peña *et al.*, 2002). A TOD baja (< 1 %) se favorece la acumulación de PHB; mientras que valores altos

de TOD (10 %), la bacteria utiliza la fuente de carbono principalmente para el crecimiento celular.

Anteriormente, Page y Knosp (1989) realizaron trabajos en cultivos lote con la cepa UWD (productora de PHB). Estos autores observaron que la limitación del oxígeno promueve un aumento del rendimiento de PHB. Asimismo en trabajos recientes en nuestro laboratorio (Peña *et al.*, 2011) con la cepa ATCC9046 (productora de alginato y PHB) encontraron un efecto positivo de la limitación de oxígeno sobre la acumulación de PHB, cuantificándose hasta 86 % de PHB en una condición de alta aireación (200 rpm) y 80 % del polímero en baja aireación (100 rpm) en base a peso seco.

Existen reportes en la literatura donde se ha evaluado directamente la influencia de la aireación sobre el peso molecular del PHB. Quagliano y Miyazaki (1997) evaluaron diferentes niveles de aireación a nivel fermentador agitado para la cepa *A. chroococcum* 6B. Estos autores reportaron que a menor aireación (0.5 vvm) se obtenía un mayor peso molecular (1100kDa) de PHB, determinada por la viscosidad intrínseca del polímero. En cambio, a mayor aeración (2.5 vvm) el peso molecular disminuía significativamente a 100 kDa.

En otro trabajo, Myshkina y colaboradores (2008) observaron que en cultivos a nivel matraz con la cepa *A. chroococcum* 7B el peso molecular del PHB aumentaba de 1480 a 1670 kDa cuando se disminuía la velocidad de agitación de 250 a 190 rpm. Sin embargo, los rendimientos de PHB ($Y_{\text{PHB/Biomasa}}$) eran similares en ambas condiciones de agitación (0.75g_{PHB}/g_{Biomasa}). Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se encontró que en cultivos con la cepa OPN a baja aireación (200rpm) se sintetiza PHB de 2,026 kDa; mientras que, con la cepa OP bajo la misma condición se sintetiza un polímero de 1,650 kDa (Herrera, 2012).

3.6 Composición del medio de cultivo

Existen reportes en la literatura donde se han hecho intentos por optimizar la composición del medio de cultivo para incrementar la producción de PHB (Page y Knosp, 1989; Page, 1992; Page y Cornish, 1993; Myshkina *et al.*, 2008).

Los sustratos que utilizan las bacterias van desde carbohidratos, lípidos y proteínas, hasta compuestos aromáticos y residuos agroindustriales. Debido a que el proceso de fijación de nitrógeno en *A. vinelandii* requiere un elevado costo energético la adición de una fuente nitrogenada al medio de cultivo puede influir de manera positiva la producción de PHB. Page y Cornish (1993) observaron que al adicionar una fuente orgánica al medio de cultivo se incrementa la producción de PHB. Estos autores reportaron una producción de 25 g/L de PHB al añadir peptona de pescado al 1 % (p/v); asimismo, reportaron un rendimiento de $0.65 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$. Por otro lado, demostraron que la peptona de pescado no estimula el crecimiento celular, ya que provocó una disminución del 40% en la síntesis de proteína, no obstante la síntesis del PHB se duplicó. En este contexto, Herrera (2012) encontró que en cultivos en matraces agitados con la cepa OP la adición peptona y extracto de levadura al medio de cultivo incrementa la producción de PHB de 1.5 a 4.1 g/L.

Por otra parte, existen algunos elementos traza que pueden llegar a impactar en la síntesis del polímero. Savenkova y colaboradores (1998) encontraron un efecto positivo en la síntesis de PHB en cultivos con la cepa *A. chroococcum* 23 bajo condiciones de limitación de fósforo. Estos autores reportan un porcentaje de acumulación del 75 % en base a peso seco, asimismo el rendimiento del polímero ($Y_{p/s}$) fue $0.24 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$.

Debido a que el principal factor limitante en el uso comercial de PHB es su alto costo, se han buscado alternativas para reducir los gastos de las materias primas. En estudios a nivel matraz con la cepa UWD, Page (1992) encontró que al utilizar melaza de remolacha como

fuelle de carbono, obtenía una producción de 7 g/L de PHB. Cabe señalar que esta cepa también es capaz de crecer y producir PHB al utilizar otras fuentes como extracto de malta y jarabe de maíz. Sin embargo, Myshkina y colaboradores (2008), observaron que la melaza no mejoró la producción de PHB (1 g/L) con la cepa *A. chroococcum* 7B a nivel matraz. No obstante, al utilizar glucosa al 2 % (p/v) observaron un incremento de 4 g/L en la producción de PHB.

3.7 Producción de PHB a nivel reactor agitado

Una desventaja observada en el uso de *A. vinelandii* para la producción de PHB a nivel reactor es que presenta un pobre crecimiento, en comparación con otras bacterias como *Escherichia coli* (Díaz-Barrera *et al.*, 2007; Mejía *et al.*, 2010). Existen reportes en la literatura donde se ha observado que esto puede deberse al mecanismo de protección respiratoria del sistema nitrogenasa de la bacteria. Por lo general, las bacterias tienen cadenas respiratorias alternativas, lo cual les permite crecer bajo diferentes condiciones. Cuando *A. vinelandii* se adapta a un ambiente de mayor concentración de oxígeno, se expresa la citocromo oxidasa *Cytbd*, la cual actúa probablemente junto con una NADH II deshidrogenasa desacoplada. El flujo de electrones a través de esta cadena desacoplada provoca niveles de consumo de oxígeno altos (Khanna y Srivastava, 2004), lo cual resulta en bajos rendimientos de PHB. Por esta razón se han buscado estrategias para incrementar el crecimiento y contenido del polímero, además de mejorar las propiedades químicas de los biopolímeros. Las principales estrategias en esta línea están relacionadas con el uso de cultivos lotes alimentados y cultivos continuos (Verdilen *et al.*, 2007).

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se han propuesto estrategias de producción de PHB en cultivos que involucran 2 o 3 etapas, dado que el crecimiento celular y la producción de PHB son favorecidas cada una por diferentes condiciones de cultivo (Rocha *et al.*, 2008). En un cultivo en varias etapas lo que se pretende es que durante la

primera etapa se favorezca el crecimiento del microorganismo a través de establecer condiciones óptimas que promuevan un mayor crecimiento. En una segunda etapa, una vez que ya se ha alcanzado una alta concentración celular, se favorece la acumulación del metabolito de interés, por lo general bajo condiciones de limitación de nutrientes como oxígeno, fosforo, nitrógeno (Chen y Page 1997).

Por otro lado, los cultivos en lote alimentado (dentro de los sistemas de cultivo en multietapas) son empleados comúnmente para lograr una alta densidad celular y una elevada concentración de un metabolito de interés (Ramírez *et al.*, 1994). Existen diversas modalidades de cultivos alimentados, donde es posible alimentar uno o varios componentes. Un cultivo alimentado (*fed-bacth*) consiste en un sistema donde uno o más nutrientes son suministrados al biorreactor y los productos y demás componentes se mantienen dentro del sistema, hasta el final de la fermentación. Es decir, existe un flujo de entrada pero no un flujo de salida y el volumen cambia con respecto al tiempo (Yamane y Shimizu, 1984). Es importante señalar, que en los cultivos alimentados es fundamental definir el medio de cultivo con el cual se inicia, el tipo de limitación para inducir la síntesis de PHB, la forma en que se alimenta y el tiempo en que se empieza alimentar el cultivo.

En este sentido, Chen y Page (1997) realizaron estudios con la cepa *A. vinelandii* UWD en cultivos lote alimentados en dos etapas. Estos autores reportaron una producción de 25-36 g/L de PHB a las 49 h de cultivo. Las fermentaciones exponencialmente alimentadas tienen una gran ventaja, porque pueden ser usadas para determinar la relación entre la velocidad específica de crecimiento y funciones del proceso, tales como los rendimientos, producción final del metabolito de interés y consumo de sustratos (Yamane y Shimizu, 1984). Actualmente existen trabajos en cultivos exponencialmente alimentados con otros organismos productores de PHB. Por ejemplo, Grothe y Chisti (2000) reportaron que con la bacteria *Alcaligenes latus* en un cultivo en lote alimentado exponencialmente obtenían una concentración de biomasa de 36 y 20 g/L de PHB, mediante la variación de componentes en el medio de cultivo.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propuso el uso de procesos de fermentación en varias etapas y/o cultivos lote alimentado, con el uso de una cepa mutante de *A. vinelandii* sobreproductora de PHB para maximizar la producción del polímero en cultivos sumergidos.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos en un sistema multietapas y en lote alimentado con la cepa *A. vinelandii* OPNA permitirán incrementar la concentración volumétrica de biomasa y de PHB.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Maximizar la producción de biomasa y de PHB en cultivos multietapas y en lote alimentado con la cepa de *Azotobacter vinelandii* OPNA.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento y la producción de PHB, en cultivos con las cepas OP y OPNA, en dos diferentes medios de cultivo.
- Analizar a nivel fermentador, la cinética de crecimiento y producción de PHB a diferentes TOD's en cultivos con las cepas mutantes.
- Implementar una estrategia de fermentación con la cepa *A. vinelandii* OPNA basado en un sistema de tipo lote alimentado y en dos etapas que permita maximizar el crecimiento celular y la producción de PHB.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo del trabajo fue establecer estrategias de cultivo para maximizar la producción volumétrica de PHB mediante cultivos lote y lote alimentado exponencialmente a través del uso de cepas sobreproductoras de PHB. La estrategia experimental se esquematiza en el diagrama de flujo ilustrado en la figura 6.1

En la primera parte, se realizaron cultivos en matraz con cada una de las cepas (OP y OPNA) en diferentes medios de cultivo Burk-sacarosa (BS) y PY. Esto se llevó a cabo con el fin de seleccionar el medio de cultivo donde se obtuviera una mayor velocidad específica de crecimiento (μ) y una mayor acumulación de PHB. Se decidió utilizar estos medios debido a los altos rendimientos de PHB obtenidos a nivel de caja y matraz (Hernández, 2007; Ramírez, 2011). El medio BS es un medio definido que tradicionalmente es empleado en el crecimiento de *A. vinelandii* en cambio el medio PY es un medio rico que presenta una composición más compleja.

En la segunda etapa del proceso se realizaron cultivos en lote con la cepa OP (control) a diferentes TOD's. Se sabe que la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 acumula PHB a valores cercanos al 1 % de TOD, en cambio cuando se crece a valores cercanos al 10 % se favorece el crecimiento celular (Peña *et al.*, 2002). Sin embargo, debido a que las cepas no han sido evaluadas en condiciones de TOD controladas, se decidió evaluar un rango de TOD's (entre 4-15 %) para establecer bajo qué concentración de oxígeno se obtiene un mayor crecimiento celular. Posteriormente, una vez seleccionada la TOD óptima para el crecimiento celular, se realizaron cultivos bajo esa condición con la cepa OPNA. En la tercera etapa del proceso, se realizaron cultivos exponencialmente alimentados con la cepa OPNA, bajo las mismas condiciones que los cultivos en lote (sección 7.4 de Materiales y Métodos). Finalmente una vez terminada la etapa de alimentación exponencial, se realizaron pulsos de sacarosa y extracto de levadura para alcanzar una mayor densidad celular y consecuentemente una mayor producción de PHB.

Estudio del crecimiento celular y producción de PHB

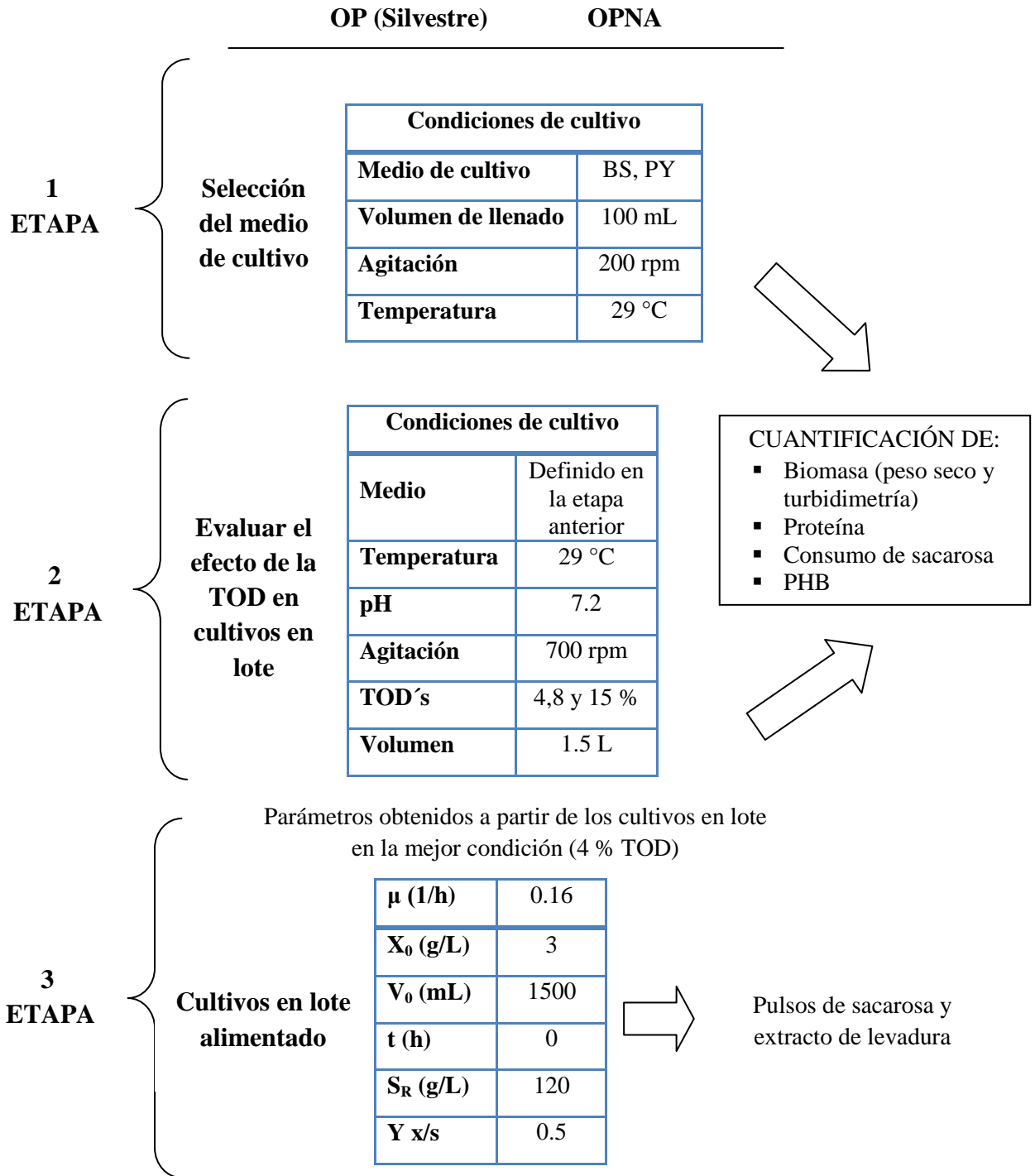


Figura 6.1 Estrategia experimental desarrollada para el estudio del crecimiento y producción de PHB en cepas de *A. vinelandii* productoras de PHB.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Materiales

7.1.1 Cepas

Las cepas empleadas en este estudio fueron proporcionadas por el laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín (IBt/UNAM).

- *A. vinelandii* OP, mutante espontánea que tiene interrumpido el gen *algU*, el cual codifica para un el factor σE que está implicado en la síntesis de alginato (Gaona *et al.*, 2004), por lo tanto está cepa sólo produce PHB.
- *A. vinelandii* OPNA, mutante derivada de la cepa OP que tiene inactivados los sistemas de regulación PTS^{Ntr} y RsmA/RsmZY que actúan negativamente en la síntesis de PHB (Noguez *et al.*, 2006; Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

7.1.2 Preservación de las cepas

En la primera parte del trabajo a nivel matraz las cepas OP y OPNA se mantuvieron a 4°C en cajas Petri con medio BS solidificado con agar (18 g/L). Posteriormente, en cultivos realizados a nivel reactor las cepas se mantuvieron en cajas con medio PY a 4°C, la preservación de las cepas se hicieron mediante resiembras mensuales.

7.1.3 Medios de cultivos

En la primera parte del trabajo se utilizaron dos medios de cultivo, medio BS (Peña *et al.*, 2000) y medio PY (Segura *et al.*, 2003). La composición de los medios de cultivo se muestran en las Tablas 7.1 y 7.2. El pH del BS se ajustó a 7.2 y el medio PY a 7.0. Para el BS las sales de potasio, la sacarosa, el extracto de levadura y el MOPS se disolvieron en 900 ml de agua destilada y el pH se ajustó a 7.2 con NaOH (2N). A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 ml de agua destilada, al igual que las sales restantes. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121°C durante 20 min y una vez estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar.

Tabla 7.1 Composición del medio BS.

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	3.0
K ₂ HPO ₄	0.66
KH ₂ PO ₄	0.16
MOPS	1.42
CaSO ₄	0.05
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.2
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.0029
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.027

Tabla 7.2 Composición del medio PY

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	3.0
Peptona	5.0

7.2 Cultivos en matraces agitados

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de volumen de trabajo, los cuales se incubaron a 29 °C y 200 rpm (diámetro de agitación de 25 mm), durante 60 h.

7.3 Cultivos en biorreactor de 3.0 L

7.3.1 Cultivos en lote

Los cultivos en biorreactor se realizaron en un equipo Applikon (Schiedam, Netherlands) de 3.0 L de volumen nominal, con un volumen de trabajo de 1.5 L, equipado con 2 impulsores tipo turbina Rushton ($D_i/D_T = 0.35$ cm) y un difusor de aire con 7 orificios. El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH marca Ingold y se mantuvo constante en 7.2 mediante la adición automática de NaOH 2N. El control de espuma se realizó de forma

manual utilizando una bomba peristáltica y con la adición de antiespumante silicona al 10 % (p/v). La TOD se determinó mediante un electrodo polarográfico de oxígeno y la señal fue transmitida a un amplificador y adquirida por una PC Compac deskpro. Con un flujo de total de 1 L/min de gas. La TOD fue controlada en línea mediante una mezcla de gases de oxígeno y nitrógeno por medio de dos controladores de flujo másico y usando un controlador proporcional integral derivativo (PID) (Lozano *et al.*, 2011). Los cultivos se realizaron a 29 °C, pH 7.2 y a una agitación constante de 700 rpm.

