

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CAPACIDAD VISCOSIFICANTE DEL ALGINATO PRODUCIDO POR Azotobacter vinelandii EN CULTIVOS EN MATRACES AGITADOS SOMETIDOS A BAJOS CONSUMOS DE POTENCIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA: I.Q. KAREN DENISSE GÓMEZ PAZARÍN

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS F. PEÑA MALACARA, IBT UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR DRA. CINTHIA E. NÚÑEZ LÓPEZ, IBT UNAM. DR. MAURICIO TRUJILLO ROLDÁN, IIB UNAM.

CUERNAVACA, MORELOS. Febrero, 2015.



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 proyecto fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Peña Malacara, en el grupo del Dr. Enrique Galindo.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo de la beca de maestría (342878) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT UNAM) a través de los proyectos IT200212 e IT100513.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2. 1. Generalidades de los matraces	4
2. 2. Consumo de potencia en matraces agitados	5
2. 2. 1. Parámetros que afectan el consumo de potencia en matraces agitados	7
2. 2. 2. Fenómeno "Fuera de fase" en matraces agitados	8
2. 3. Transferencia de oxígeno en matraces agitados	9
2. 4. Estructura, propiedades y aplicaciones de los alginatos	11
2. 4. 1. Propiedades y aplicaciones de los alginatos	11
2. 5. Azotobacter vinelandii: modelo productor de alginato	14
2. 6. Parámetros de cultivo que afectan la producción y características químicas del algin sintetizado por <i>A. vinelandii</i>	ato
2. 7. Escalamiento de la producción de alginato por <i>A. vinelandii</i> : matraz a biorreactor	17
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4. 1. Objetivo general	20
4. 2. Objetivos específicos	20
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6. 1. Microorganismo	23
6. 2. Medio de cultivo	23
6. 3. Preparación del inóculo	23

6. 4. Cultivos en matraces	23
6. 4. 1. Determinación del consumo de potencia en matraces agitados	24
6. 4. 2. Determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno en matraces agitad	os26
6. 5. Cultivos en biorreactor	27
6. 6. Métodos analíticos	29
6. 6. 1. Determinación de la concentración de biomasa	29
6. 6. 2. Cuantificación de alginato	29
6. 6. 3. Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS	30
6. 6. 4. Determinación de los índices de flujo y consistencia, y cálculo de la capac	idad
viscosificante	31
6. 6. 5. Preparación de soluciones de alginato reconstituido	32
6. 6. 6. Análisis de la distribución de pesos moleculares del alginato	32
6. 6. 7. Determinación del grado de acetilación del alginato	33
6. 7. Cálculo de parámetros para describir las condiciones hidrodinámicas	34
6. 8. Cálculo de los parámetros cinéticos	35
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7. 1. Análisis teórico para la predicción de la capacidad viscosificante de cultivo	s de
A. vinelandii en matraces agitados	
7. 2. Cultivos de A. vinelandii en matraces agitados con 200 y 300 mL de volume	n de
llenado agitados a 200 rpm.	
7. 2. 1. Evolución del consumo de potencia	
7. 2. 2. Velocidad de transferencia de oxígeno	43
7. 2. 3. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa	44
7. 2. 4. Capacidad viscosificante	47
7. 3. Cultivos de A. vinelandii en matraces agitados con 200 y 300 mL de volume	n de
llenado y frecuencias de agitación de 125 y 150 rpm	48

Índices

7. 3. 1. Evolución del consumo de potencia
7. 3. 2. Velocidad de transferencia de oxígeno
7. 3. 3. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa53
7. 4. Viscosidad de caldos de cultivo y alginato reconstituido producido por <i>A. vinelandii</i> en matraces agitados
7. 5. Características químicas del alginato producido en matraces agitados por A. vinelandii59
7. 6. Escalamiento en biorreactor
8. CONCLUSIONES
9. PERSPECTIVAS
10. REFERENCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. N	Número modificado de Newton (Ne') en matraces agitados como función del
n	úmero de Reynolds (Re) para diferentes volúmenes de matraces, viscosidades
(1	1.0 a 200 mPas), diámetros de agitación (25-50mm), y frecuencias de agitación
(8	80 a 400 rpm). (Büchs <i>et al.</i> 2000b)
Figura 2.2. C	onsumo de potencia en matraces hidrofílicos (fabricados de vidrio) de 250 mL
a	diferentes frecuencias de agitación y volúmenes de llenado, diámetro de
a	gitación de 25 mm. Adaptado de Büchs <i>et al</i> . 2000a7
Figura 2.3. D	istribución de líquido dentro de matraces agitados de 250 mL con un diámetro
d	e agitación de 25 mm, 25 mL de volumen de llenado a 200 rpm. Viscosidad
iĮ	gual a 1 mPa·s, Ph = 2.61 (a); Viscosidad igual a 75 mPa·s, Ph = 083 (b);
V	Viscosidad igual a 135 mPa·s, $Ph = 0.59$ (c). Büchs <i>et al.</i> 2000b9
Figura 2.4. I	Estructura química de los monómeros que componen el alginato. M, ácido
n	nanurónico; G, ácido gulurónico; Ac, grupo acetilo. (Peña et al. 2011a)11
Figura 2.5. B	Biosíntesis del alginato en Azotobacter vinelandii. MI: membrana interna; ME:
n	nembrana externa. (Hay et al. 2013)
Figura 2.6. P	Peso molecular y grado de acetilación en función de la VTO _{máx} (Peña et al.
2	011)17
Figura 2.7. E	volución del consumo de potencia específico durante el cultivo de A. vinelandii
e	n matraces no bafleados con volumen nominal de 500 mL, 100 mL de volumen
d	e llenado, 200 rpm y diámetro de agitación de 25 mm (Peña et al. 2007)18
Figura 5.1. 1	Estrategia experimental para el estudio de la producción de alginato por
A	zotobacter vinelandii en cultivos sometidos a bajos consumos de potencia22
Figura 6.1. H	Equipo de medición de potencia en línea en matraces agitados instalado en
Ν	Aéxico. Control de temperatura (a); plataforma de agitación (b); control de
a	gitación (c); sensor de torque (d)25
Figura 6.2. N	Aedición de potencia de dos pruebas independientes en matraces agitados con
с	ultivos de <i>A. vinelandii</i> a 200 rpm y 300 mL de volumen de llenado26
Figura 6.3.	Sistema de Monitoreo de Actividad Respiratoria (RAMOS). Universidad
Т	ecnológica de Aachen