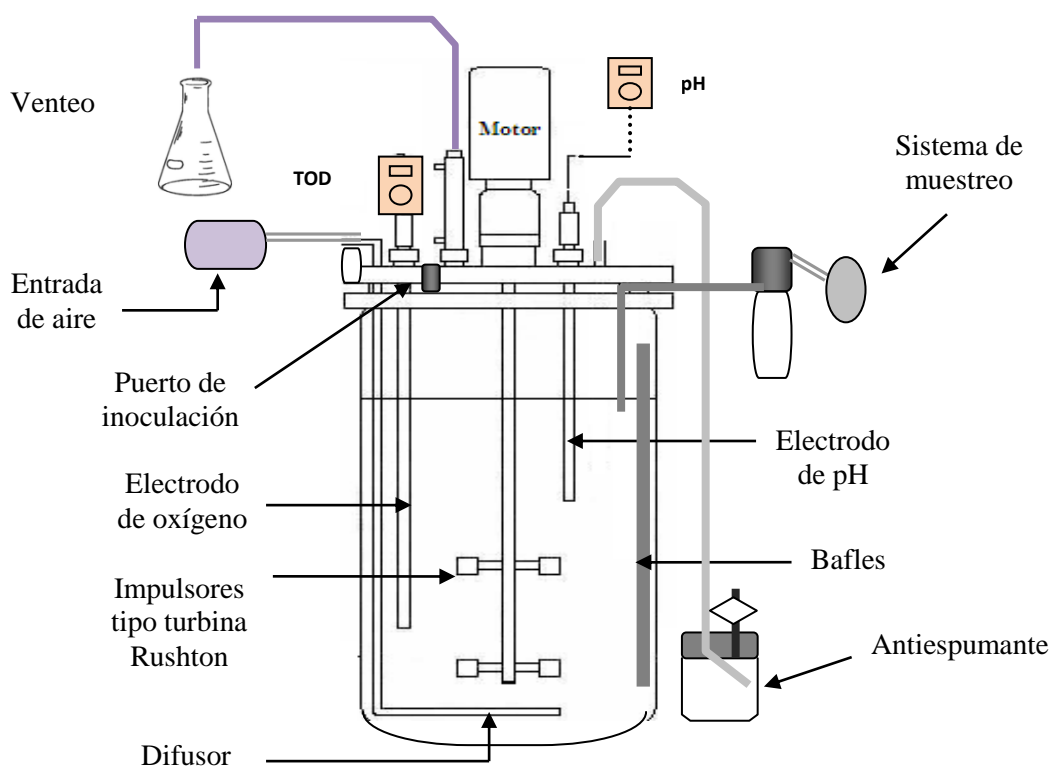


Figura 7.1 Descripción del biorreactor *Applikon* que se utilizó en el presente trabajo.

7.3.2 Cultivos exponencialmente alimentados

Los cultivos exponencialmente alimentados se realizaron en el mismo sistema de fermentación y condiciones previamente descritas. Se alimentaron todos los componentes del medio de cultivo PY (sacarosa, extracto de levadura y peptona). La adición del medio se realizó con una bomba peristáltica de precisión Masterflex L/S Modelo 758-18,

conectada a un controlador de PLC con el cual se prediseñaron los flujos según el perfil exponencial que se requería. El flujo inicial de la alimentación fue de 0.2 mL/min, llegando a un flujo final de 1.53 mL/min. El volumen inicial del cultivo fue 1500 mL alimentando hasta un volumen de 2050 mL.

7.3.3 Perfiles de alimentación exponencial

La alimentación exponencial es utilizada con el fin de controlar la velocidad específica de crecimiento en la etapa de alimentación. Cuando se llega a la etapa exponencial se empieza alimentar el cultivo para mantener constante la velocidad de crecimiento. La tasa de alimentación exponencial se determinó mediante la ecuación de equilibrio de masa celular y sustrato de acuerdo con Yee y Blanch (1992).

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu VX \quad \text{para biomasa} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_o - \frac{\mu(VX)}{Y_{x/s}} \quad \text{para sustrato} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{Ec. 3}$$

$$F = \frac{\mu(VX)}{S_o Y_{x/s}} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde: V es el volumen del medio de cultivo en el reactor (L), X es la concentración de biomasa (g/L), t es el tiempo (h), μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), S es la concentración de sustrato en el reactor (g/L), S_o es la concentración de sustrato en la alimentación (g/L), F es el flujo de alimentación (L/h) y $Y_{x/s}$ es el rendimiento de biomasa con base en sustrato (g/g). Si se asume que la velocidad de crecimiento es constante, la ecuación 1 puede ser integrada como:

$$XV = V_o X_o \exp(\mu t) \quad \text{Ec. 5}$$

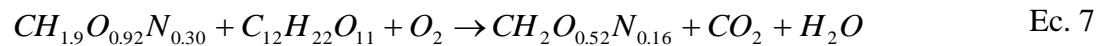
Donde: X_o es la concentración de biomasa cuando inicia la alimentación, V_o es el volumen de medio en el biorreactor en el comienzo de la alimentación. Suponiendo un estado pseudoestacionario para la concentración de sustrato (ds/dt) (VS) = 0, y se asume que $Y_{x/s}$ es constante en el tiempo, a continuación, se reemplaza la Ec. 5 en la Ec. 4:

$$F = \frac{\mu(V_o X_o) \exp(\mu t)}{S_o Y_{x/s}} \quad \text{Ec. 6}$$

7.3.4 Cultivos alimentados con pulsos

Los cultivos alimentados con pulsos se realizaron al finalizar la etapa de alimentación exponencial, se alimentó al cultivo sólo extracto de levadura y sacarosa. Para conocer la cantidad de sustrato alimentado se hizo un balance estequiométrico de masa.

Se puede representar un cultivo aerobio de *A. vinelandii* con sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), extracto de levadura ($CH_{1.9}O_{0.92}N_{0.30}$) como sustratos con una descripción como sigue:



El producto principal de la reacción es la biomasa ($CH_2O_{0.52}N_{0.16}$)

El coeficiente respirométrico utilizado para *A. vinelandii* fue similar a lo reportado por Peña *et al.*, 2011 en condiciones donde el sustrato se dirige preferentemente a la síntesis de PHB.

$$RQ = \frac{CO_2 \text{ producido}}{O_2 \text{ consumido}} = 1.20 \quad \text{Ec. 8}$$

7.4 Desarrollo de los Cultivos

a) Pre-inóculo

El pre-inoculo se desarrolló en cajas Petri con medio sólido BS y medio PY, la cajas se sembraron con la cepas OP y OPNA y fueron incubadas por 48 h a 29 °C.

b) Preparación del inóculo para los cultivos en matraz

El inóculo para el matraz fue preparado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio BS y PY. Los matraces se inocularon con 2 asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo) y se incubaron a 29°C y 200 rpm durante 24 h. Posteriormente se tomaron 10 mL para inocular los matraces a una relación 1/10.

c) Preparación del inóculo para los cultivos en biorreactor

El inóculo para el biorreactor fue preparado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio PY. Los matraces se inocularon con 2 asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo) y se incubaron a 29°C y 200 rpm durante 24 h. Bajo estas condiciones y mediante una dilución 1/50 de la muestra, se obtuvo una densidad óptica (D.O.) = 0.20 ± 0.02 . Las células obtenidas en el inóculo fueron centrifugadas a 11,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células se re-suspendieron en medio fresco.

7.5 Métodos analíticos

7.5.1 Determinación de biomasa por peso seco.

La determinación de biomasa se llevó a cabo mediante el método gravimétrico de peso seco. Se tomaron 10 mL de caldo de cultivo y se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga marca Eppendorf (modelo 5804). Se separó el sobrenadante y el paquete celular fue filtrado al vacío a través de membranas Sartorius de 0.22 μm de tamaño de poro, previamente taradas. Las membranas con muestra se secaron por 24 h a 70 °C en una estufa (Felisa), posteriormente se colocaron en un desecador durante 1.5 horas hasta llegar a una temperatura ambiente. Finalmente se pesaron y se obtuvo (por diferencia de peso) la cantidad de biomasa, expresada en g/L de medio de cultivo. En la etapa de alimentación debido a que se obtiene una alta concentración de biomasa se tomó 1 mL del caldo de cultivo, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y la muestra se secó. Finalmente se pesó el tubo eppendorf y se obtuvo la cantidad de biomasa por la diferencia de peso.

7.5.2 Determinación de biomasa por turbidimetría.

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se hizo una dilución 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E). Los valores se usaron como manera rápida de determinar el crecimiento bacteriano en el medio.

7.5.3. Cuantificación de proteína.

El análisis de proteína se llevó a cabo mediante el método de Lowry *et al.*, (1951). En la reacción se forma un color azul cuya densidad óptica medida a 625 nm es proporcional a la cantidad de proteína presente.

Soluciones: a) Na_2CO_3 2 % en NaOH 0.1 N; b) Tartrato de Na y K 2 % c) CuSO_4 1%.

Solución reactiva: Se mezcló 1 mL de la solución C, 1 mL de la solución B y 98 mL de la solución A.

Reactivo de Folin: Se utilizó el reactivo de Folin y se hizo una dilución 1:2 con agua destilada.

Se tomó 1.0 mL de la muestra del caldo de cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos. Se hicieron diluciones dependiendo de la cantidad de muestra. Posteriormente se adicionó 1.0 mL de la solución reactiva, se agitó y se dejó reposar 10 minutos. Después se adicionó 100 μ L del reactivo de Folin, se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en obscuridad. Las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5804) a 13,000 rpm durante 2 minutos para eliminar restos celulares. Finalmente se determinó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Adicionalmente se corrió una curva patrón utilizando albúmina bovina (Sigma), con las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 0.8, 1.2 mg/mL (figura 7.2).

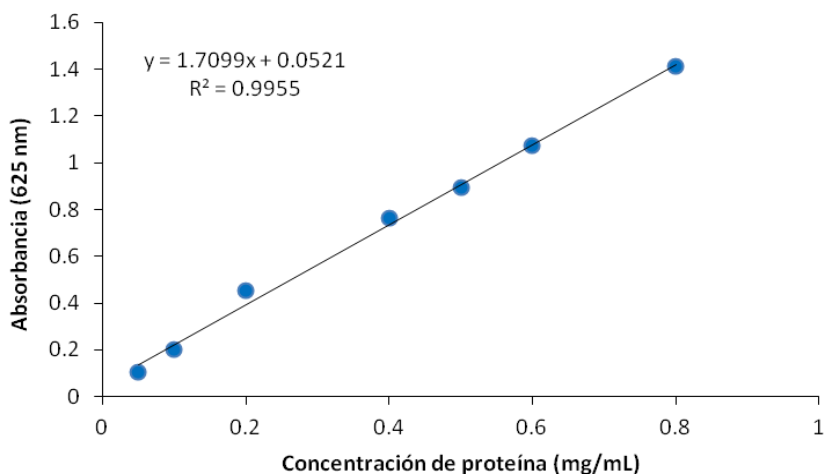


Figura 7.2 Curva patrón para la cuantificación de proteína.

7.5.4 Cuantificación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS

El método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando la enzima invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica medida a 540 nm es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Solución de DNS: Se preparó pesando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de DNS, se mezclaron en 1.0 L de agua destilada, con adición lenta del DNS para evitar su precipitación.

Amortiguador de citratos pH 4.6: Se preparó disolviendo 0.197 g de ácido cítrico en 50 mL de agua destilada. De forma independiente, se disolvió 9.1 g de citrato de sodio en 50 mL de agua destilada. Posteriormente, se adicionó gota a gota el citrato de sodio al ácido cítrico hasta alcanzar un pH de 4.6.

Solución enzimática: Se preparó mezclando 2.5 mg de la enzima β - fructofuranosidasa (Sigma) con 1.0 mL de amortiguador de citratos (0.35 M, pH 4.6).

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se hizo una dilución 1/20 con agua destilada. 0.9 mL de muestra se colocaron en tubos de ensaye de vidrio y se mezcló con 0.1 mL de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se adicionó 1.0 mL de la solución de DNS a cada muestra. Los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 5 minutos, e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Los valores se extrapolaron a la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL (figura 7.3).

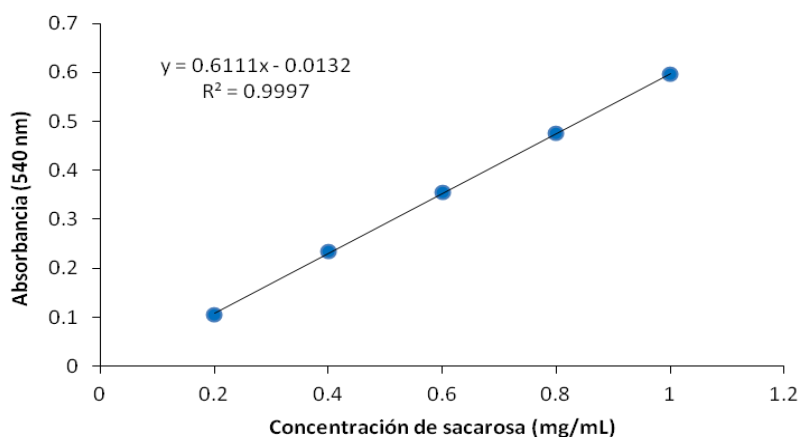


Figura 7.3 Curva patrón para la cuantificación de sacarosa.

7.5.5 Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se realizó mediante la conversión a ácido crónico por tratamiento con H_2SO_4 concentrado. Las muestras se analizaron por HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (Biorad). Se utilizó como fase móvil H_2SO_4 0.014 N a un flujo de 0.65 mL/min y una temperatura de análisis de 50 °C. Se utilizó un detector de arreglo de diodos (Waters 2996).

Se tomó 1.0 mL del cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, se decantó la muestra, se dejó secar y posteriormente se le adicionó 1.0 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla se incubó a 90 °C y 700 rpm durante 1 h en un *Thermomixer R*. Posteriormente se dejaron las muestras enfriar y se realizaron diluciones dependiendo de la cantidad de muestra. Se inyectaron 20 μL de cada muestra al HPLC. Los valores de las áreas obtenidas a 220 nm se extrapolan a la curva patrón, la cual se elaboró con PHB comercial disuelto en H_2SO_4 concentrado a una concentración de 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 g/L (figura 7.4).

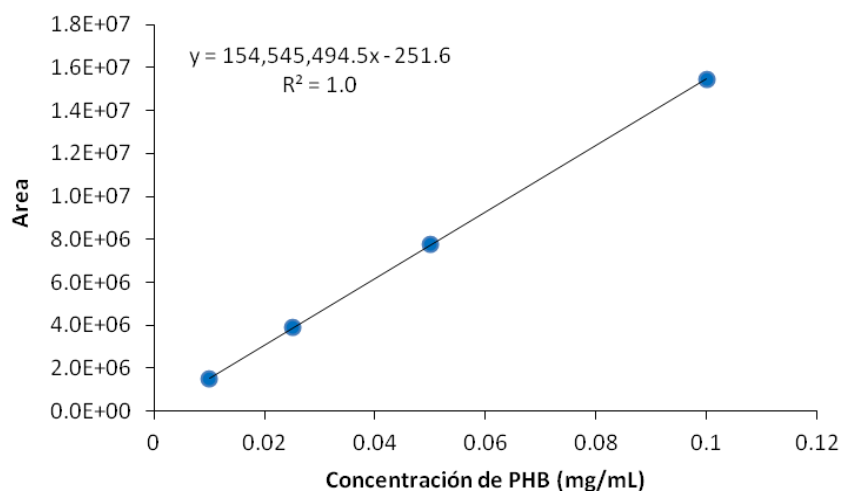


Figura 7.4 Curva patrón para la cuantificación de PHB.

7.6 Cálculo de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO)

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se estimó a partir de la ecuación 7 durante todo el proceso.

$$VTO = (C^* - C_L) * k_L a \quad \text{Ec. 7}$$

Donde $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}), C^* es la concentración de saturación de oxígeno en el líquido ($mmol L^{-1}$) y C_L es la concentración de oxígeno en el seno del líquido ($mmol L^{-1}$). Para este sistema se estimó un $k_L a$ de $101 h^{-1}$. La velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) fue calculada a partir de los datos experimentales de la VTO_{max} y la concentración de biomasa (X), utilizando para ello la siguiente ecuación:

$$q_{O_2} = \frac{VTO_{max}}{X} \quad \text{Ec. 8}$$

7.7 Desarrollo de modelos matemáticos

7.7.1 Aspectos cinéticos

La cinética de crecimiento de *A. vinelandii*, crecida en fermentador, fue calculada con la ecuación diferencial logística, descrita por Weiss y Ollis (1980) y por Klimek y Ollis (1980), de la siguiente forma:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad \text{Ec. 9}$$

donde: μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y X_{max} es la concentración máxima de biomasa obtenida en el cultivo ($g L^{-1}$). La forma integrada de la ecuación 7 se expresa

por una variación sigmoideal de la concentración celular contra el tiempo, considerando que $X_0 = X(t=0)$ y reordenando los términos se obtiene la ecuación 8 que describe el crecimiento bacteriano en el tiempo.

$$X_{(t)} = \frac{X_o e^{\mu t}}{1 - (X_o / X_{\max})(1 - e^{\mu t})} \quad \text{Ec. 10}$$

Al graficar $\ln \left[\frac{(X_{(t)} / X_{\max})}{(1 - (X_{(t)} / X_{\max}))} \right]$ contra el tiempo se obtiene la velocidad específica de crecimiento (μ) representada por la pendiente del grafico.

La cinética de formación de producto en función de biomasa es descrita por la ecuación de Luedeking-Piret, la cual ha sido utilizada en la descripción de polímeros (Mulchandani y Luong, 1988; Serrano-Carreón *et al.*, 1998; Trujillo, 1999).

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{Ec. 11}$$

El término $\alpha \frac{dX}{dt}$ está asociado a la fase de crecimiento bacteriano y el término βX es no asociado a la fase de crecimiento.

El cálculo del parámetro β , es evaluado en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento ($dX/dt = 0$, $X=X_{\max}$), obteniéndose como:

$$\beta = \frac{(dP / dt)}{X_{\max}} \quad \text{Ec. 12}$$

El valor de α se calcula cuando se grafica

$$P_{(t)} - P_o - \beta(X_{\max} / \mu) \ln \left[\frac{(X_{(t)} / X_{\max})}{(1 - (X_{(t)} / X_{\max}))} \right] \text{ contra } X_o \left(\frac{e^{\mu t}}{(1 - (X_o / X_{\max})(1 - e^{\mu t}))} - 1 \right),$$

representado por la pendiente.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1

CULTIVOS EN MATRACES AGITADOS

8.1 Cultivos a nivel matraz en diferentes medios de cultivo

Las cepas OP y OPNA de *Azotobacter vinelandii* se emplearon con la finalidad de incrementar la producción de PHB. Sin embargo, una limitante en la producción volumétrica del polímero es el pobre crecimiento que presentan las diferentes cepas de *Azotobacter*. Actualmente existen reportes donde se sabe que la composición del medio de cultivo influye en el crecimiento celular, y por ende, en la producción del polímero (Page y Cornish, 1993; Myshkina, *et al.*, 2008). El medio BS es un medio definido en el que están presentes algunos elementos trazas como calcio, fosfato, etc., y tradicionalmente es empleado en el crecimiento de *A. vinelandii* (Peña, 2002, Díaz-Barrera *et al.*, 2007). No obstante, en trabajos donde se busca incrementar la producción de polímero se ha optado por utilizar medios de cultivo con una composición más compleja, donde se ha reportado un incremento del rendimiento debido a la presencia de ciertos carbohidratos, aminoácidos y vitaminas (Segura *et al.*, 2003, Ramírez, 2011).

Dicho lo anterior, en la primera etapa del trabajo se realizaron cultivos en matraces agitados con las cepas OP y OPNA en medio BS y PY. Los cultivos se realizaron con la finalidad de seleccionar el medio donde se favoreciera el crecimiento celular y la producción de PHB. En la figura 8.1 se presentan los perfiles de las cinéticas con base en proteína, la cual se consideró para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento, ya que el método gravimétrico no permite diferenciar entre los cambios ocasionados por la multiplicación celular y la acumulación de PHB. Cada uno de los puntos de las gráficas representa el

promedio de tres cultivos independientes. Las figuras incluyen barras de desviación estándar para mostrar la reproducibilidad de los datos.

En los cultivos con la cepa OP en medio PY se obtuvo una producción máxima de 0.86 ± 0.08 g/L de proteína a las 36 h de cultivo. Esta cantidad de proteína fue mayor a la obtenida en medio BS, la cual fue de 0.75 ± 0.06 g/L al mismo tiempo de cultivo.

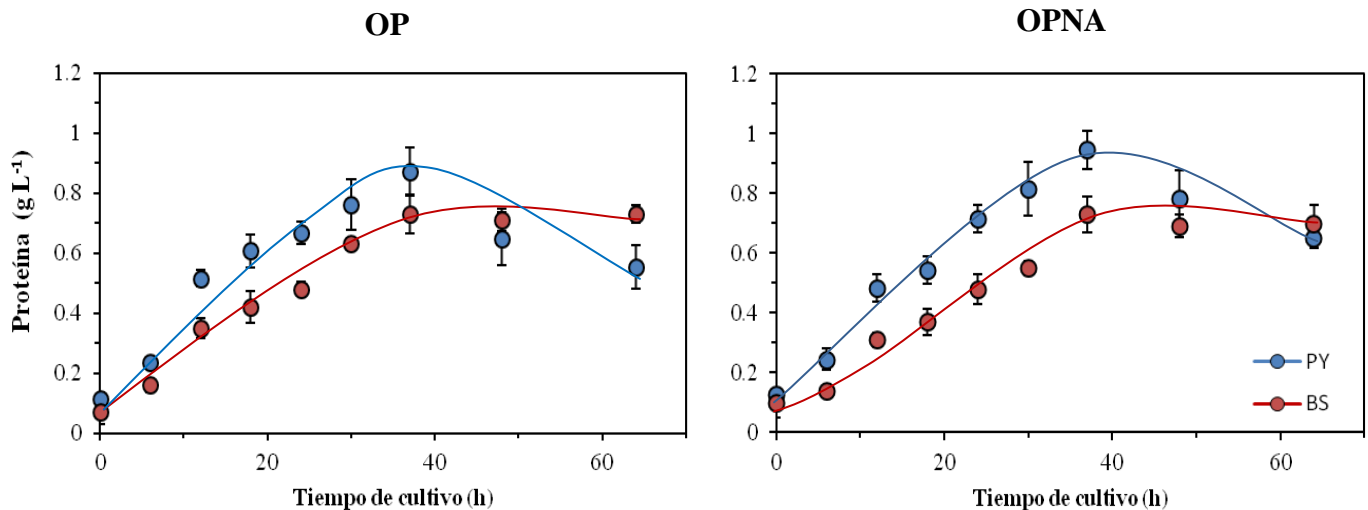


Figura 8.1 Cinéticas de crecimiento celular (con base en proteína) en cultivos en matraz con las cepas OP y OPNA de *A. vinelandii* en medio BS y PY.

En cultivos con la cepa OPNA en medio PY se obtuvo una mayor cantidad de proteína (0.94 ± 0.06 g/L) a las 36 h en comparación con los cultivos en medio BS, donde la cantidad de proteína fue de 0.78 g/L. A partir de las cinéticas, se estimó una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.070 h^{-1} con la cepa OP y de 0.076 h^{-1} con la cepa OPNA en medio BS, mientras que las velocidades de crecimiento en medio PY fueron de 0.078 y 0.084 h^{-1} para la cepa OP y OPNA respectivamente (Tabla 8.1). La velocidad de crecimiento en medio PY ya ha sido reportado antes por Herrera (2012), quien encontró que los nutrientes presentes en el medio (aportados por la peptona y el extracto de levadura) favorecen el crecimiento celular en las cepas de *A. vinelandii* productoras de PHB.

Por otro lado, se puede observar que en los cultivos con medio PY después de las 36 h hubo una disminución del crecimiento celular (35 %) para ambas cepas, en contraste con lo observado con medio BS, donde después de dicho tiempo la bacteria llegó a la fase estacionaria de su crecimiento. Como se puede apreciar en la figura 8.2, la fuente de carbono no se consume completamente al final del cultivo. Únicamente el 75 % de la sacarosa fue incorporada por la bacteria con una velocidad de consumo específica de 0.32 ($\text{g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{proteína h}}$). El consumo de sacarosa tuvo un comportamiento similar tanto en la cepa OP y OPNA, así como en los diferentes medios.

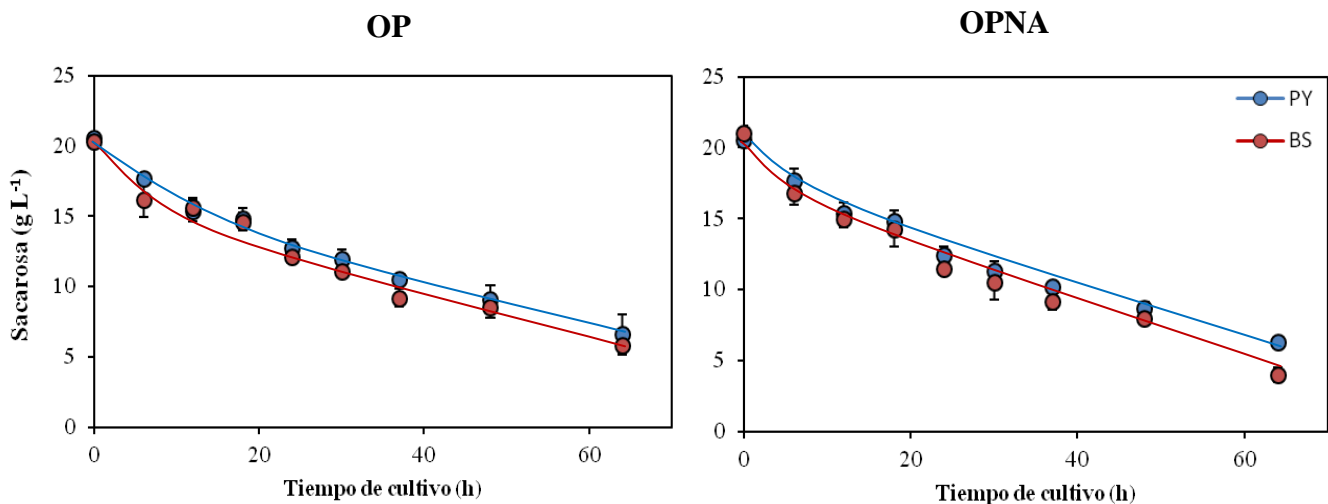


Figura 8.2 Consumo de sustrato en cultivos en matraz con las cepas OP y OPNA de *A. vinelandii* en medio BS y PY.

Debido a que no se agotó la fuente de carbono, la disminución en el crecimiento se podría deber a la presencia o agotamiento de algún nutriente presente en la peptona o extracto de levadura. Este comportamiento ya ha sido anteriormente reportado por Page y Cornish (1993), quienes observaron que en cultivos en lote con la cepa *A. vinelandii* UWD (cepa mutante productora de PHB) la acumulación de UDP-glicopéptido proveniente de la glicina aportada por el extracto de levadura y la peptona tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria. Maculla y Cowles, 1948 reportaron que la glicina tiene un efecto

negativo en el crecimiento de la célula debido a la generación de células pleomórficas y osmóticamente frágiles. Se sabe que la glicina interfiere en la síntesis de peptidoglicano y resulta en la acumulación de precursores UDP-glicopéptidos que se acumulan en el citoplasma de la célula.

En cuanto a la producción de PHB se observó que en medio PY la síntesis del polímero se vio favorecida (figura 8.3). A las 36 h de cultivo se cuantificó una concentración de 3.5 y 4.6 g/L con la cepa OP y OPNA respectivamente, superior a la alcanzada con medio BS (1.7 y 2.9 g/L). Por otro lado, el porcentaje de acumulación del polímero en base a su peso seco se mantuvo constante a lo largo del cultivo (70-80 %).

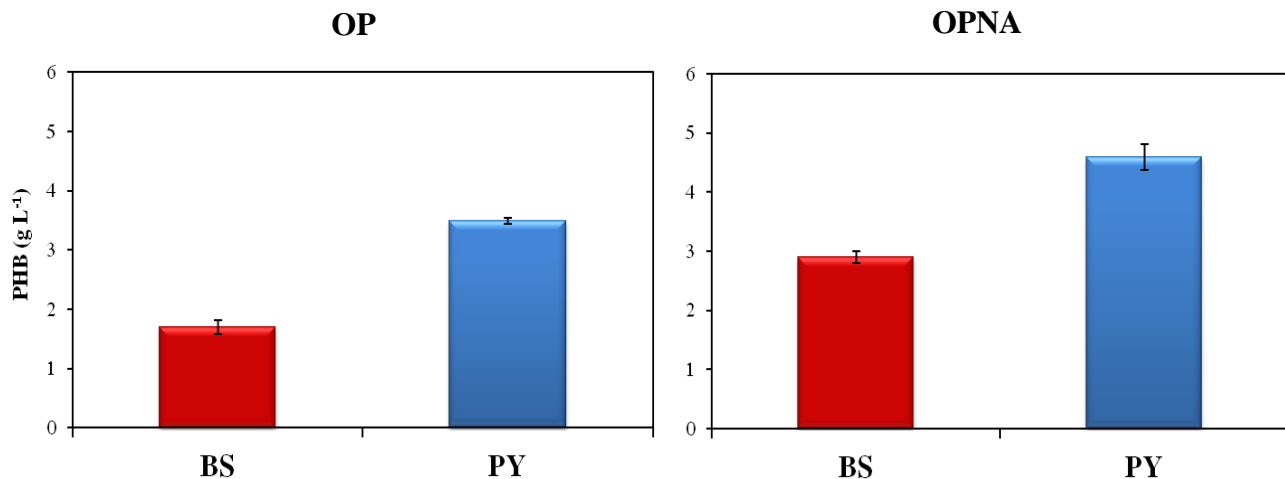


Figura 8.3 Concentración de PHB a las 36 h de cultivo con las cepas OP y OPNA de *A. vinelandii* en medio BS y PY.

Es evidente que en los cultivos realizados en medio PY, los nutrientes que son proporcionados por el extracto de levadura y la peptona (proteínas, vitaminas, carbohidratos, etc.) son aprovechados para el crecimiento de las células. Actualmente existen varios reportes en la literatura donde se ha reportado un incremento en el porcentaje de acumulación del PHB al utilizar medios ricos y complejos (Quagliano y Miyazaki, 1997; Ryu *et al.*, 2008).

Por otro lado, el genotipo de la cepa OPNA favoreció el porcentaje de acumulación y rendimiento de PHB debido a que se incrementa un 15 % la síntesis del polímero en comparación con la cepa OP. Los valores de acumulación son similares a lo reportado previamente por Herrera (2012), quien observó un incremento del 20 % de acumulación de PHB al utilizar la cepa OPN (cepa mutante afectada en el sistema PTS^{Ntr}) en comparación con la cepa OP.

En la tabla 8.1 se muestra un resumen de los parámetros evaluados bajo las distintas condiciones de cultivo. Como se puede observar, con medio PY se obtuvo un mayor crecimiento celular y porcentaje de PHB con ambas cepas evaluadas. Asimismo, los rendimientos de PHB fueron mayores, alcanzándose 0.25 y 0.31 g_{PHB}/g_{sacarosa} para la cepa OP y OPNA respectivamente.

A partir de los resultados en matraz, se decidió utilizar el medio PY para los cultivos en lote. En principio, se decidió utilizar la cepa control OP.

Tabla 8.1 Parámetros obtenidos a partir de los cultivos realizados en matraz con las cepas OP y OPNA de *A. vinelandii* en medio BS y PY.

Medio	Cultivos en matraces			
	BS		PY	
	OP	OPNA	OP	OPNA
Vel. de crecimiento (h ⁻¹)	0.070 ± 0.004	0.076 ± 0.001	0.078 ± 0.001	0.084 ± 0.002
q _{sac} (g _{sac} /g _{Proteína} h)	0.30 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.02
Proteína _{max} (g/L)	0.75 ± 0.06	0.78 ± 0.06	0.86 ± 0.08	0.94 ± 0.06
% PHB _{max}	48 ± 2.8	52 ± 4.7	71 ± 0.95	77 ± 1.6
PHB (g/L)	1.7 ± 0.11	2.9 ± 0.1	3.5 ± 0.05	4.6 ± 0.2
Y p/s (g/g)	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.31 ± 0.04

Capítulo 2

CULTIVOS EN BIORREACTORES

8.2 Influencia de la TOD sobre el crecimiento y producción de PHB.

Como se había mencionado anteriormente, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) es un parámetro revelante que determina la canalización de la fuente de carbono en el metabolismo de la bacteria. En cultivos con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046, valores superiores a 10 % de TOD favorecen el crecimiento celular y valores cercanos al 1 % favorecen la síntesis del polímero (Peña *et al.*, 2002). Debido a lo anterior, en la segunda etapa del estudio se evaluó la influencia del oxígeno disuelto sobre el crecimiento celular ya que la cepa *A. vinelandii* OP no ha sido evaluada hasta este momento, se decidió abarcar un rango de TOD's entre 4 y 15 %.

En la figura 8.4 se muestran las cinéticas de crecimiento con base en biomasa (a), proteína (b) y consumo de sacarosa (c). Cada condición se realizó por triplicado y se muestran las desviaciones estándar para mostrar la reproducibilidad de los datos.

Como se puede observar, la concentración más alta de proteína alcanzada por la cepa OP fue de 0.9 g/L a 4 % de TOD. La velocidad específica de crecimiento para el cultivo realizado a 4 % fue de $0.16 \pm 0.014 \text{ h}^{-1}$; mientras que, en los cultivos desarrollados a 8 y 15 % se obtuvo una velocidad de crecimiento de 0.13 ± 0.005 y $0.14 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Lo anterior indica que 4 % es la TOD crítica donde la bacteria alcanza su máximo crecimiento, por debajo de este valor la velocidad de crecimiento se ve afectada. En este sentido, Millán (2012) reportó que en cultivos a 1 % de TOD con la cepa OP y a 300 rpm, la velocidad específica de crecimiento disminuyó a 0.08 h^{-1} . Por otro lado, Peña y colaboradores (2000) estimaron una μ_{max} de 0.23 h^{-1} a 3 % de TOD con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046.

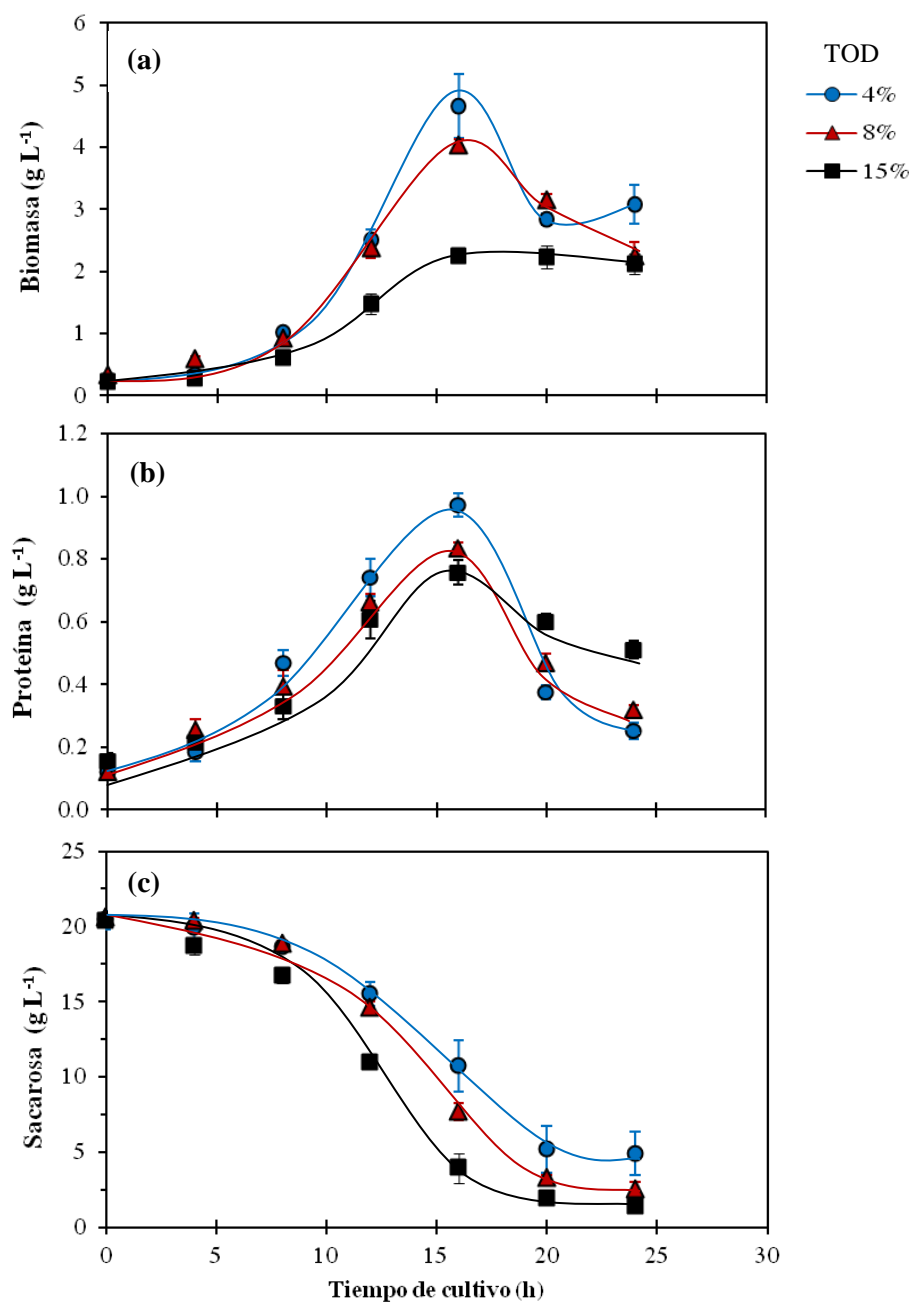


Figura 8.4 Cinéticas de crecimiento celular en peso seco (a), proteína (b) y consumo de sacarosa (c), en cultivos en lote con la cepa OP de *A. vinelandii* bajo diferentes TOD's.