- Figura 6.5. Metodología para la determinación de la velocidad de corte efectiva como función de la frecuencia de agitación. Con un fluido pseudoplástico y uno newtoniano, se mide el consumo de potencia como función de la frecuencia de agitación (izquierda superior), así como la viscosidad como función de la velocidad de corte (derecha superior). La intersección en cada diagrama indica un estado hidrodinámico igual. Esta información se combina para dar lugar a la velocidad de corte efectiva como función de la frecuencia de agitación (abajo). Peter *et al.* 2004.
- Figura 7.2. Evolución del consumo de potencia (línea continua) y la velocidad de corte efectiva (línea discontinua) en cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL, a 200 rpm y 25 mm de diámetro de agitación a diferentes volúmenes de llenado (a). Evolución de la viscosidad aparente (línea continua) y el número de fase (línea discontinua) en cultivos de *A. vinelandii* (b)......40

- Figura 7.6. Relaciones viscosidad/concentración de los caldos de cultivo de *A. vinelandii* en matraces con diferentes volúmenes de llenado agitados a 200 rpm......47

Figura 7.7. Evolución del consumo de potencia (línea continua) y la velocidad de corte
efectiva (línea discontinua) en cultivos de A. vinelandii en matraces de 500 mL
con 25 mm de diámetro de agitación a diferentes volúmenes de llenado y
frecuencias de agitación (a). Evolución de la viscosidad aparente (línea continua)
y el número de fase (línea discontinua) en cultivos de A. vinelandii (b)49
Figura 7.8. Evolución de la viscosidad del caldo de cultivo de A. vinelandii bajo distintas
condiciones de operación. Todos los valores son reportados a una velocidad de
corte igual a 300 s ⁻¹
Figura 7.9. Velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de A. vinelandii en matraces de
500 mL, a 25 mm de diámetro de agitación, a diferentes frecuencias de agitación
y con distintos volúmenes de llenado52
Figura 7.10. Cinéticas de: crecimiento (a), producción de alginato (b), consumo de sacarosa
(c) y pH (d) de cultivos de Azotobacter vinelandii a diferentes volúmenes de
llenado y frecuencias de agitación. Las líneas continuas en los incisos a-c indican
el ajuste a los modelos cinéticos54
Figura 7.11. Rendimiento de alginato con respecto a la biomasa en función de la energía
suministrada al matraz55
Figura 7.12. Relaciones viscosidad/concentración de los caldos de cultivo de A. vinelandii en
matraces agitados a diferentes volúmenes de llenado y frecuencias de agitación56
Figura 7.13. Capacidad viscosificante (CV) en función del consumo de potencia (E). En azul
se muestran los valores generados en este trabajo; en blanco se muestran datos de
Peña <i>et al.</i> (2011)
Figura 7.14. Viscosidad aparente de soluciones de alginato reconstituido obtenido bajo
distintas condiciones de operación en matraces agitados57
Figura 7.15. Estructura conformacional del alginato. Posibles enlaces glucosídicos: diaxial
(GG) (a); axial-ecuatorial (GM) (b); diecuatorial (MM) (c); ecuatorial-axial
(GM) (d). Skjak-Braek y Draget 2012
Figura 7.16. Peso molecular promedio y grado de acetilación del alginato en función del
consumo de potencia (E)59
Figura 7.17. Cambios en la frecuencia de agitación en el biorreactor de 3 L para reproducir el
perfil de potencia de matraces agitados61

Figura 7.18. Perfil de TOD (a), pH (b), cinética de crecimiento (c) y de producción de	
alginato (d) en fermentador de 3 L y matraz agitado con 300 mL agitado a 150	
rpm con cultivos de <i>A. vinelandii</i>	.62
Figura 7.19. Capacidad viscosificante de los caldos de cultivo de A. vinelandii en matraces	
agitados y fermentador de 3 L	.63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Aplicaciones de los alginatos (Draget et al. 2005; Lee y Mooney 2012; Millán	
-	2006; FMC 2014)	12
Tabla 2.2. A	Aplicaciones de los alginatos con diferentes viscosidades	13
Tabla 7.1. I	Resumen de los consumos de potencia en matraces de 500 mL a 200 rpm con	
(diferentes volúmenes de llenado	41
Tabla 7.2.	Resumen de los consumos de potencia en matraces de 500 mL a diferentes	
1	frecuencias de agitación con distintos volúmenes de llenado	50
Tabla 7.3. F	Resumen de las velocidades de transferencia de oxígeno máximas en matraces de	
4	500 mL a diferentes frecuencias de agitación con distintos volúmenes de llenado	51
Tabla 7.4. H	Resumen de los parámetros cinéticos de los cultivos de A. vinelandii a diferentes	
v	volúmenes de llenado y frecuencias de agitación	55