En las cinéticas de crecimiento se puede observar que a 4 % se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 4.6 g/L a las 16 h de cultivo. Esta cantidad de biomasa fue similar a

los cultivos desarrollados a 8 %, donde se obtuvieron 4.0 g/L. Sin embargo, en los cultivos desarrollados a 15 %, la biomasa máxima disminuyó a 2.2 g/L. Una explicación a la menor concentración de biomasa es que mayores TOD's, se sintetiza una menor cantidad de PHB, como se confirma en los datos mostrados en la figura 8.5.

Por otro lado, es importante señalar que en todos los cultivos realizados (4, 8 y 15 %) después de las 16 h de cultivo ocurrió una disminución drástica de la concentración de proteína y el peso seco. Este comportamiento fue similar a lo observado anteriormente en los cultivos en matraces. Para demostrar que existe lisis celular, se hicieron análisis de viabilidad, donde se observó que después de las 16 h de cultivo hubo una disminución en el número de células viables cuantificada como unidades formadoras de colonias (UFC) de 1×10^9 células/mL a las 16 h a 1×10^6 células/mL a las 20 h de cultivo.

Como se puede observar más adelante, el pH aumentó hasta 8.5 al final de los cultivos realizados (figura 8.4c). Es probable que el incremento del pH sea el resultado de la liberación de proteínas básicas al medio, provocado por la muerte celular. Este fenómeno se puede comprobar con la disminución de la proteína celular cuantificada (figura 8.7b), la cual pudo haber sido liberada al medio extracelular.

Por otro lado, en la figura 8.4c se observa que en todos los cultivos realizados, la sacarosa no se agotó al final de la fermentación. Es importante señalar que la velocidad de consumo de sustrato en los cultivos realizados a 4 % de TOD fue de $0.15 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{prot}} \text{ h}$. El consumo de sacarosa fue menor en comparación con los cultivos realizados a 15 % de TOD donde fue de $0.43 \text{ g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{prot}} \text{ h}$. Sin embargo, a pesar de que en el cultivo a 15 % se consumió una mayor cantidad de carbono, este no se vio reflejado en el crecimiento celular (figura 8.4a). Se sabe que *A. vinelandii* tiene varias cadenas respiratorias desacopladas que se activan dependiendo de las condiciones de cultivo (Bertsova *et al.*, 2001). En este caso, cuando existe una alta TOD, se sintetizan complejos proteínicos como NADH oxidorreductasas que tienen mayor afinidad por el oxígeno pero sin producción neta de ATP, por lo que el

carbono oxidado a una alta TOD se libera en forma de CO₂ sin la producción de energía suficiente para el crecimiento celular (Linkerhågen y Oelze, 1996).

En cuanto a la producción de PHB, se observó que a 4 % de TOD (figura 8.5) se obtiene una acumulación del 83 % del polímero en base a su peso seco. Esta cantidad fue mayor en comparación con los cultivos desarrollados a 8 y 15 %, donde la acumulación del polímero fue de 75 y 60 % respectivamente. El aumento en el porcentaje de acumulación a bajas concentraciones de oxígeno está relacionado con el metabolismo de la bacteria, ya que cuando se cultiva a una baja concentración de oxígeno, la actividad de la NADH oxidasa disminuye, originando un aumento en la concentración de NADH, el cual inhibe la citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa. Dicho suceso provoca el aumento en los niveles de Acetil-CoA y NADH/NAD⁺, activando a la enzima β-cetotilasa, por lo que bajo esta condición se favorece una mayor biosíntesis del polímero (Galindo *et al.*, 2007). Se sabe también que la síntesis de PHB es una alternativa como aceptor de electrones (Jackson y Dawes, 1976).

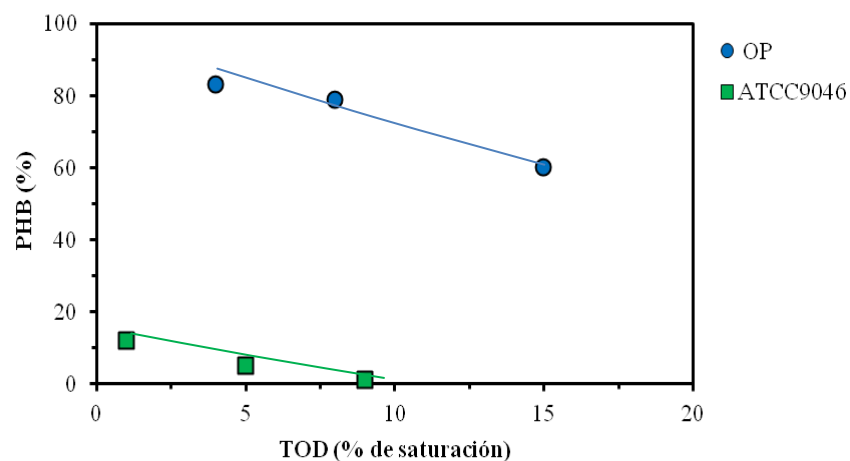


Figura 8.5 Porcentaje de PHB en cultivos en lote con las cepas *A. vinelandii* OP y ATCC9046, bajo diferentes TOD's. Datos tomados de Castillo *et al.*, (2012).

Por otro lado, en la cepa OP se alcanzan altos porcentajes de acumulación de PHB (60 %) a pesar de que la bacteria se crece a una alta TOD (15 %). Este comportamiento es diferente a

lo observado en otros trabajos. Por ejemplo, Castillo y colaboradores (2012), reportaron que en cultivos continuos en condiciones diazotróficas (fijación de nitrógeno) y utilizando glucosa como fuente de carbono, la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 sólo acumula el 10 % (con base en el peso seco) del polímero. Una explicación de esto se debe a que la cepa OP no produce alginato, por lo que existe una mayor movilización de la fuente de carbono hacia la síntesis de PHB (Jarman y Pace 1984).

De igual manera, se evaluó la concentración volumétrica de PHB. En los cultivos a 4 % de TOD (figura 8.6) se obtiene (a las 16 h de cultivo) una concentración máxima de 3.6 g/L. A diferencia de los cultivos desarrollados a 8 y 15 % de TOD en donde se obtiene una producción de 2.6 y 1.3 g/L de PHB respectivamente. En todas las condiciones evaluadas la producción del polímero estuvo asociada al crecimiento celular. La constante asociada a crecimiento (α), obtenida con la ecuación Luedeking-Piret, fue de 1.48 $\text{g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ en los cultivos realizados a 4 % de TOD. Resulta interesante resaltar que la síntesis de PHB en la cepa OP esté totalmente asociada al crecimiento, ya que se ha reportado que la acumulación de PHB en la cepa ATCC9046 está asociada a la fase estacionaria, es decir la síntesis del polímero se favorece sólo cuando existe limitación de algún nutriente (Peña *et al.*, 2002).

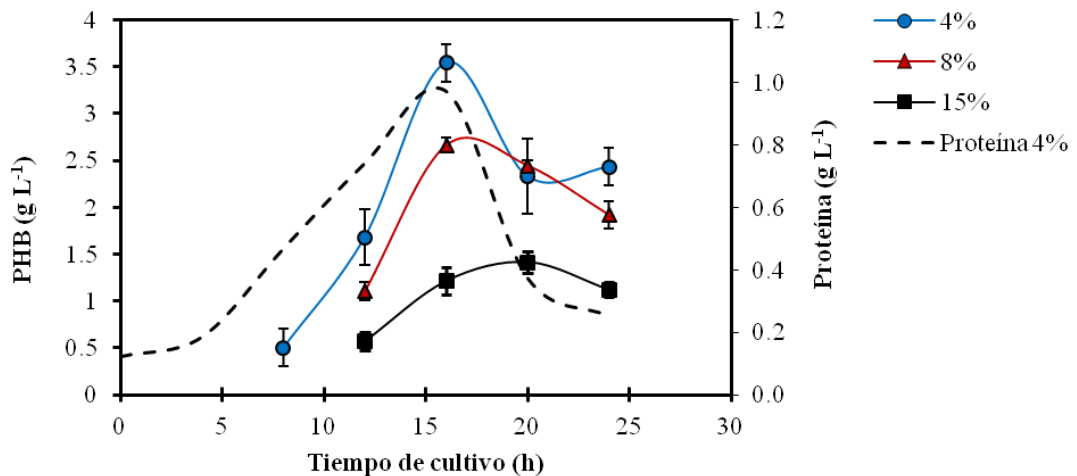


Figura 8.6 Producción volumétrica de PHB en cultivos en lote con la cepa *A. vinelandii* OP, bajo diferentes TOD's.

Posiblemente la producción de PHB asociada al crecimiento celular en la cepa OP se debe a que la bacteria no sintetiza alginato. Se sabe que la síntesis de alginato implica un elevado costo energético (Galindo *et al.*, 2007), por ello, gran parte de la fuente de carbono que entra a la bacteria se dirige a la síntesis de PHB.

Asimismo, a 4 % de TOD se obtuvo un mayor rendimiento en la producción de PHB (Y p/s), alcanzando un valor de $0.30 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$. En contraste, a mayores TOD's (8 y 15%) el rendimiento de PHB fue de 0.20 y $0.07 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$, respectivamente. Los resultados son consistentes con lo previamente reportado en la literatura, donde se sabe que existe un efecto positivo de la limitación de oxígeno en la producción de PHB (basado en rendimiento y contenido de PHB) empleando la cepa mutante UWD (Page y Knosp, 1989) y la cepa ATCC9046 (Peña *et al.*, 2011) de *A. vinelandii*.

Por otro lado, en la figura 8.7 se muestra el control típico de oxígeno disuelto (a), los perfiles de las válvulas de O₂ y N₂ (b), y el control de pH (c). Como se puede observar, el control de oxígeno se mantuvo cercano al valor establecido (*set point*) hasta las 16 h de cultivo calculándose la desviación estándar en esa región. Sin embargo, después de las 16 h de cultivo no fue posible controlar del oxígeno disuelto (figura 8.7a), lo que coincide con una disminución drástica en la apertura de la válvula de oxígeno (figura 8.7b). A partir de ese tiempo de cultivo, el pH aumentó hasta valores de 8.5 para todas las condiciones de TOD evaluadas (figura 8.7c). Lo anterior es un indicio de que el proceso ha terminado, debido a que la bacteria disminuyó su tasa respiratoria posiblemente por el agotamiento de algún nutriente en el medio de cultivo.

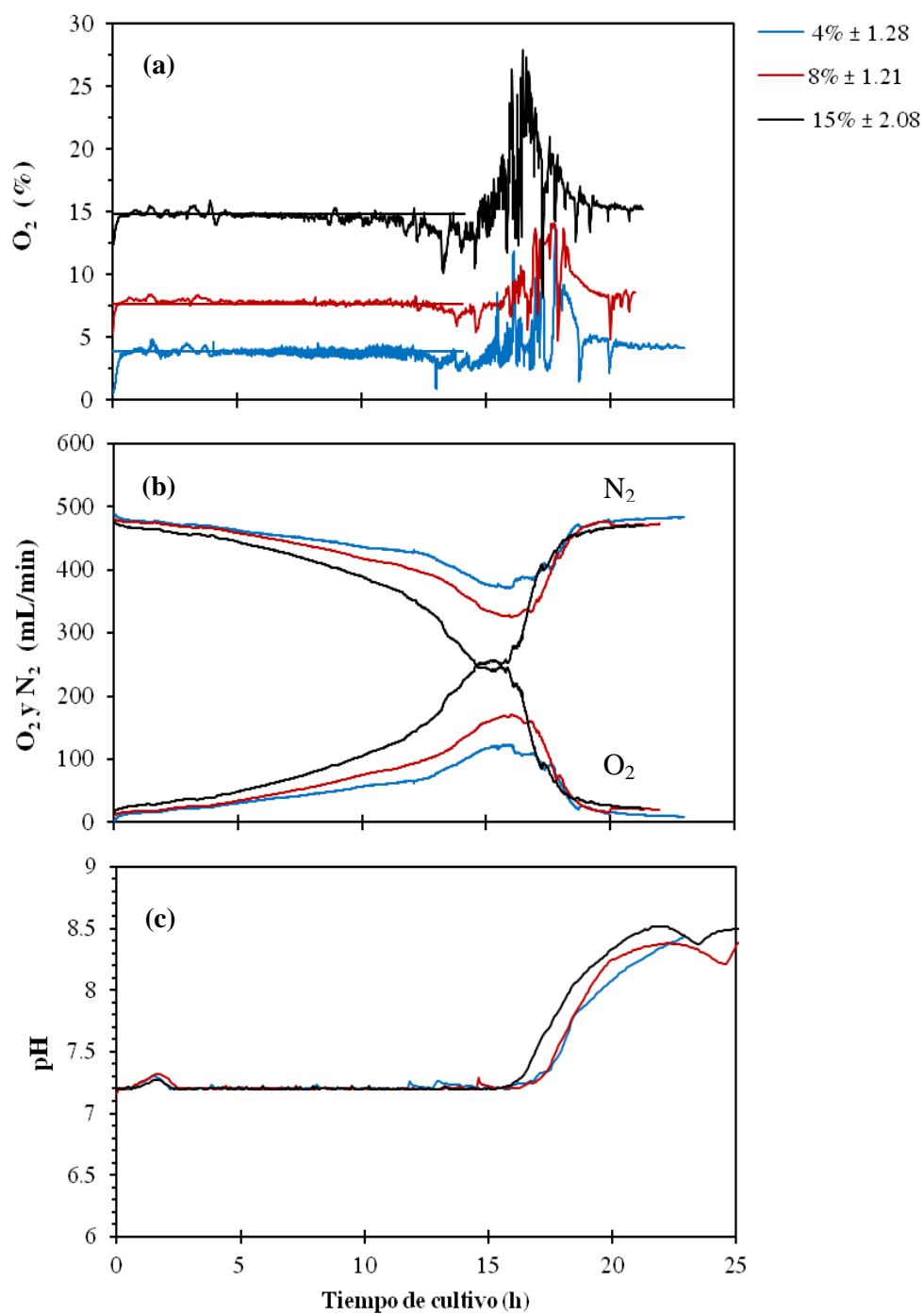


Figura 8.7 Perfiles de TOD (a), Flujo de O₂ y N₂ (b) y control de pH (c) en cultivos en lote desarrollados con la cepa *A. vinelandii* OP bajo diferentes TOD's.

Cabe señalar que el aumento en el pH ya ha sido observado en otros cultivos con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 (García, 2011, Flores, 2012). Como se mencionó anteriormente el incremento del pH posiblemente se debe a que se estén liberando proteínas básicas al medio de cultivo debido a la lisis celular, tal y como se observa en la figura 8.7b ocurrida después de las 16 h de cultivo. Lo anterior es congruente con lo reportado por Parente y colaboradores (1998), quienes observaron un aumento del pH en cultivos con *A. vinelandii* DSM576 lo cual atribuyen a la liberación de proteínas básicas al medio extracelular.

Es importante señalar que *A. vinelandii* posee una tasa de respiración mayor que la de cualquier otra bacteria conocida (Post *et al.*, 1983). En la figura 8.8 se muestra la velocidad específica de consumo de oxígeno de la cepa OP en comparación con la cepa ATCC9046 productora de alginato y PHB (calculada como se describe en la sección 7.5.5 de materiales y métodos).

Como se puede apreciar, la velocidad específica de consumo máximo de oxígeno en los cultivos a 4 % de TOD fue de $16 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En contraste Flores (2012) reportó un consumo tres veces mayor ($56 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en cultivos con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 a 5 % de TOD. Asimismo, Post y colaboradores (1983) reportaron que en cultivos a 20 % de TOD con la cepa ATCC 13705 (productora de PHB), la velocidad de consumo de la bacteria llega a valores de $75 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Una explicación a las diferencias observadas podrían deberse a que la cepa OP no produce alginato, debido a una mutación espontánea en el gen *algU*, el cual codifica para el factor σE (involucrado en la activación transcripcional de los genes biosintéticos de alginato). Es sabido que cuando se sintetiza alginato el metabolismo respiratorio de la bacteria incrementa debido a una mayor actividad de las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, lo que provocaría una mayor producción de poder reductor para la síntesis de ATP, necesario para la síntesis del alginato el cual es demandante de energía (Jarman y Pace 1984). Por otro lado, se sabe que el factor σE está implicado en la transcripción de varios genes de la bacteria, como el gen

cydR, el cual regula la transcripción de los genes *cydAB* que codifican para los complejos proteínicos de la cadena respiratoria desacoplada (León y Espín, 2008).

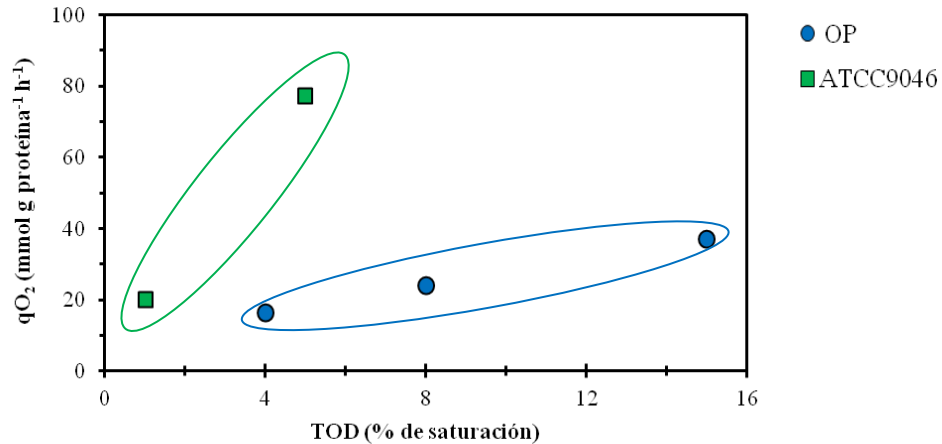


Figura 8.8 Influencia de la TOD sobre la velocidad específica de consumo de oxígeno en cultivos con las cepas *A. vinelandii* OP y ATCC9046 (Flores, 2012).