NOMENCLATURA

Α	Área (m ²)
а	Área específica (m ²)
CV	Capacidad viscosificante (L g ⁻¹)
d	Diámetro interno máximo de matraz (m)
d_0	Diámetro de agitación (m)
D _i	Diámetro de impulsor (m)
F_{g}	Flujo volumétrico de gas (m ³ min ⁻¹)
g	Aceleración gravitacional (g m ⁻²)
Κ	Índice de consistencia de flujo (Pa·s ^m)
k_L	Coeficiente de transferencia de masa (h ⁻¹ m ⁻²)
k _e	Coeficiente de mantenimiento $(g_S g_B^{-1} h^{-1})$
L_{O_2}	Solubilidad del oxígeno (mol L ⁻¹ bar ⁻¹)
L	Constante de la ecuación de velocidad de corte efectiva (-)
т	Índice de comportamiento de flujo (-)
Μ	Torque (N·cm)
n	Frecuencia de agitación (s ⁻¹)
<i>n</i> ₀₂	Moles de oxígeno (mol)
Ne'	Número modificado de Newton (-)
N_p	Número de potencia (-)
Р	Potencia mecánica (W)
P_A	Concentración de producto (g L ⁻¹)
P_g	Potencia gaseada (W)
Ph	Número de fase (-)
p_{O_2}	Presión parcial de oxígeno (Pa)
P/V	Potencia volumétrica (W m ⁻³)
R	Constante de los gases (bar L mol ⁻¹ K ⁻¹)
Re	Número de Reynolds (-)

Nomenclatura

S	Concentración de sustrato (g L ⁻¹)
t	Tiempo de cultivo (h)
Т	Temperatura (K)
V_g	Volumen de gas (L)
V_L	Volumen de llenado (m ³)
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)
W	Ancho de la hoja del impulsor (m)
x	Constante de la ecuación de velocidad de corte efectiva (-)
Χ	Concentración de biomasa (g L ⁻¹)
у	Constante de la ecuación de velocidad de corte efectiva (-)
$Y_{A/X}$	Rendimiento de producto con base en biomasa, fase exponencial $(g_P g_S^{-1})$
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa con base en sacarosa, fase exponencial $(g_B g_S^{-1})$
α	Constante de Luedeking-Piret asociada al crecimiento $(g_P g_B^{-1})$
β	Constante de Luedeking-Piret no asociada al crecimiento $(g_P g_B^{-1} h^{-1})$
Ϋ́	Velocidad de corte (s ⁻¹)
μ	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)
η	Viscosidad aparente (mPa s)
ρ	Densidad (kg m ⁻³)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad viscosificante de soluciones de alginato, así como las características químicas del polímero (peso molecular y grado de acetilación), producido por *Azotobacter vinelandii* en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia, condiciones que no habían sido estudiadas hasta ahora. Adicionalmente, se implementó una estrategia de escalamiento a biorreactor, basada en la simulación del perfil de potencia determinado en matraces agitados.

En la primera etapa del proyecto se encontró que incrementando el volumen de llenado, desde 100 a 300 mL, y disminuyendo la frecuencia de agitación (de 200 a 125 rpm) en matraces de 500 mL sin bafles, el consumo de potencia (P/V) y la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{máx}) disminuyeron significativamente, a valores de 74 a 0.4 kW h m⁻³, y 5.5 a 0.85 mmol L⁻¹ h⁻¹; respectivamente. Bajo estas condiciones, el microorganismo se desarrolló bajo limitación de oxígeno. Como consecuencia de lo anterior, tanto la velocidad específica de crecimiento como la producción de alginato resultaron afectadas (0.11 a 0.07 h⁻¹, y 5.9 a 1.6 g L⁻¹; respectivamente).

Desde el punto de vista de las características del alginato, al disminuir el consumo de potencia, de 74 a 11 kW h m⁻³, se obtuvo la mayor capacidad viscosificante del polímero, cuyo valor incrementó de 0.66 a 1.14 L g^{-1} . Estos cambios se debieron principalmente, a diferencias en el PM. Al disminuir la potencia, el PM incrementó desde 1760 ± 95 a $2200 \pm 200 \text{ kDa}$.

Finalmente, se llevó a cabo el escalamiento de la producción de alginato utilizando como criterio la reproducción de un perfil de potencia (determinado en matraz) en un biorreactor de 3 L. El perfil de potencia siguió una tendencia lineal de 0.09 a 0.30 kW m^{-3} , y se reprodujo en el biorreactor a través de incrementos en la frecuencia de agitación de 320 a 500 rpm. Esta estrategia permitió obtener alginato de alta capacidad viscosificante (0.94 L g⁻¹), con características similares al polímero sintetizado en matraces (1760 kDa en peso molecular y 2.4 % en grado de acetilación).

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Los matraces agitados son ampliamente utilizados, debido a la facilidad de emplearlos en una gran variedad de aplicaciones, ya que su uso es sencillo, lo cual permite llevar a cabo diversos experimentos a bajo costo y con muy poca supervisión. Sin embargo, en el campo de la biotecnología, pocas veces han sido caracterizados desde un punto de vista de ingeniería (Suresh *et al.* 2009; Klöckner y Büchs 2012). La selección de las condiciones de cultivo adecuadas es de vital importancia en reactores de pequeña escala utilizados en las primeras etapas de desarrollo de un bioproceso; para lograrlo, es necesario entender los fenómenos básicos que ocurren dentro de un biorreactor y contar con información cuantitativa sobre las condiciones físicas que rigen un cultivo (Büchs 2001). Además, es deseable encontrar un método directo de escalamiento de matraz agitado a fermentador para disminuir los costos y el período de investigación (Sumino *et al.* 1993). El consumo de potencia específico representa uno de los parámetros más importantes en el desempeño de los matraces agitados, especialmente en cultivos altamente viscosos, ya que está relacionado con el consumo de oxígeno, el grado de remoción de dióxido de carbono, el mezclado y la hidrodinámica del sistema (Büchs *et al.* 2000a, 2001).

En la Universidad Tecnológica de Aachen en Alemania, el grupo del profesor Büchs ha desarrollado técnicas para medir en línea el consumo de potencia específica en matraces agitados y la velocidad de transferencia de oxígeno (Büchs *et al.*, 2000 a y b; Anderlei y Büchs, 2001). Mediante el uso de un equipo de medición de potencia en matraces agitados se ha demostrado que el consumo de potencia en estos sistemas es relativamente alto y en el mismo orden de magnitud que los valores obtenidos para reactores agitados. Además, se ha reportado que modificando los parámetros operacionales (velocidad de agitación, volumen de llenado, diámetro de agitación, etc.) es posible cambiar el consumo de potencia y la velocidad de transferencia de oxígeno. Al incrementar la velocidad de agitación, tanto la P/V como la VTO se incrementan. En contraste, al incrementar el volumen de llenado de los matraces, la P/V y la VTO disminuyen (Büchs *et al.* 2000a, Maier y Büchs 2001).

Los alginatos son polisacáridos constituidos por ácido β -D-manurónico y α -L-gulurónico. Estos biopolímeros son sintetizados por algas marinas cafés y, en el género de bacterias, por algunas

especies de Pseudomonas y Azotobacter (Galindo et al. 2007). Una de las aplicaciones más importantes de los alginatos es su uso como agentes viscosificantes en las industrias de alimentos, textil, farmacéutica y biotecnológica (Galindo et al. 2007; Lee y Mooney 2012). En nuestro grupo de investigación se han realizado estudios sobre la capacidad viscosificante de los alginatos producidos en matraces agitados con cultivos de Azotobacter vinelandii (Peña et al. 1997, 2007, 2011; Reyes et al. 2003). La capacidad viscosificante está definida como la viscosidad generada por unidad de concentración de alginato, y depende del peso molecular, el grado de acetilación y relación de residuos M/G del alginato (Galindo et al. 2007; Peña et al. 2011). En estos estudios, se ha encontrado que, a bajos consumos de potencia (1.4 a 0.23 kW m⁻³), y por lo tanto, a bajas velocidades de transferencia de oxígeno (6.0 a 2.6 mmol L⁻¹ h⁻¹), se incrementa, tanto el peso molecular (1750 a 1880 kDa) como el grado de acetilación del alginato (3.5 a 5.8 %). Estos cambios en ambas características químicas tienen como consecuencia un incremento en la capacidad viscosificante del alginato (Peña et al. 2011). Sin embargo, la información disponible en matraces agitados es limitada y restringida a un intervalo de condiciones operacionales (Peña et al. 2011), por lo que se requieren más evaluaciones para entender los fenómenos que ocurren dentro de los matraces agitados y el efecto que tienen en la producción de polisacáridos.

El objetivo de este proyecto fue estudiar la capacidad viscosificante, así como las propiedades químicas del alginato (peso molecular y grado de acetilación) producido en regiones de bajo consumo de potencia, manipulada a través de incrementos en el volumen de llenado y decrementos en la frecuencia de agitación de los matraces agitados, estrategia que además permitió el desarrollo de una propuesta de escalamiento que reproduzca las condiciones de cultivo en fermentador a nivel laboratorio.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de los matraces

Los matraces agitados son los reactores más utilizados en la biotecnología gracias a su simple y práctico diseño, lo cual permite que en estos sistemas se puedan llevar a cabo experimentos simultáneos con muy poca supervisión y a bajo costo (Büchs 2001; Suresh *et al.* 2009; Klöckner y Büchs 2012). La variedad de tareas en las cuales los matraces son aplicados es muy amplia e incluye el establecimiento de condiciones básicas de proceso, selección de cepas, desarrollo de medios de cultivo, evaluación de parámetros cinéticos, etc. (Büchs 2001).

Los matraces poseen una alta relación superficie/volumen, transferencia eficiente de calor y masa, y mezclado eficiente, características que permiten controlar de forma precisa una reacción, con la posibilidad de mejorar la conversión, selectividad y rendimientos del producto deseado (Suresh *et al.* 2009). Entre los factores determinantes del desempeño de los matraces se deben considerar el tipo de matraz y su geometría, tamaño (volumen nominal), número y tamaño de bafles (si los hay), propiedades de la pared interna del matraz, diámetro de agitación, volumen de llenado y frecuencia de agitación (Büchs 2001; Anderlei y Büchs, 2001). Los matraces con bafles permiten incrementar la transferencia de oxígeno a bajas frecuencias de agitación. Sin embargo, su tamaño y forma no son reproducibles, generan regímenes de flujo caóticos y complicados y pueden llegar a ocasionar que se moje el tapón, lo que da lugar a problemas de contaminación y transferencia de oxígeno (Büchs 2001). Lo anterior puede evitarse mediante el uso de matraces convencionales (sin bafles), que además poseen la ventaja, sobre cualquier otro tipo de biorreactor, de tener un área de transferencia gas-líquido fácil de determinar (Büchs 2001; Büchs *et al.* 2007).

Por otro lado, se han desarrollado metodologías para medir (y calcular) diversos parámetros ingenieriles tales como el consumo de potencia (Büchs *et al.* 2000a y b), la transferencia de oxígeno (Anderlei y Büchs 2001; Anderlei *et al.* 2004), el estrés hidromecánico (Büchs y Zoels 2001; Peter *et al.* 2006) y la distribución de líquidos dentro del matraz (Büchs *et al.* 2007; Maier y Büchs 2001; Maier *et al.* 2004).