Es importante señalar que, en cultivos aerobios la medición de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) es un excelente indicador de las diferentes respuestas fisiológicas que presentan los cultivos (Anderlei y Büchs 2001). Por ello, se realizó el cálculo de la VTO en los cultivos realizados bajo las diferentes TOD's. Para los cultivos realizados se calculó un k_{La} de 101 h^{-1} . En todos los casos, se alcanzó el valor máximo de la VTO durante el periodo de crecimiento celular, alcanzándose una VTO_{\max} de 26, 30 y $38 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en los cultivos realizados a 4, 8 y 15 % de TOD respectivamente.

Actualmente existen reportes en cultivos lote y quimiostato con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046, donde se ha evaluado la relación entre la respuesta fisiológica de la bacteria y la VTO. En este sentido, Díaz-Barrera y colaboradores (2007) observaron que en cultivos con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 al disminuir la VTO (mediante la disminución de la agitación) también se favorece la acumulación de PHB. Por otra parte, Lozano y colaboradores (2011), en cultivos lote con la cepa ATCC9046 a 5 % de TOD y a una

agitación de 700 rpm calcularon una VTO máxima de $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Estos autores encontraron que a mayor VTO se obtenía una máxima velocidad de crecimiento de 0.23 h^{-1} .

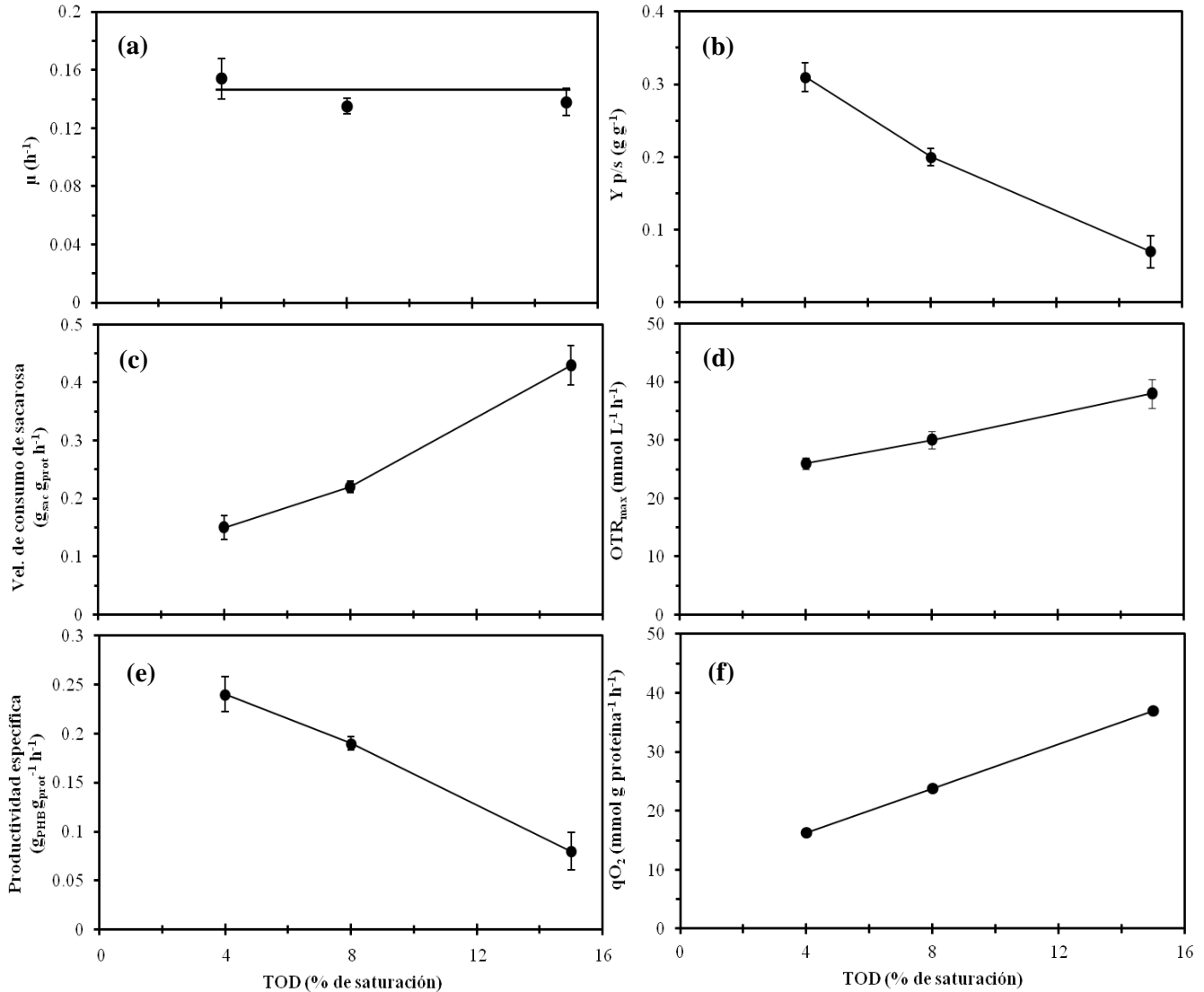


Figura 8.9 Parámetros obtenidos a partir de los cultivos desarrollados con la cepa *A. vinelandii* OP bajo diferentes TOD (4, 8 y 15%).

En la figura 8.9 se muestran los parámetros calculados para cada una de las condiciones empleadas. Es interesante señalar que a 4 % de TOD es donde se obtiene el mayor crecimiento celular y producción de PHB (3.6 g/L). El rendimiento de PHB con base en

sustrato ($Y_{p/s}$), bajo esta condición, fue de $0.30 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$. Asimismo, se mejoró la productividad del polímero de PHB ($0.24 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{prot}} \text{ h}^{-1}$), respecto a los cultivos realizados a 8 y 15 % de TOD.

Con base en los resultados anteriores, los cultivos con la cepa OP a 4 % de TOD permitieron el uso más eficiente de la fuente de carbono para la producción de biomasa y síntesis de PHB (figura 8.10). Asimismo, se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento (0.16 h^{-1}) y una mayor acumulación de PHB (82 %). Por ello, en la siguiente etapa se decidió realizar cultivos con la cepa OPNA bajo esta misma condición. Cabe señalar que los cultivos a una menor TOD (4 %) son ventajosos debido a que no se requiere una mayor cantidad de oxígeno para favorecer el crecimiento y producción de PHB.

8.3 Cultivos en lote a 4% de TOD con la cepa OPNA

Los cultivos con la cepa OPNA se hicieron por triplicado. En las figuras se muestra las barras de error para mostrar la reproducibilidad de los datos. En la figura 8.10 se presentan las cinéticas de los cultivos realizados a 4% con la cepa OP y OPNA. Como se puede observar, ambos cultivos tuvieron un comportamiento similar en el crecimiento con base en proteína y biomasa (figuras 8.10a y 8.10b), así como en el consumo de sacarosa (8.10c).

La velocidad específica de crecimiento calculada para el cultivo con la cepa OPNA fue de $0.16 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$, igual al cultivo con la cepa OP. La concentración máxima de biomasa fue de 4.7 ± 0.50 y $4.5 \pm 0.22 \text{ g/L}$ para la cepa OPNA y OP respectivamente. Asimismo, los rendimientos de biomasa con base en sustrato ($Y_{x/s}$) fueron semejantes en ambos cultivos. Se obtuvo un valor de $0.53 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ para el cultivo con la cepa OPNA, y $0.48 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ para el cultivo con la cepa OP.

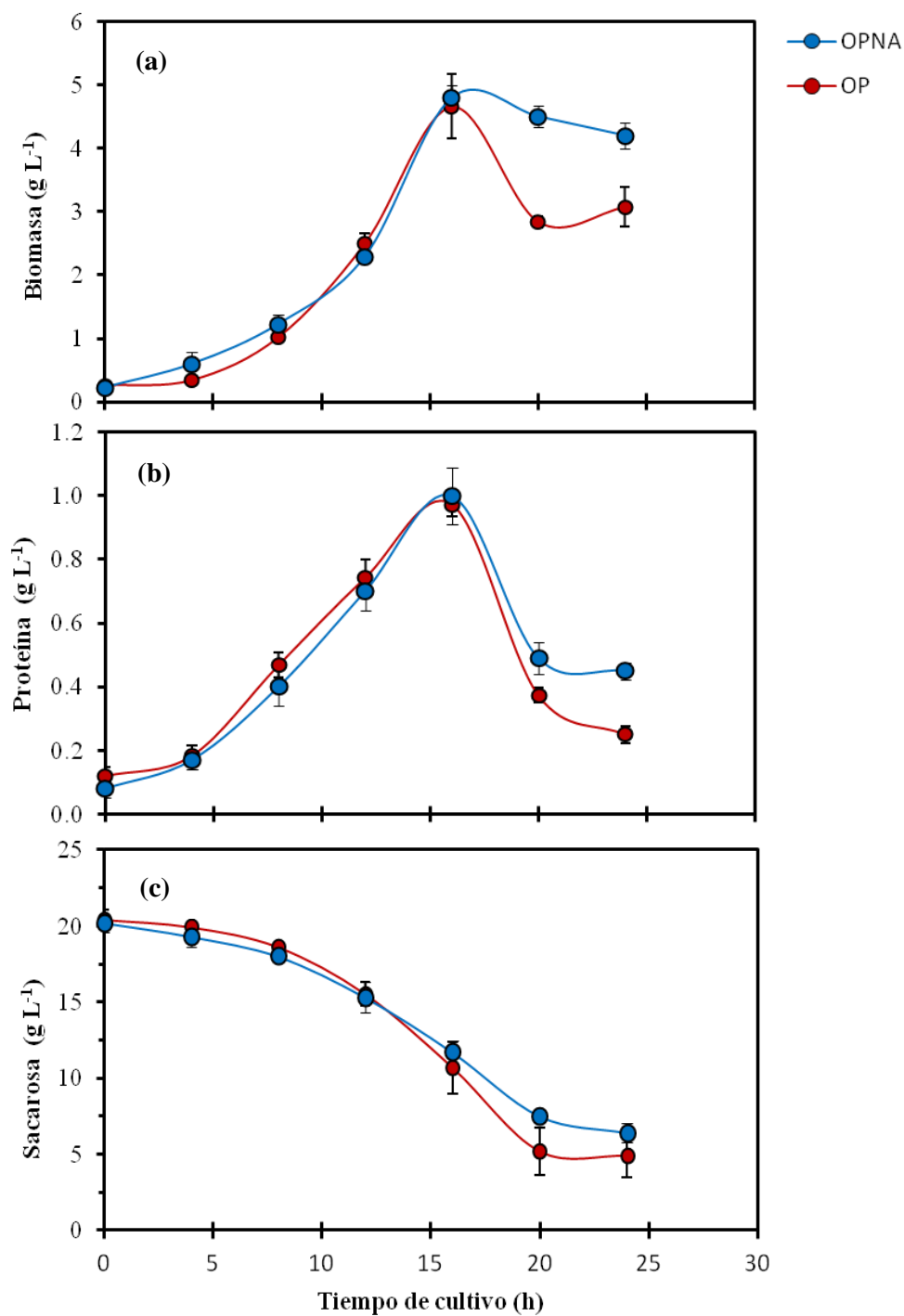


Figura 8.10 Cinética de crecimiento celular en base a proteína (a), biomasa (b) y consumo de sustrato (c), en cultivos a 4 % de TOD, con la cepa *A. vinelandii* OP y OPNA.

Por otro lado, al calcular la acumulación de PHB, se encontró que la cepa OPNA acumuló 85 % del polímero a las 16 h de cultivo (figura 8.11). El porcentaje de acumulación fue ligeramente mayor en comparación con la cepa OP donde la acumulación de PHB fue del 82 %. Este incremento en la síntesis de PHB en la cepa OPNA se debe al genotipo de la bacteria, la cual tiene inhibido los sistemas de regulación PTS^{Ntr} y $RsmA/RsmZY$ que actúan negativamente en la síntesis de PHB. Asimismo, en ambos cultivos se siguió la cinética de producción de PHB (figura 8.11). A las 16 h de cultivo con la cepa OPNA y OP se alcanzaron 4.0 y 3.6 g/L de PHB respectivamente.

Como se puede observar en los cultivos en lote, la producción del polímero fue 11 % mayor con la cepa OPNA en comparación con la cepa OP. Este comportamiento fue similar en los cultivos en matraces, donde se observó que la producción del polímero fue mayor con la cepa OPNA. Con base a los resultados obtenidos, en la siguiente etapa se decidió empezar los cultivos exponencialmente alimentados con la cepa OPNA a 4 % de TOD.

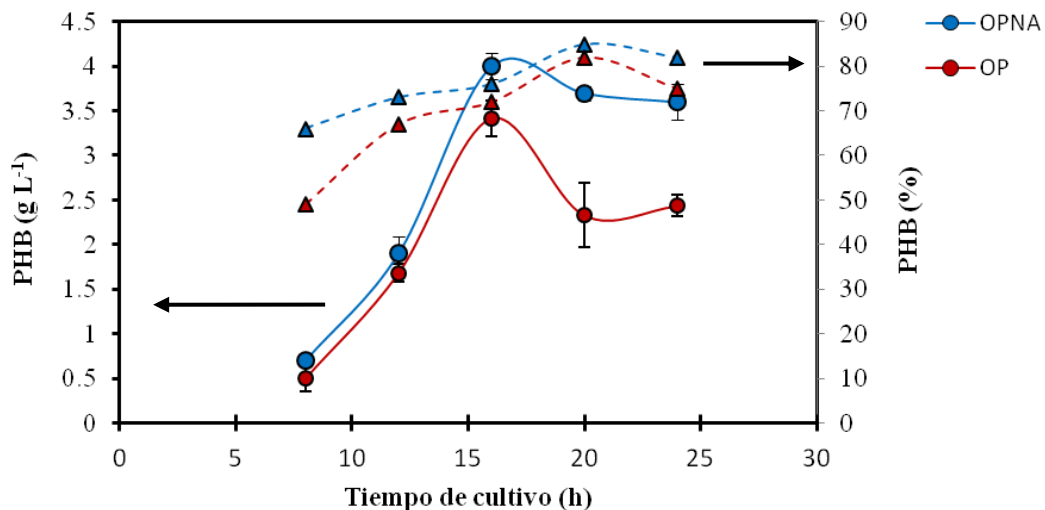


Figura 8.11 Producción volumétrica y porcentaje de PHB en cultivos en lote con la cepa *A. vinelandii* OP y OPNA, a 4 % de TOD.

Capítulo 3

CULTIVOS ALIMENTADOS

8.4 Cultivos alimentados exponencialmente con la cepa OPNA

Habiendo definido las condiciones de cultivo (medio PY y 4 % de TOD), en esta parte del trabajo se llevaron a cabo cultivos exponencialmente alimentados con la cepa OPNA, bajo las condiciones descritas en la metodología. El flujo de alimentación exponencial (sección 7.3.3 de materiales y métodos) se calculó para una velocidad de crecimiento de 0.16 h^{-1} .

En la figura 8.12 se muestran las cinéticas del cultivo exponencialmente alimentado. Las líneas punteadas verticales indican el tiempo de alimentación iniciado a las 10 h. Como se observa en la figura 8.12a, el control de oxígeno se mantuvo a 4 % de TOD. En la figura 8.12c se observa el control de pH, el cual se mantuvo constante en 7.2 durante todo el cultivo. Por otro lado, en cuanto a las cinéticas de crecimiento (figura 8.12d), a las primeras 5 h de alimentación se obtuvo un crecimiento exponencial con una velocidad de crecimiento de 0.16 h^{-1} , similar al valor que se obtuvo para la etapa en lote. Posteriormente, la velocidad de crecimiento disminuyó a 0.04 h^{-1} . La disminución del crecimiento celular se ve reflejado en una disminución del consumo de sustrato, debido a ello se presenta una acumulación de sacarosa pasando de 15 a 34 g/L en el mismo periodo (figura 8.12f).

Posiblemente el exceso de aminoácidos presentes en la peptona y extracto de levadura estén ocasionando una inhibición en el crecimiento celular. Como se había mencionado anteriormente, existen reportes en la literatura que parecen apoyar esta idea. Page y Cornish (1993) observaron que la glicina proveniente de la peptona, en combinación con otros aminoácidos como la metionina, triptófano y fenilalanina tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento celular debido a que glicina interfiere con la síntesis de peptidoglicano, el cual forma parte de la pared celular de las bacterias.