4

2. 2. Consumo de potencia en matraces agitados

El consumo de potencia por unidad de volumen (P/V) es uno de los parámetros esenciales para especificar condiciones de cultivo de microorganismos en matraces y biorreactores agitados. Está definido como la potencia total introducida al biorreactor que genera el fluido del líquido y el mezclado, y es disipada como calor que resulta de la fricción del flujo del fluido con el reactor (Klöckner y Büchs 2011). El estrés hidromecánico, el mezclado y la transferencia de masa y calor están directamente relacionados con el consumo de potencia, por lo tanto, es uno de los parámetros cruciales para la optimización y escalamiento de condiciones de cultivo (Sumino *et al.* 1972). En general, el consumo de potencia en matraces agitados y tanques agitados es del mismo orden de magnitud bajo condiciones normales de operación usadas para cultivos de bacterias y levaduras (1 a 10 kW m⁻³), por lo que es posible utilizar el consumo de potencia como criterio de escalamiento de matraz a tanque agitado.

El consumo de potencia en matraces está definido con el número modificado de Newton (*Ne'*) (Büchs *et al.* 2000a):

$$Ne' = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^4 \cdot V_L^{1/3}} \tag{Ec. 1}$$

Donde *P* es la potencia mecánica, ρ es la densidad, *n* la frecuencia de agitación, *d* el diámetro del matraz y V_L el volumen de llenado.

En matraces agitados, el número de Newton puede describirse como función del número de Reynolds (*Re*) (ecuación 2). Para flujo turbulento en matraces agitados sin bafles, la correlación $f(Re) = C_R \cdot Re^{-0.2}$ (*C_R* representa una constante de proporcionalidad, Schlichting 1979) puede utilizarse. En el caso de fluidos de viscosidades elevadas, puede ocurrir flujo en régimen de transición e incluso laminar, para lo cual se introducen términos para flujo laminar (*Re*⁻¹) y de transición (*Re*^{-0.6}). La ecuación 3 se ajustó con datos experimentales de matraces agitados de 25 mL a 5 L con volumen nominal de llenado del 2 al 40 %, usando el método de mínimos cuadrados (Büchs *et al.* 2000b). A bajas viscosidades (1 a 10 mPa·s) el líquido es impulsado en la dirección de la aceleración centrifuga dentro del matraz, es decir, "dentro de fase". Experimentalmente se determinó que los puntos que se encuentran "dentro de fase" están delimitados por las ecuaciones 3 y 4, como se muestra en la figura 2.1 (Büchs *et al.* 2000b).

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \tag{Ec. 2}$$

$$Ne' = 70 \cdot Re^{-1} + 25 \cdot Re^{-0.6} + 1.5 \cdot Re^{-0.2}$$
 (Ec. 3)

$$Ne'_{trans} = \left(\frac{70}{Re \cdot 10^{c/\sqrt{1+1/m^2}}} + \frac{25}{(Re \cdot 10^{c/\sqrt{1+1/m^2}})^{0.6}} + \frac{1.5}{(Re \cdot 10^{c/\sqrt{1+1/m^2}})^{0.2}}\right) \cdot 10^{-c/\sqrt{m^2+1}}$$
(Ec. 4)

Donde ρ es la densidad, *n* la frecuencia de agitación, *d* el diámetro del matraz, η la viscosidad, *c* es el factor de transición, igual a 0.1 y *m* el gradiente entre las curvas límite en cada punto, con un valor de 0.1.



Figura 2.1. Número modificado de Newton (Ne') en matraces agitados como función del número de Reynolds (Re) para diferentes volúmenes de matraces, viscosidades (1.0 a 200 mPas), diámetros de agitación (25-50mm), y frecuencias de agitación (80 a 400 rpm). (Büchs et al. 2000b).

2. 2. 1. Parámetros que afectan el consumo de potencia en matraces agitados

Parámetros operacionales como el volumen de llenado, la frecuencia y el diámetro de agitación, y el tamaño del matraz influyen directamente sobre el consumo de potencia en matraces agitados (Büchs *et al.* 2000a). Por lo tanto, se evaluó el consumo de potencia en matraces de 250 mL, sin bafles, con un volumen de llenado del 4 al 20% del volumen nominal y a frecuencias de agitación de 100 a 380 rpm (figura 2.2). Se encontró que el consumo de potencia aumenta al incrementar la frecuencia de agitación; por otro lado, al incrementar el volumen de llenado, el consumo de potencia disminuye, debido a que el área de fricción entre la pared interna del matraz y el líquido no aumenta de forma proporcional al volumen de llenado (Büchs *et al.* 2000a).



Figura 2.2. Consumo de potencia en matraces hidrofílicos (fabricados de vidrio) de 250 mL a diferentes frecuencias de agitación y volúmenes de llenado, diámetro de agitación de 25 mm. Adaptado de Büchs *et al.* 2000a.

En este estudio también se realizaron experimentos variando el tamaño del matraz (100 a 2000 mL) y usando dos diferentes diámetros de agitación (25 y 50 mm). Los resultados demostraron que en líquidos de baja viscosidad, el diámetro de agitación no influye significativamente en el consumo de potencia; sin embargo, a la misma frecuencia de agitación, el consumo de potencia aumenta de manera proporcional al diámetro del matraz, debido a que la velocidad relativa entre el líquido y la pared interna del matraz aumenta. Las propiedades de la

superficie del matraz (hidrofóbica o hidrofílica) no influyen significativamente sobre el consumo de potencia (Büchs *et al.* 2000a).

2. 2. 2. Fenómeno "Fuera de fase" en matraces agitados

Al incrementar la viscosidad del fluido, la fricción entre el líquido y la pared interna del matraz aumenta, lo que da lugar a incrementos en la transferencia total de momento (i.e. consumo de potencia). Sin embargo, a partir de viscosidades iguales a 17 mPa·s, el líquido muestra un retraso en relación con la dirección de la aceleración centrífuga (hasta 90°). A viscosidades iguales o mayores a 35 mPa·s, la mayor parte del fluido permanece en la base del matraz, disminuyendo la altura máxima que alcanza el líquido dentro del matraz. Bajo esta condición, solo una fracción pequeña del líquido gira con la pared del matraz por lo que el consumo de potencia disminuye significativamente. Este fenómeno se denominó como "fuera de fase" (figura 2.3) (Büchs *et al.* 2000b).