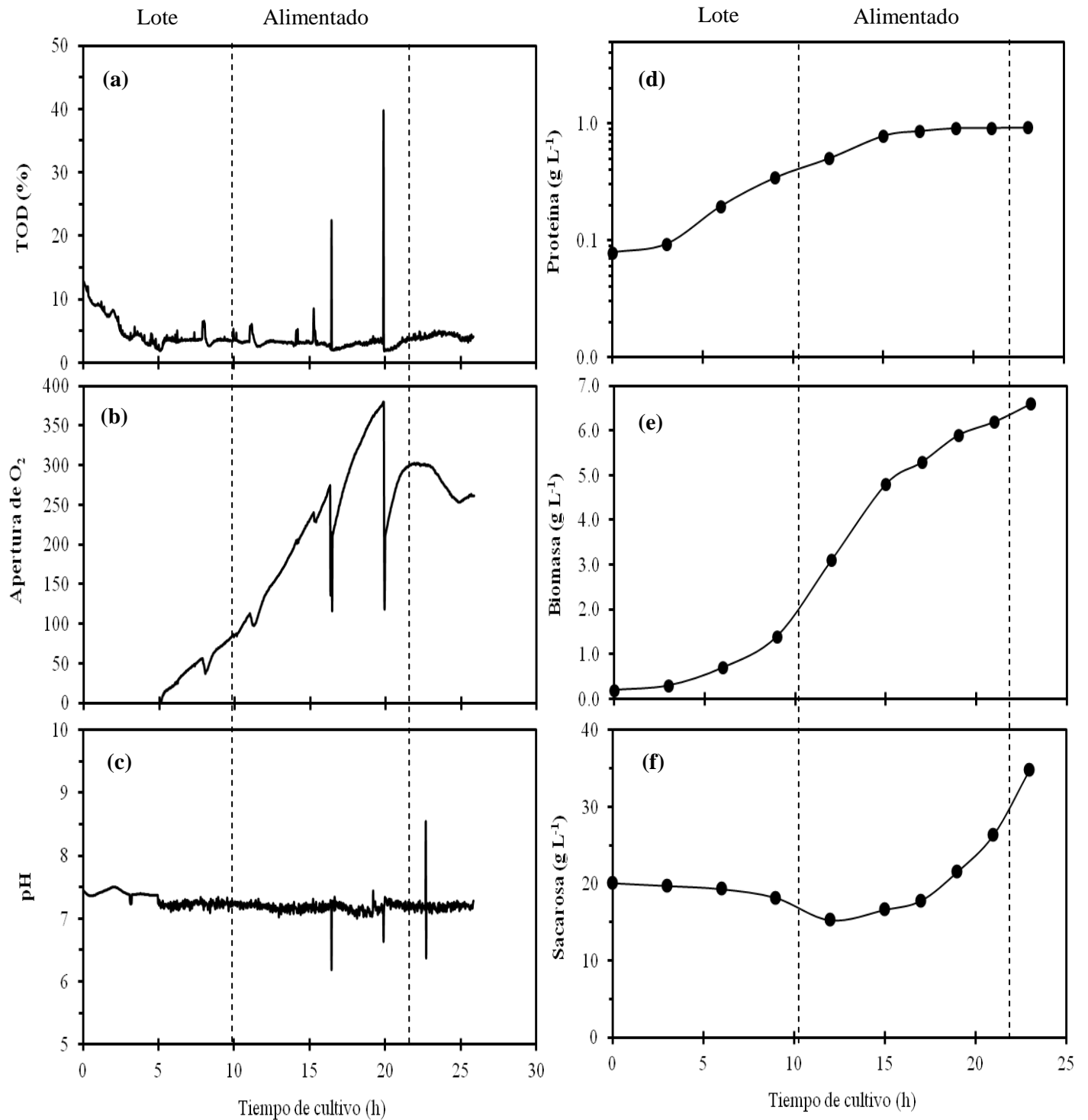


Figura 8.12 Control de oxígeno (a), Apertura de la válvula de oxígeno (b), control de pH (c), cinética de crecimiento celular con base en proteína (d), peso seco (e) y consumo de sustrato (f), en cultivos alimentados a 4 % de TOD con la cepa *A. vinelandii* OPNA.

En este sentido la glicina origina la acumulación de UDP-glicopéptido, el cual al acumularse en el citoplasma causa pleomorfismo en la célula así como debilitamiento de la pared celular al inhibir la síntesis de peptidoglicano. Debido a que continuamente se alimenta peptona al medio de cultivo, llega un momento que la concentración de glicina puede ser lo suficientemente alta para afectar el crecimiento celular. Se sabe que la concentración de glicina necesaria para promover el pleomorfismo en *A. vinelandii* es de 38 a 50 mg/L. Sin embargo, se requieren de más estudios para dilucidar el factor que afecta el crecimiento de *A. vinelandii*.

Por otra parte, la cantidad de PHB alcanzada al final del cultivo alimentado fue de 4.5 g/L (figura 8.13). En el cultivo la bacteria sintetizó el 79 % del polímero en base a su peso seco. Como se había mencionado anteriormente, la síntesis del polímero está asociada al crecimiento celular. Se puede observar en la figura 8.12d que el crecimiento celular (medido como proteína) llega a la fase estacionaria. Sin embargo, la concentración de biomasa (medido como peso seco) sigue aumentando debido a la síntesis de PHB, dado que aun existe disponibilidad de sacarosa en el medio (figura 8.12e).

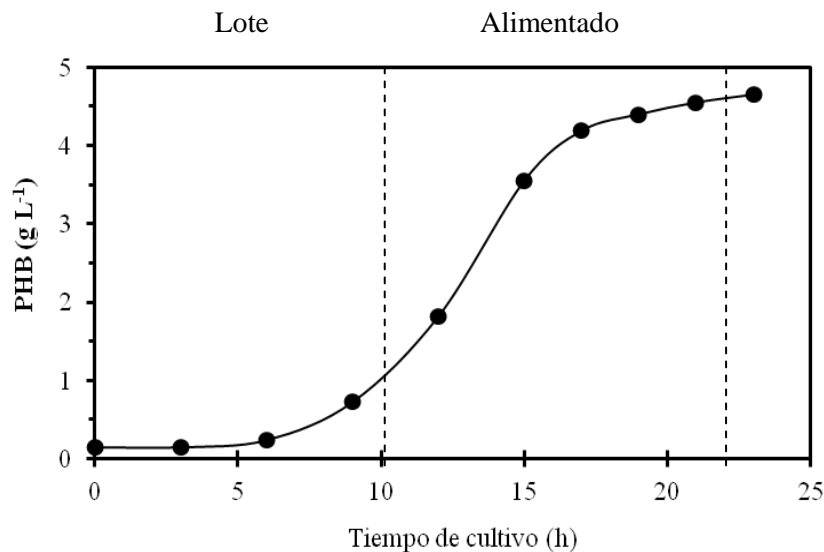


Figura 8.13 Producción de PHB en cultivo lote alimentado con la cepa *A. vinelandii* OPNA, a 4 % de TOD.

Debido a que todavía existe suficiente sacarosa en el medio, se decidió realizar un nuevo cultivo, prolongando el tiempo de fermentación una vez terminada la etapa de alimentación. En la figura 8.14 se observan los perfiles de las cinéticas de crecimiento en términos de la producción de biomasa y proteína, así como el consumo de sacarosa. Asimismo, en cada uno de los gráficos se hace una comparación con el primer cultivo alimentado (líneas punteadas). Los parámetros calculados en la etapa lote y alimentado para ambos cultivos fueron similares. Se calculó una velocidad de crecimiento de $0.14 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ en la etapa lote. Sin embargo, de igual manera que el primer cultivo al poco tiempo de iniciar la alimentación la velocidad de crecimiento disminuyó a 0.05 h^{-1} . Posteriormente, la velocidad de crecimiento se mantuvo constante (0.05 h^{-1}) hasta las 33 h, después de ese tiempo se observó que la bacteria llega a la fase estacionaria (figura 8.14a).

Nuevamente la disminución de la velocidad de crecimiento en la etapa de alimentación se vio reflejada en el consumo de sacarosa (figura 8.14c), donde fue evidente que a partir de las 16 h empieza acumularse el sustrato hasta llegar a 37 g/L a las 25 h de cultivo (tiempo en que termina la alimentación). Posteriormente, a las 26 h empieza una etapa “post alimentación” donde se aprecia un consumo del 32 % del total de sacarosa.

Cabe señalar que en la etapa de alimentación, la bacteria no estuvo limitada por algún nutriente ya que continuamente se alimentaron todos los componentes del medio de cultivo (sacarosa, extracto de levadura y peptona). Sin embargo, en la etapa de post alimentación, después a las 35 h de cultivo, la bacteria cesa su crecimiento lo que sugiere que existe el agotamiento de un nutriente distinto a la sacarosa.

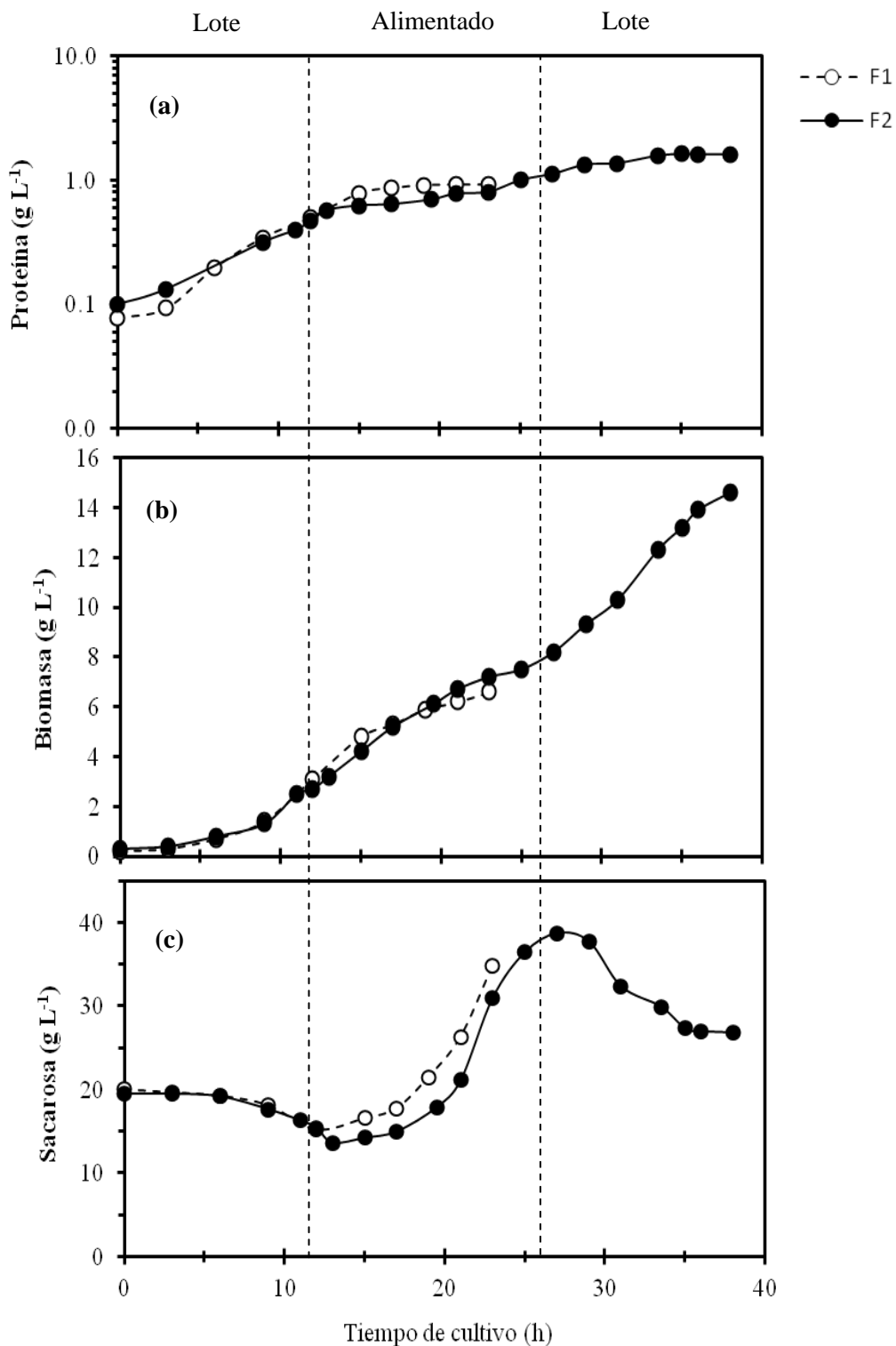


Figura 8.14 Cinética de crecimiento celular con base en proteína (a), peso seco (b) y consumo de sustrato (c), en el primero (F1) y segundo (F2) cultivos alimentados a 4 % de TOD, con la cepa *A. vinelandii* OPNA.

Se sabe que en el extracto de levadura están presentes compuestos complejos como aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos. Sin embargo, al ser *A. vinelandii* una bacteria fijadora de nitrógeno, la falta de aminoácidos no parece ser una limitante en el crecimiento (Espín, 2000). Por ello, se propone que posiblemente exista un déficit de elementos trazas presentes en el medio. La importancia de estos compuestos, radica en que algunos de ellos mantienen polarizada la membrana, y otros más funcionan como cofactores para el funcionamiento de enzimas importantes como la nitrogenasa, DNA polimerasa, etc. Dado que estos elementos trazas son importantes para el funcionamiento de la bacteria, su falta puede ocasionar un déficit en el crecimiento.

A pesar de que existe una limitación del crecimiento (medido como proteína) al final del cultivo, la cantidad de biomasa incrementó hasta 14.5 g/L (figura 8.14b), dos veces más que el primer cultivo donde se alcanzan 6 g/L. En cuanto al porcentaje de PHB acumulado en las células se sintetizó alrededor del 73 % de PHB en base a su peso seco, valor ligeramente menor al calculado en el primer cultivo, donde se obtuvo una acumulación del 79 %. Al final de la fermentación se cuantificaron 8.8 g/L de PHB (figura 8.15). Sin embargo, como se observó anteriormente, la biomasa siguió aumentando a pesar de que disminuyó la velocidad de crecimiento (0.05 h^{-1}), por lo que el incremento en la biomasa es debida únicamente a la síntesis de PHB.

Cabe señalar que en experimentos realizados en nuestro laboratorio a nivel de matraz, variando la composición del medio PY con la cepa OPNA, se demostró que la ausencia de peptona no influye en el crecimiento de la bacteria. Tomando en cuenta lo anterior, y debido a que la glicina proveniente de la peptona tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento celular, se decidió en etapas posteriores del cultivo hacer pulsos sólo de extracto de levadura y sacarosa.

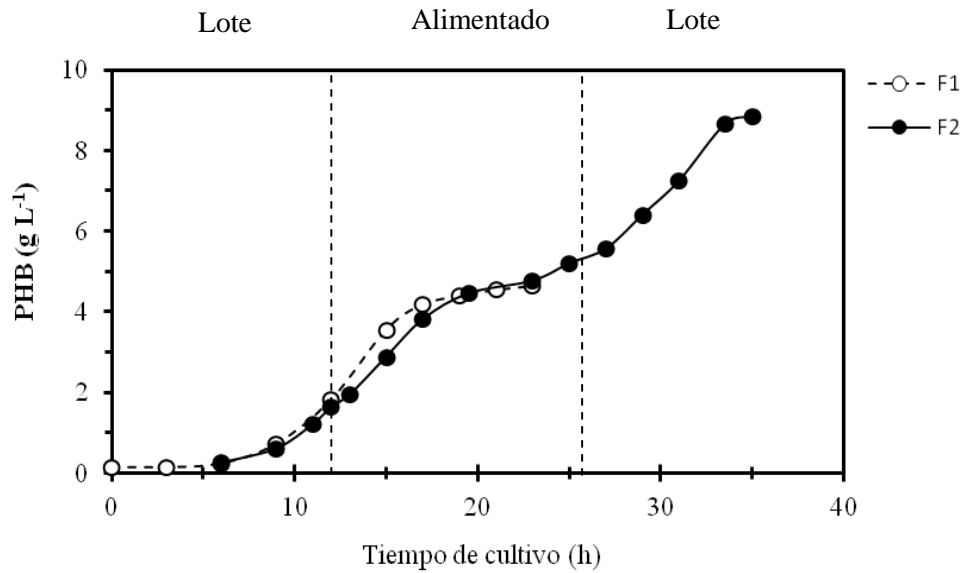


Figura 8.15 Producción de PHB en el primero (F1) y segundo (F2) cultivo alimentado con la cepa *A. vinelandii* OPNA, a 4 % de TOD.

8.5 Cultivos alimentados con pulsos

Con el propósito de calcular la cantidad mínima de sacarosa y extracto de levadura para alimentar el cultivo y llegar a una concentración de 14 g/L de biomasa, se llevó a cabo un balance estequiométrico (sección 7.3.4 de materiales y métodos). El balance dio como resultado 10 g/L de extracto de levadura y 30 g/L de sacarosa para alcanzar dicha concentración de biomasa. Sin embargo, sólo se alimentó 10 g/L de sacarosa, ya que al momento de realizar el pulso quedaban 20 g/L de sacarosa residual.

Para el cálculo del balance estequiométrico se requirió saber el coeficiente respiratorio de la bacteria. Para ello, se determinó un coeficiente respiratorio (RQ) de 1.20 para la cepa OPNA bajo las condiciones evaluadas (sección 7.3.4 de materiales y métodos). El valor calculado fue similar a lo reportando por Sabra *et al.*, (1999) donde reportan un RQ de 1.33 para la cepa *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 cuando se favorece la ruta metabólica de la

síntesis de PHB. Asimismo, Peña y colaboradores (2011) reportaron un RQ de 1.21 en cultivos en matraces con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 cuando la fuente de carbono se transforma preferentemente en PHB, a diferencia de cultivos donde se obtiene un RQ de 0.95, resultado de una mayor conversión de fuente de carbono a alginato.

Una vez conocida la cantidad de sustrato necesaria para el crecimiento y producción de PHB, se realizaron cultivos alimentados con pulsos de extracto de levadura y sacarosa. En la figura 8.16 se muestran los perfiles de las cinéticas de crecimiento con base en proteína y biomasa, así como producción de PHB y consumo de sacarosa. El experimento se realizó por duplicado y se graficaron las dos réplicas para mostrar la reproducibilidad de los datos. Cabe señalar que se adicionó 10 y 15 g/L de sacarosa en cada uno de los cultivos así como 10 g/L de extracto de levadura en ambos cultivos. Cada proceso fermentativo constó de tres etapas (lote, lote alimentado y pulsos), las cuales son separadas por las líneas punteadas. Estos cultivos fueron denominados “A” para poder diferenciarlos del cultivo siguiente.

De acuerdo a lo estimado, la concentración de biomasa aumentó cerca de 14 g/L al momento de adicionar los pulsos de sustratos (36 h) pasando de 11 a 24.7 g/L a las 60 h de cultivo (figura 8.16b). Después de ese tiempo, se observó una disminución en la concentración de biomasa debido al agotamiento de la fuente de carbono (figura 8.16d).

Como se puede observar ambos cultivos fueron similares en la cantidad de biomasa y PHB alcanzada. Asimismo, la cantidad de proteína fue ligeramente similar en ambos cultivos (3.3 g/L).