Para describir el límite entre las condiciones "dentro y fuera de fase", Büchs *et al.* (2000b) propusieron el uso de un número adimensional: el número de fase, Ph.

$$Ph = \frac{d}{d_0} \left\{ 1 + 3\log\left[\frac{\rho(2\pi n)}{\eta} \frac{d^2}{4} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d}\right)^2}\right)^2\right] \right\}$$
(Ec. 5)

La ecuación 5 define que los puntos experimentales bajo los cuales el número de fase (Ph) es mayor a 1.26, se encuentran "dentro de fase" (Büchs *et al.* 2000b).

Volúmenes de llenado bajos, números y tamaños de bafles elevados, frecuencias y diámetros de agitación bajos, diámetros internos de matraces altos y viscosidades elevadas, generalmente aumentan la probabilidad de operar "fuera de fase" (Büchs *et al.* 2000a y b; Büchs *et al.* 2001). Cuando ocurre el fenómeno "fuera de fase", la transferencia de oxígeno y la intensidad de mezclado disminuyen significativamente. Como consecuencia, los cultivos pueden desarrollarse bajo limitación de oxígeno y, por lo tanto, generar una presión de selección hacia caldos de cultivo de baja viscosidad. Es decir, se favorece la selección de cepas y componentes de cultivo

que den lugar a menores viscosidades, pero que no necesariamente incrementen la producción del metabolito de interés (Peter *et al.* 2004).



Figura 2.3. Distribución de líquido dentro de matraces agitados de 250 mL con un diámetro de agitación de 25 mm, 25 mL de volumen de llenado a 200 rpm. Viscosidad igual a 1 mPa·s, Ph = 2.61 (a); Viscosidad igual a 75 mPa·s, Ph = 083 (b); Viscosidad igual a 135 mPa·s, Ph = 0.59 (c). Büchs *et al.* 2000b.

2.3. Transferencia de oxígeno en matraces agitados

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) es uno de los parámetros más apropiados para describir de manera cuantitativa el estado fisiológico de un cultivo de microorganismos aeróbicos, debido a que la mayoría de las actividades metabólicas dependen del consumo de oxígeno. La limitación de oxígeno o de algún sustrato, las inhibiciones por productos, el crecimiento diaúxico y otras respuestas biológicas pueden descubrirse observando el curso de la VTO durante un cultivo (Anderlei y Büchs 2001).

La transferencia de masa en un matraz agitado es determinada por la resistencia del tapón y, en mayor proporción, por la resistencia de la interfase gas-líquido. La resistencia debida al tapón depende, principalmente, de la geometría del cuello del matraz y en menor medida del material y densidad del tapón (Mrotzek *et al.* 2001).

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en la interfase gas-líquido puede definirse como:

$$VTO = k_L a(C^* - C_L) \tag{Ec. 6}$$

 C^* es la concentración de saturación de oxígeno en el líquido en equilibrio con la fase gaseosa. C_L es la concentración de oxígeno disuelto en el líquido. El coeficiente de transferencia de masa (k_L) depende del coeficiente de difusión, el cual a su vez, depende del sistema químico. El área específica de transferencia (*a*) en el matraz es determinada por la interfase gas-líquido y es afectada por los parámetros operacionales y la viscosidad de la solución (Maier y Büchs, 2001).

Entre los parámetros que afectan la VTO en matraces agitados se encuentran los siguientes (Maier y Büchs, 2001; García-Ochoa y Gomez, 2009):

- Concentración de biomasa
- Velocidad de consumo de oxígeno
- Parámetros geométricos (forma y diámetro del matraz)
- Condiciones de operación (frecuencia de agitación, diámetro de agitación y volumen de llenado)
- Propiedades físicas:
 - · Propiedades de la superficie del matraz (hidrofóbica/hidrofílica)
 - Propiedades fisicoquímicas del fluido (viscosidad, solubilidad y difusividad de oxígeno)

Maier y Büchs (2001) demostraron que el área relevante de transferencia de masa (*a*) dentro de un matraz abarca el área de transferencia de la superficie del líquido y el área de la película que se forma en la pared del matraz. En matraces hidrofóbicos, donde no se forma una película de líquido en la pared interna del matraz, la VTO es significativamente menor comparada con los valores encontrados para matraces hidrofílicos (Maier y Büchs, 2001).

2. 4. Estructura, propiedades y aplicaciones de los alginatos

Los alginatos son polisacáridos constituidos por cantidades variables de ácido β -D-manurónico y su epímero C5, el ácido α -L-gulurónico unidos por enlaces glucosídicos 1-4. Los monómeros están distribuidos en bloques de residuos continuos de manuronato (M), residuos de guluronato (G) o residuos alternados (MG). Los alginatos sintetizados por las especies de *Azotobacter* son copolímeros compuestos por regiones homopoliméricas de residuos M y G separadas por regiones de estructura alternada (figura 2.4). A diferencia de los alginatos producidos por algas, los alginatos bacterianos son acetilados en las posiciones O-2 y/o O-3 de los residuos de manuronato. La variedad en el peso molecular, la estructura monomérica de bloques y la acetilación influyen en las características físicas y reológicas del polímero (Galindo *et al.* 2007; Sabra *et al.* 2001).



Figura 2.4. Estructura química de los monómeros que componen el alginato. M, ácido manurónico; G, ácido gulurónico; Ac, grupo acetilo. (Peña *et al.* 2011a).