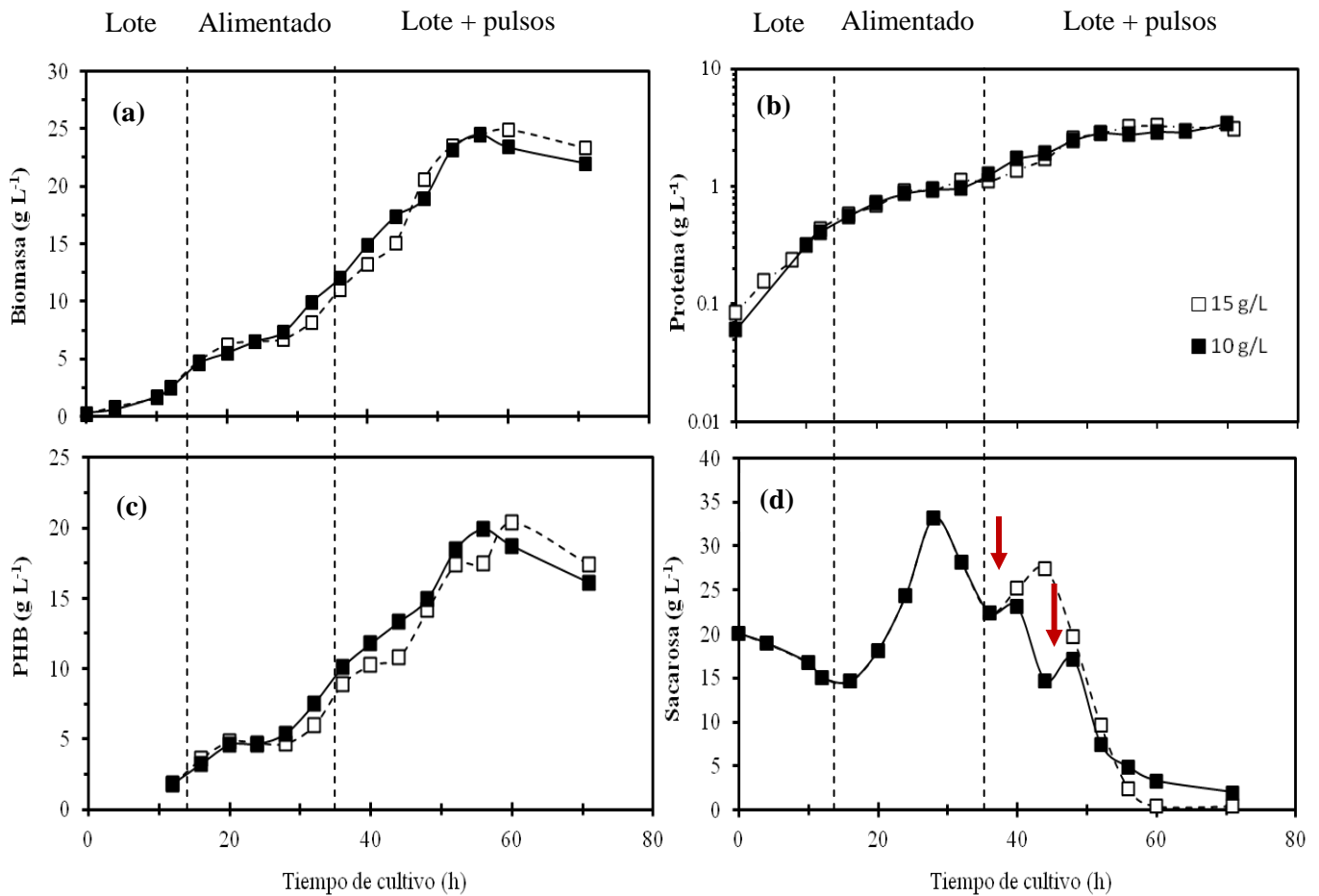


Figura 8.16 Cinéticas de crecimiento celular con base en proteína (a), peso seco (b), producción de PHB (c) y consumo de sacarosa (d), en los cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD, con la cepa *A. vinelandii* OPNA con pulsos de 10 y 15 g/L de sacarosa. Con flechas se señala el momento en que se realizaron los pulsos de nutrientes.

En la figura 8.16c se puede apreciar que se alcanzaron 19.5 g/L de PHB a las 60 h de cultivo en ambos cultivos. Después de ese tiempo se observó una disminución de la concentración del polímero. Es evidente que la producción de PHB está relacionada con el crecimiento de la bacteria, por lo que su concentración se incrementa continuamente hasta el agotamiento de la fuente de carbono. A partir de ese momento, la concentración de PHB

disminuyó debido a que es utilizado por la bacteria. Por otro lado, debido a que se incrementó la concentración de células en la etapa donde se realizaron los pulsos, la velocidad de consumo volumétrico de sacarosa fue 3.5 y 1.5 veces mayor, en comparación con las etapas en lote y lote alimentado, respectivamente. Sin embargo, el consumo específico de sacarosa fue similar en las tres etapas de cultivo ($0.12-0.14 \text{ g}_{\text{sacarosa}} \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Con el propósito de incrementar aún más la concentración de PHB se decidió realizar un cultivo denominado “B” en donde se aumentó al doble la concentración inicial de sustratos al momento de realizar los pulsos (20 y 40 g/L, de extracto de levadura y sacarosa respectivamente). En la figura 8.17 se muestra el perfil de la cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa, así como la producción de PHB, y consumo de sacarosa. La concentración de proteína incrementó a 5.9 g/L a las 60 h de cultivo, después de ese tiempo hubo una ligera disminución del crecimiento (figura 8.17a). La producción de biomasa (figura 8.17b) incrementó hasta 39.5 g/L a las 60 h de cultivo. Asimismo, la producción del polímero (figura 8.17c) llegó a 30 g/L con un 75 % de acumulación con base al peso seco de la bacteria. Después de las 60 h de cultivo se observó que la fuente carbono se agotó completamente (figura 8.17d), lo cual coincide con una disminución de la biomasa debido al consumo de PHB (figura 8.17c).

Cabe señalar que la concentración de PHB obtenida aquí es el más alta reportado para el género *Azotobacter* en cultivos fed-batch. Por ejemplo, Kim y Chang (1998) reportan 25 g/L de PHB en *A. chroococcum* en cultivos alimentados con almidón. Por otro lado, Page y Cornish (1993) reportaron 25 g/L de PHB en cultivos alimentados con glucosa y peptona de pescado con la cepa *A. vinelandii* UWD.

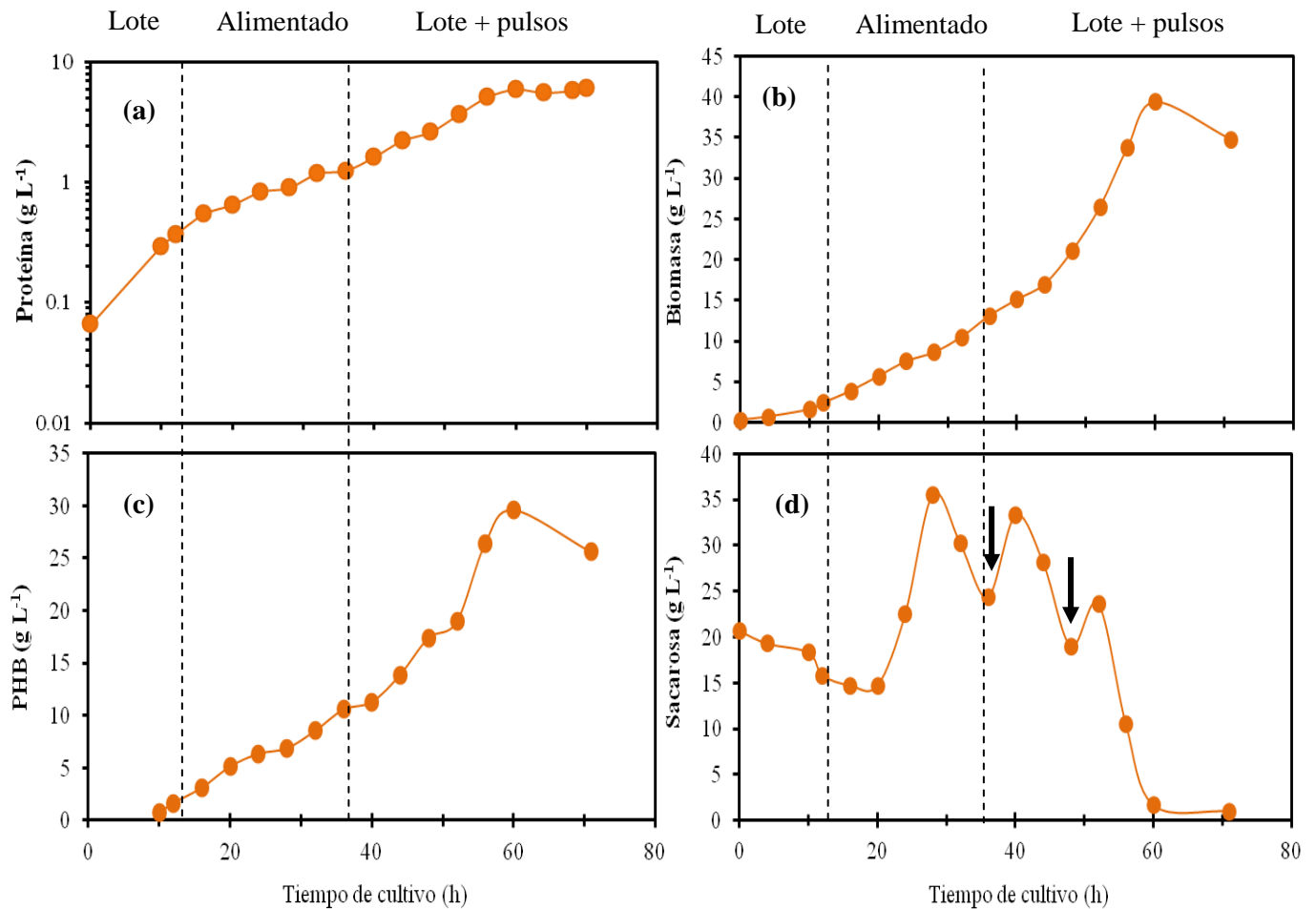


Figura 8.17 Cinéticas de crecimiento celular con base en proteína (a), peso seco (b), producción de PHB (c) y consumo de sacarosa (d), con una concentración inicial de 20 y 40 g/L de extracto de levadura y sacarosa respectivamente, en cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD, con la cepa *A. vinelandii* OPNA. Con flechas se señala el momento en que se realizaron los pulsos de nutrientes.

En la figura 8.18 se muestra el rendimiento de PHB con base en sustrato ($Y_{p/s}$), el cual se mantuvo constante durante las tres etapas del proceso ($0.31 \text{ g}_{\text{PHB}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$). Cabe señalar que el rendimiento de PHB obtenido fue similar al reportado por otros autores. Page y Cornish (1993) llevaron a cabo cultivos alimentados y observaron que la mejor condición para la

producción óptima de PHB consistió en iniciar la fermentación con un medio de glucosa, alimentando posteriormente una solución con 5% (p/v) de glucosa y 0.1% (p/v) de peptona de pescado. Como resultado de la estrategia anterior, se obtuvieron a las 37 h de cultivo una producción volumétrica de 25 g/L de PHB y un rendimiento ($Y_{p/s}$) de 0.32 $g_{PHB}/g_{sacarosa}$.

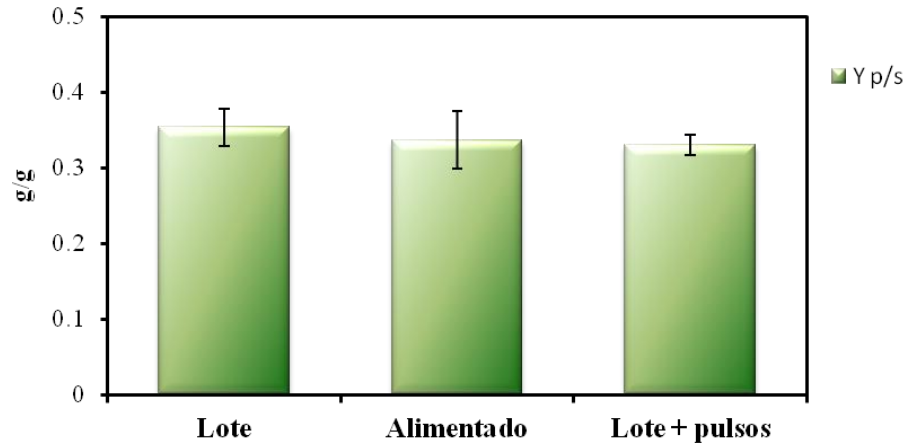


Figura 8.18 Rendimiento de PHB con base en sustrato en cada una de las etapas de los cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD (Cultivos A y B), con la cepa *A. vinelandii* OPNA.

Por otro lado, como se puede observar en la figura 8.19, el porcentaje de proteína en todos los cultivos fue de 20 % al inicio de la etapa en lote. Sin embargo, al momento de iniciar la alimentación del cultivo, el porcentaje disminuyó a valores cercanos al 12 %, manteniéndose constante a lo largo de las dos etapas (lote alimentado y pulsos). En cambio, el porcentaje de PHB fue del 65% a las 12 h de cultivo, incrementándose hasta el 80 % al iniciar la etapa de alimentación.

En la figura 8.20 se muestra una correlación entre la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de PHB con base en proteína. En general, los resultados indican que el rendimiento de PHB aumentó cuando el cultivo se desarrolló a bajas velocidades de crecimiento.

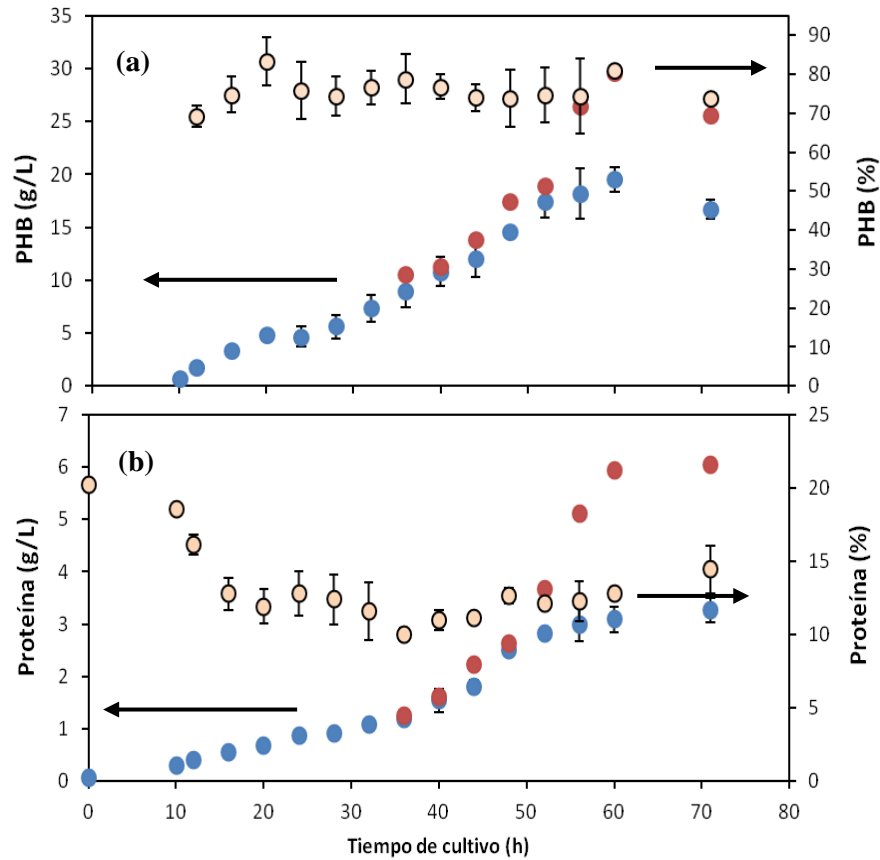


Figura 8.19 Producción y porcentaje de acumulación de PHB (a) y proteína (b), en los cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD (Cultivos A y B), con la cepa *A. vinelandii* OPNA.

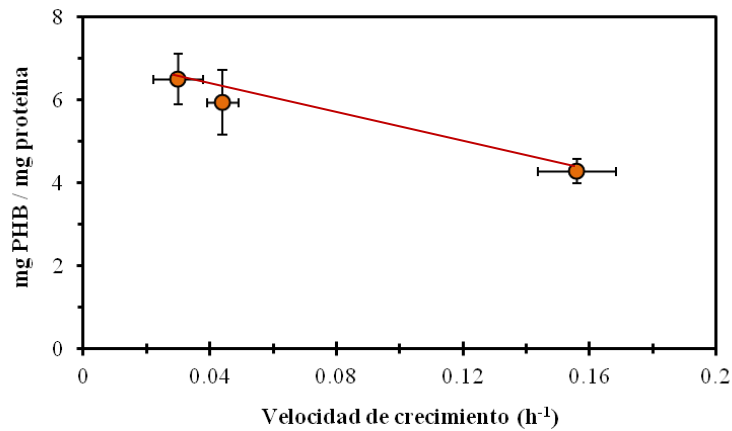


Figura 8.20 Correlación de la velocidad específica de crecimiento y rendimiento mg PHB/mg proteína, en cultivos alimentados con pulsos a 4 % de TOD (Cultivos A y B), con la cepa *A. vinelandii* OPNA.

Estos resultados concuerdan a lo reportado por Castillo y colaboradores (2012), quienes observaron que en cultivos en quimiostato con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046, al disminuir la velocidad de crecimiento a 0.02 h^{-1} hay una mayor canalización de la fuente de carbono hacia la síntesis de PHB. En contraste, en los cultivos donde se incrementa la velocidad de crecimiento a 0.15 h^{-1} , se favorece la generación de biomasa y baja el rendimiento de PHB. Como se comentó anteriormente la síntesis del polímero en la cepa OPNA se presenta durante el crecimiento de la bacteria. Posiblemente lo anterior se debe a la mutación en el gen *algU*, ya que parte de la fuente de carbono se dirige a la síntesis de PHB. Asimismo la síntesis de PHB siempre se encuentra activada debido a que existe un bloqueo en los dos sistemas de regulación negativa en la síntesis del polímero. Por otro lado, se ha reportado que en la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 la producción del polímero está controlada por el regulador RpoS la cual se activa durante la fase estacionaria de la bacteria cuando existe una limitación de algún nutriente (Hernández-Eligio *et al*, 2011). Debido a que la cepa OPNA presenta el regulador RpoS posiblemente los dos procesos en la síntesis del polímero están ocurriendo tanto en el crecimiento celular así como en la fase estacionaria. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios para elucidar el mecanismo de regulación del polímero.

En la figura 8.21 se muestra un resumen de la producción volumétrica y productividad del polímero en cada una de las etapas de cultivo realizadas en este trabajo. Como se puede apreciar, la producción de PHB, así como la productividad fueron significativamente mayores en cultivos alimentados con la adición de pulsos de sacarosa y extracto de levadura. Es importante resaltar que la concentración de proteína se incrementó 1.8 veces en cultivos los alimentados, 4.1 en los primeros cultivos con pulsos de sustrato y 6.8 veces en el segundo cultivo con pulsos (aumentado el doble la concentración inicial de sustratos), en comparación con los cultivos realizados en lote. De igual manera, la producción de PHB resultó favorecida en la etapa con pulsos, siendo 9 veces más la cantidad del polímero en comparación con los cultivos en lote (figura 8.21a).

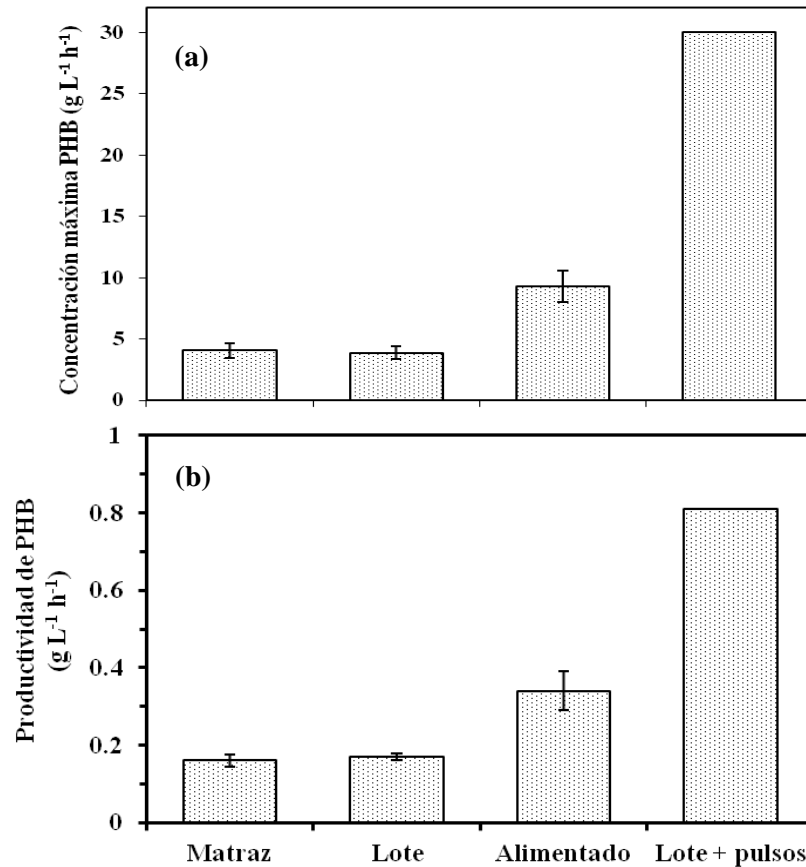


Figura 8.21 Producción (a) y productividad de PHB (b) calculada en cada una de las etapas de los sistemas de cultivos (cultivos A y B).

El incremento en la producción y productividad de PHB en cada una de las etapas (30 g L^{-1} y $0.8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en el presente trabajo resulta ser interesante, debido a que el costo actual en la producción de PHB es considerablemente mayor que la de los plásticos sintéticos. Los costos de producción dependen principalmente de los precios de la materia prima para la fermentación. Estudios sobre el análisis de proceso y evaluación económica por Choi y Lee (1997) muestran que la productividad y rendimiento de PHB, así como el costo de sustrato de carbono, afectan considerablemente su precio final. Asimismo, los costos de separación del polímero a nivel industrial resultan ser elevados (Khanna y Srivastava, 2004). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que se necesitan organismos de alto rendimiento para poder minimizar los costos de producción.

Como ya se señaló anteriormente, actualmente no hay reportes en la literatura donde se obtenga concentraciones superiores a 30 g/L con bacterias del género *Azotobacter*. No obstante, existen reportes con otras bacterias donde se ha incrementado la síntesis del polímero. En la tabla 8.2 se muestra un resumen de los trabajos que se han realizado con bacterias productoras de PHB y en diferentes medios de cultivo. Con respecto a lo anterior, Kim y colaboradores, (1995) reportaron una producción de 61 g/L de PHB con la bacteria *Ralstonia eutropha* en cultivos alimentados con tapioca hidrolizada. Asimismo Lee y Chang, (1993) incrementaron la producción de PHB a 34 g/L en cultivos con una cepa de *Escherichia coli* recombinante alimentando sólo sacarosa al medio.

Tabla 8.2 Resumen de la producción de PHB por diferentes bacterias.

Cepa	Estrategia de fermentación	Sustrato	PHB (g/L)	PHB (%)	Productividad global (g / L h)	Referencia
Otros microorganismos						
<i>Ralstonia eutropha</i>	Fed-batch	Glucosa + propionato	117	74	2.55	Kim <i>et al.</i> 1994b
	Fed-batch	Tapioca hidrolizada	61	58	1.03	Kim y Chang 1995
<i>Alcaligenes latus</i>	Fed-batch	Sacarosa	71.4	50	3.97	Yamane <i>et al.</i> 1996
<i>E. coli recombinantes</i>	Fed-batch	Glucosa	89	76	2.11	Lee <i>et al.</i> 1994
	Fed-batch	Sacarosa	34.3	27.5	0.71	Lee y Chang 1993
<i>Azotobacter</i>						
<i>A. vinelandii</i> UWD	Matraces	Glucosa (1%)	2.37	---	---	Page y Knosp 1989
<i>A. vinelandii</i> UWD	Fed-batch	Glucosa + peptona	25	---	---	Page y Cornish 1993
<i>A. chroococcum</i>	Fed-batch	Almidón	25	46	0.35	Kim y Chang 1998
<i>A. vinelandii</i> OPNA	Fed-batch	Sacarosa y extracto de levadura	30.8	78	0.51	En este trabajo

Si bien, los cultivos con la cepa OPNA en fermentador aunado con las técnicas implementadas permitieron incrementar la producción del polímero, la producción y la productividad del proceso son aun inferiores a lo reportado en otras bacterias. Sin embargo, puede ser posible que mediante el empleo de cultivos con alimentaciones intermitentes de sacarosa y extracto de levadura y con el uso de una cepa como la OPNA se logre incrementar aún más la producción de PHB.

9. CONCLUSIONES

- En cultivos realizados a nivel matraz con las cepas OP y OPNA de *A. vinelandii*, los componentes presentes en el medio PY mejoraron el crecimiento celular (0.94 g L^{-1}) y el rendimiento de PHB con base en la fuente de carbono (0.31 g g^{-1}).
- En cultivos en lote, se encontró que a 4 % de TOD la cepa *A. vinelandii* OP canaliza preferentemente la fuente de carbono y energía hacia un mayor crecimiento celular y síntesis de PHB. Asimismo, se demostró que concentraciones superiores de oxígeno tienen un efecto negativo en el crecimiento celular y la síntesis de PHB.
- En cultivos exponencialmente alimentados con la cepa OPNA se incrementó al triple la producción volumétrica de biomasa y al doble la producción de PHB en comparación con los cultivos en lote.
- Los pulsos de sacarosa y extracto de levadura durante la etapa de alimentación, permitieron incrementar 10 veces la producción de PHB y 8 veces la productividad, en comparación con los cultivos en lote.

10. PERSPECTIVAS

- Debido a la elevada concentración de PHB, sería interesante determinar el peso molecular que se obtiene en el proceso ya que este determina las propiedades termomecánicas para su aplicación en los diferentes sectores industriales.
- Entender el factor que impacta en el crecimiento de los cultivos exponencialmente alimentados.

11. REFERENCIAS

- Aldor, I.S. and Keasling, J.D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Curr Opin Biotech** 14:475-483.
- Anderlei T, Büchs J. (2001). Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. **Biochem Eng J.** 7: 157-162.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol Rev** 54 450- 472.
- Babel, W. and Steinbüchel, A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in Biochem. Eng. Biotechnology. 1st. ed. Springer-Verlag. Berlin, Alemania, 342 pp.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V. and Skulachev, V. P. (2001). Noncoupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. **J Bacteriol** 183: 6869–6874.
- Castillo, M. T. Galindo, E. and Peña C. (2012). The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by the dissolved oxygen and the specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. (En proceso).
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol.** 182:2624-2628.
- Chen, G. and Page, W. (1997). Production of poly-b-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. **Biotechnol Tech** 11: 347–350.
- Choi, J. and Lee, S.Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol** 51: 13-21
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: History, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Reviews**, 9, 1-27.
- Díaz-Barrera, A., Peña, C. and Galindo, E. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. **Appl Microb Biotechnol** 76:903–910.
- Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii* En: Microbios en línea. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios> Editores: Martínez-Romero E. y Martínez Romero J.L. ISBN 968-36-8879-9.
- Flores, O. C. (Comunicación personal). Efecto de la tensión de oxígeno disuelto sobre la expresión de los genes involucrados en la polimerización del alginato y su relación con el PM. Tesis de Doctorado. **IBT-UNAM** (En proceso).
- Fukui, T.; N. Shiomi. and Y. Doi. (1998). Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. **J Bacteriol**, 180, 667–673.
-

-
- Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J. B., Linford, A. N., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G. and Soberón-Chavez, G. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. **FEMS Microbiol Lett** 238, 199–206.
- Galindo, E., Peña, C., Nuñez, C., Segura, D. and Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. **Microb Cell Fact** 6: 7
- García, A. (2012). Influencia de la tensión de oxígeno disuelto y de la fuente de nitrógeno sobre la producción y propiedades químicas del alginato sintetizado por *Azotobacter vinelandii* DM. Tesis de Licenciatura. **Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM**.
- Grage, K., Jahns, A., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I., Atwood, J. and Rehm B. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-Beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacromolecules**. 10, 660–669.
- Grothe, E. and Chisti, Y. (2000). Poly (β -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: Behavior of fed-batch cultures. **Biopro Eng** 22: 441-449.
- Hernández-Eligio, A., Catellanos, M., Moreno, S. and Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. **Microbiol** (157), 3014–302.
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Catellanos, M., Catañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L.F. and Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* **Microbiol** (158), 1953-1963.
- Hernández, J. A. (2007). Identificación de genes de *Azotobacter vinelandii* cuyos productos interaccionan con la proteína IIA Ntr. **Tesis de maestría en ciencias bioquímicas**. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Herrera, L. S. (2012). Efecto de las condiciones de aireación y medio de cultivo sobre el rendimiento y el peso molecular del polihidroxibutirato (PHB) producido por las cepas OP y OPN de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. **Universidad Politécnica del Estado de Morelos**. Marzo 2012.
- Jackson, A. and Dawes, A. (1976). Regulation of the tricarboxylic acid cycle and polyhydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. **Journal of General Microbiology** 97, 303-312.
- Jarman, T. and Page G. (1984). Energy requirements of microbial exopolysaccharide synthesis. **Arch. Microbiol** 137: 231-235.
- Kansiz, M., Domínguez-Vidal A., McNaghton D., Lend B. (2007). Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalkanoates (PHAs). **Anal Bioanal Chem** 338: 1207-1213.
-

-
- Kennedy, C. and Toukdarian, A. (1987). Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. **Ann Rev Microbiol.** 41: 227-258.
- Kessler, B. and Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **J Biotechnol.** 86: 97-104.
- Khanna, S. and Srivastava, A. K. (2004). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochem** 40: 607-619.
- Kim, B. S. and Chang, H. N. (1995). Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol Tech** 9: 31:314
- Kim, B. S. and Chang, H. N. (1998). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnol Letters** 20:109:112.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S.Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. and Woo S. I. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by *Ralstonia eutropha* with glucoseconcentration control. **Biotechnol Bioeng** 43: 892-898.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. and Woo S. I. (1994b). Production of poly-(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate feeding using on-line glucose analyzer. **Enzyme Microb Technol.** 16: 556:561.
- Klimek, J and Ollis D.F. (1980). Extracellular microbial polysaccharides: Kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. **Biotechnol Bioeng** 22: 2321-2342.
- Kung, S.S., Chuang, Y.C., Chen, C.H. and Chien, C.C. (2007). Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. **Lett Appl Microbiol** 44, 364–371.
- Linkerhägner, K. and J. Oelze. (1996). Nitrogenase activity and regeneration of the cellular ATP pool in *Azotobacter vinelandii* adapted to different oxygen concentrations. **J. Bacteriol.** 179: 1362-1367.
- Lee, S. Y. and Chang, H. N. (1993). High cell-density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. **Biotechnology Letters** 15,971–974.
- Lee, S. Y. (1994) Effects of growth temperature and nutritional components on the synthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. **Korean J Appl Microbiol Biotechnol** 22: 614:620.
- Leon, R. and Espín,G. (2008). flhDC, but not fleQ, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control **Microbiology** 154, 1719-1728.
- Lozano, E. Galindo, E. and Peña, C. (2011). The quantity and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions
-

-
- are determined by the maximal oxygen transfer rate (OTR_{max}). **Microbial Cell Factories**, 10, 1-13.
- Lowry, O. H., Rosenbrough A. L., Farr A. L. and Randall R.L. (1951). Protein measurement with the folin reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Maculla, E. S., and Cowles, P. B. (1948). The use of glycine in the disruption of bacterial cells. **Science**. 107: 376-377.
- Mejía, M., Segura, D., Espín, G., Galindo, E. and Peña, C. (2010). Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant altered in poly-β-hydroxybutyrate (PHB) synthesis. **J Appl Microbiol** 108: 55-61.
- Millán, P. M. 2012. Estudio del papel del oxígeno disuelto en los procesos de polimerización y depolimerización del poli-β-hidroxibutirato (PHB) en cultivos de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Doctorado en proceso. Centro de Ciencias Genómicas/UNAM.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 462-429.
- Mulchandani, A. and Luong, JHT. (1989). Microbial inhibition kinetics revisited. **Enzyme Microb. Technol**, vol. 11.
- Myshkina, V.; Nikolaeva, D.; Makhina, T.; Bonartsev, A.; and Bonartseva, G. (2008). Effect of growth conditions on the molecular weight of polyhydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B, **Applied Biochemistry and Microbiology**, 44 (5), 482-486.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, k. and Espín, G. (2006). Enzyme INtr, NPr and IANtr Are involved in regulation of the Poly-β-hydroxybutyrate Biosynthetic Genes in *Azotobacter vinelandii*. **Microbiol Biotechnol**. 15(4): 244-254.
- Page, W. and Knosp, O. (1989). Hyperproduction of polyhydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, **Appl Environ Microbiol**, 55(6), 1334-1339.
- Page, W. (1992). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, **FEMS Microbiology Reviews**, 103,149-158.
- Page, W. J. and Cornish, A. (1993). Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-β-hydroxybutyrate. **Appl Environ Microbiol** 59. 4236-4244.
- Peña, C., Trujillo-Roldán, M.A. and Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme Microb Technol** 27: 390-398.
- Peña, C., Miranda, L., Segura, D., Núñez, C., Espín, G. and Galindo, E. (2002). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-β-hydroxibutirate and alginate biosynthesis. **Enzyme Microb Technol** 29: 209-213.
-

- Peña, C., Galindo, E. and Büchs, J. (2011). The viscosifying power, degree acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. **Process Biochemistry**, 46, 290-297.
- Pena, C., Castillo, T., Núñez, C. and Segura, D. (2011). Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate and Poly- β -Hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications. Capítulo Editorial InTech 217-242.
- Parente, E., Crudele, M.A., Aquino, M. and Clementi, F. (1998). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 171-176.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servin-Gonzalez, L. and Espin, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. **Journal of Bacteriology**, 184, 5672-5677.
- Post, E.; Kleiner, D. and Oelze, J. (1983). Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture. **Archives of Microbiology**, 134, 68-72.
- Quagliano, J. and Miyazaki, S. (1997). Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- β -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B, **Appl Microbiol and Biotechnol**, 48, 662-664.
- Ramírez, R. D. (2011). Optimización de un medio de cultivo para la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) utilizando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Licenciatura**. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Ramírez, O. T., Zamara, R., Quintero, R. and López-Munguía, A. (1994). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. **Enzyme Microbiol Technol** 16:895-903.
- Rocha, C., da Silva, F., Taciro, K. and Pradella, G. (2008). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P (3HB- co -3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **J Microbiol Biotechnol** 3: 427-431.
- Ryu HW, Cho KS, Goodrich PR and Park CHB. (2008). Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD Using Swine Wastewater: Effect of Supplementing Glucose, Yeast Extract, and Inorganic Salts. **Biotechnol. Bioeng.** 13: 6651-665.
- Sabra, W., Zeng, A.P., Sabry, S., Omar, S and Deckwer, W.D. (1999). Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. **Appl Microbiol Biotechnol.** 52: 773-780.
-

-
- Sabra, W., Zeng, A.P., Lunsdorf, H. and Deckwer, W.D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenasa. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 66: 4037-4044.
- Savenkova, L; Gercberga, Z., Kizhlo, Z and Stegantseva E. (1998). Effect of phosphate supply and aeration on poly-b-hydroxybutyrate production in *Azotobacter chroococcum* **Process Biochemistry** 34: 109–114.
- Segura, D., Cruz. T. and Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-b-hydroxybutyrate synthesis. **Arch Microbiol** 179:437–443.
- Senior, P. J., Beech, G.A., Richie, G.A. and Dawes, E.A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.** 128: 1193-1201.
- Serrano-Carreón, L., Corona, R.M., Sánchez, A. and Galindo, E. (1998). Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochem.** 33 (2), 133–146.
- Setubal, J., dos Santos, P., Goldman, B., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L., Valla, S., Almeida, N., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T., Latreille, P., Ligon, L.S., Lu, J., Mærk, M., Miller, N., Norton, S., O'Carroll, I., Paulsen, I., Raulfs, E., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S., Studholme, D., Sun, J., Viana, C., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D., Dixon, R. and Wood, D. (2009). The genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. **Journal of Bacteriology.** 191(14), 4534-4545.
- Steinbüchel, A. and Lutke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, 16, 81–96.
- Sudesh, K. and Abe H, Doi Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog Polym Sci** 25: 1503-1555.
- Trujillo-Roldán, M.A. (1999). Efecto de las oscilaciones de oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. **Tesis de Maestría de Ciencias Bioquímicas.** Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Verlinden, R.; Hill, D.; Kenward, M.; Wiliams, C. and Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates, **Journal of Applied Microbiology**, 102, 1437- 1449.
- Wang, F. and Lee, S. Y. (1997). Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation, **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 3703-3706.
-

- Weiss, M. and Ollis D.F. (1980). Extracellular microbial polysaccharides I. Sustrate, biomass and product kinect equations for batch xanthan gum fermentation. **Biotechnol Bioeng** 12: 854-873.
- Wu, G., Moir, A.J., Sawers, G., Hill, S., and Poole, R.K. (2001). Biosynthesis of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. **FEMS Microbiol. Lett.** 194, 215–220.
- Yamane, T. K. and Shimizu, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. **J Biochem Eng Biotechnol** 30:145-194.
- Yamane, T. Fukunage, M. and Lee, Y. W. (1996). Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus* a growth-associated PHB producer. **Biotechnol Bioeng** 50: 197:202.
- Yee, L. and Blanch, H.W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. **Bio/Technology** 10, 1550-1556.