2. 4. 1. Propiedades y aplicaciones de los alginatos

Desde el punto de vista de las aplicaciones, las características más importantes del alginato son su capacidad de formar soluciones viscosas, y su capacidad de formar geles en presencia de sales como el calcio o por reacción química (Galindo *et al.* 2007; Lee y Mooney 2012; McHugh 2003). Gracias a que los alginatos son biocompatibles, no tóxicos, biodegradables y tienen la capacidad de formar geles o actuar como agentes viscosificantes, han encontrado una amplia gama de aplicaciones que sigue creciendo. Los alginatos se utilizan en una gran variedad de aplicaciones industriales, como estabilizantes, agentes espesantes y gelificantes en la producción

de alimentos, o para inmovilizar células en las industrias farmacéutica y biotecnológica (tabla 2.1) (Draget *et al.* 2005; Lee y Mooney 2012; Millán 2006; FMC 2014).

Tabla 2.1. Aplicaciones de los alginatos (Draget *et al*. 2005; Lee y Mooney 2012; Millán 2006; FMC 2014).

Aplicación	Función del alginato			
Alimentos	Agente estabilizante de espumas (vinos y cervezas), emuls (helados, mayonesas, cremas, jugos).			
	Agente gelificante (alimentos reconstituidos, sustitutos de frutas, cubierta de embutidos, rellenos para panificación, postres).			
	Agente viscosificante (suspensión de frutas, mermeladas, salsas, aderezos, productos enlatados).			
Farmacéutica	Emulsificante y espesante (jabones y lociones).			
	Agente desintegrador (tabletas).			
	Gel absorbente (vendajes quirúrgicos).			
	Agente de suspensión (ungüentos y antibióticos).			
	Estabilizante de emulsiones (jarabes).			
Biotecnológica	Soporte en biocatalizadores (inmovilización de células y enzimas). Ingeniería de tejidos.			
Biomedicina	Odontología (impresiones dentales), curación de heridas, inmunoestimulantes, material de implantación, fuente de fibra dietética.			
Papel	Mejorar la uniformidad de la superficie.			
Industria textil	Impresión de textiles (fijación del color y brillo), viscosificante de tintas para impresión.			
Cosméticos	Agente emulsificante (lociones, cremas, jabones, maquillaje, productos para el cabello).			
Agricultura	Agente de retención de agua (acondicionamiento de suelos).			
Tratamiento de aguas	Incrementa el tamaño de los agregados en los procesos de floculación.			

La función de los alginatos depende de sus características fisicoquímicas, en la tabla 2.2 se muestran algunas aplicaciones de alginatos con diferentes viscosidades. Los polímeros de menor viscosidad (20 - 50 mPa s) son utilizados como agentes espesantes y emulsificantes en las industrias textil y alimenticia, en donde su función gelificante es más importante (Danisco 2014; McHugh, 2003). Por otro lado, polímeros de mayores viscosidades son requeridos (350 – 950 mPa s) como emulsificantes en alimentos (Danisco 2014) y estabilizantes para mejorar la uniformidad de la superficie del papel (McHugh, 2003). En la industria farmacéutica, los alginatos de alta viscosidad son útiles gracias a que poseen propiedades mecánicas y elásticas requeridas en la formación de cápsulas. Zimmermann *et al.* (2007) demostraron que microcápsulas formadas con alginato de ultra-alta viscosidad (>30 mPa s, 0.1% p/v) e iones de Ba²⁺ proveen estabilidad e inmunoprotección a largo plazo a las matrices encapsuladas. Bazou *et al.* (2008) y Miranda *et al.* (2010) estudiaron la producción de albúmina en reactores agitados con hepatocitos encapsulados con alginato de alta viscosidad. Estos autores encontraron que la cápsula de alginato de alta viscosidad protege los hepatocitos contra el estrés hidrodinámico, permitiendo una mayor producción de albúmina (Bazou *et al.* 2008; Miranda *et al.* 2010).

Aplicación	Viscosidad (mPa s)	Función	Referencia
Impresión en textiles	Baja viscosidad (no se especifica)	Espesante de tintas	McHugh, 2003
Rellenos para panificación	20 – 50 (1% p/v)	Gelificante	Danisco 2014
Rellenos de fruta	20 – 50 (1% p/v)	Floculante	Danisco 2014
Alimentos bajos en grasa	350 – 550 (1% p/v)	Espesante	Danisco 2014
Papel	Media-alta viscosidad (no se especifica)	Estabilizante	McHugh, 2003
Alimentos untables	750 – 950 (1% p/v)	Emulsificante	Danisco 2014
Microcápsulas	>30 (0.1% p/v)	Elasticidad y flexibilidad	Zimmermann <i>et</i> <i>al</i> . 2007
Encapsulado de agregados de hepatocitos	>200	Protección contra estrés hidrodinámico	Bazou <i>et al.</i> 2008, Miranda <i>et al.</i> 2010

Tabla 2.2. Aplicaciones de los alginatos con diferentes viscosidades.

2. 5. Azotobacter vinelandii: modelo productor de alginato

Azotobacter vinelandii es una proteobacteria con un metabolismo respiratorio muy estricto con oxígeno como receptor terminal de electrones. Fija nitrógeno, ya sea en condiciones microaeróbicas o completamente aeróbicas. Su crecimiento es heterotrófico, donde los azúcares, los alcoholes y las sales de los ácidos orgánicos se utilizan como fuente de carbono. Los azúcares son metabolizados a través de la vía Entner-Doudoroff.

El género *Azotobacter* se distingue por su habilidad de formar quistes en la fase estacionaria o en condiciones de inducción de células vegetativas con n-butanol al 0.2 %. Los quistes son significativamente más resistentes a la desecación que las células vegetativas, ya que el alginato es un componente esencial de la cubierta que protege los quistes (Peña *et al.* 2011a).

La mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno es capaz de reducir el N₂ sólo en condiciones anaeróbicas o microaeróbicas. En contraste, *A. vinelandii* es un aerobio obligado capaz de fijar el N₂ aún a concentraciones altas de oxígeno. Esto es posible gracias a que esta bacteria puede ajustar sus velocidades de consumo de oxígeno, lo que le ayuda a mantener bajos niveles de oxígeno en el citoplasma (Peña *et al.* 2011a). Adicionalmente, otra forma de mantener bajas concentraciones de O₂ en la célula es previniendo la transferencia de este gas hacia su interior. Se ha propuesto que el alginato forma una cubierta alrededor de la célula que actúa como barrera física de O₂ (Sabra *et al.* 2000). La vía biosintética del alginato ha sido ampliamente estudiada y es similar en *Pseudomonas* y *Azotobacter*. El proceso de síntesis se puede dividir en 4 pasos: síntesis del precursor, polimerización, modificación en el periplasma y exportación (figura 2.5) (Hay *et al.* 2013).

La síntesis comienza con la entrada de fuentes de seis carbonos a la vía Entner-Doudoroff, el piruvato resultante entra al ciclo de ácidos tricarboxílicos donde se obtiene oxaloacetato. Posteriormente, el oxaloacetato se convierte a fructosa-6-fosfato por medio de la gluconeogénesis (Lynn and Sokatch 1984; Narbad *et al.* 1988). Tres proteínas, AlgA, AlgC y AlgD catalizan la conversión de la fructosa-6-fosfato en ácido GDP-manurónico, el cual será polimerizado por las proteínas Alg8 y Alg44 (Hay *et al.* 2013; Remminghorst y Rehm 2006a y b). El ácido polimanurónico resultante es transportado al periplasma por un andamiaje de proteínas conformado por AlgX, AlgG y Alg K (Jain y Ohman, 1988; Jain *et al.* 2003; Robles-

Price *et al.* 2004). Durante el transporte, el ácido polimanurónico puede ser modificado por un complejo acetilasa (AlgV,AlgI y AlgF), en donde algunos residuos de manuronato no acetilados son epimerizados por AlgG y exportados a través de la membrana externa por AlgJ(Galindo *et al.* 2007). En el caso de *A. vinelandii*, el polímero exportado se convierte en el alginato final por medio de una familia de siete epimerasas de manuronato C-5 homólogas extracelulares, AlgE1-E7 (Ertesvag *et al.* 1995). En *A. vinelandii* se han identificado los genes que codifican para las enzimas que participan en esta vía biosintética. Es importante mencionar que *A. vinelandii* es también productor de polihidroxibutirato (PHB) bajo condiciones de limitación de oxígeno (Peña *et al.* 1997; Sabra *et al.* 2001).



Figura 2.5. Biosíntesis del alginato en *Azotobacter vinelandii*. MI: membrana interna; ME: membrana externa. (Hay *et al.* 2013).

2. 6. Parámetros de cultivo que afectan la producción y características químicas del alginato sintetizado por *A. vinelandii*

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) son parámetros importantes que determinan la producción del alginato y su composición (Lozano *et al.* 2011; Flores *et al.* 2014). En el trabajo de Lozano *et al.* (2011) (realizado en fermentador de 3 L), se demostró que el peso molecular del alginato es inversamente proporcional a la VTO_{máx}, independientemente de la TOD, bajo condiciones de limitación (0.5 %) y no-limitación de oxígeno (5 %). Lozano *et al.* (2011) reportaron que, incrementando la VTO_{máx} de 17 a 100 mmol L⁻¹ h⁻¹, en fermentadores con TOD igual a 5 %, la cantidad de alginato máxima alcanzada incrementó de 0.5 a 3.1 g L⁻¹; sin embargo, el peso molecular disminuyó de 550 a 200 kDa.

Por otro lado, Díaz-Barrera *et al.* (2007) demostraron que el peso molecular de los alginatos producidos por *A. vinelandii* es determinado por condiciones de limitación de oxígeno, en donde las VTOs no satisfacen el consumo de oxígeno del cultivo. En su estudio (realizado en un fermentador de 3 L), Díaz-Barrera *et al.* (2007) reportaron que el alginato de mayor peso molecular (1560 kDa) se sintetizó a bajas velocidades de transferencia de oxígeno (VTO), 3.0 mmol L⁻¹ h⁻¹, y por tanto bajo limitaciones de oxígeno (Peña *et al.* 2008).

Recientemente, en nuestro grupo se han probado diferentes condiciones de agitación en matraces con el objetivo de disminuir el consumo de potencia y tratar de aumentar el peso molecular del alginato (Peña *et al.* 2011). A través de la manipulación del consumo de potencia es posible manipular la VTO (siempre y cuando $TOD \approx 0$). En este estudio se reportaron relaciones exponenciales en los perfiles de viscosidad-concentración del alginato, en donde el exponente de cada perfil se utiliza como indicador de la capacidad viscosificante del polímero. Se determinó también, que a bajas velocidades de agitación (100 - 125 rpm), los exponentes de tales perfiles son mayores. En tales condiciones, el consumo de potencia se mantuvo en el rango 0.2 a 0.3 kW m⁻³ y la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{max}) fue del rango de 2.6 a 3.5 mmol L⁻¹ h⁻¹ (Peña *et al.* 2011).

En el mismo estudio se determinó que el incremento en las velocidades de agitación en el rango de 100 a 200 rpm, relacionado con un mayor consumo de potencia $(0.2 \text{ a } 1.4 \text{ kW m}^{-3}) \text{ y VTO}_{\text{máx}}$

(6.0 mmol L⁻¹ h⁻¹), promovió la producción de una mayor cantidad de alginato de 3.1 a 4.3 g L⁻¹ respectivamente para 100 y 200 rpm. En contraste, la viscosidad aparente (η) del caldo de cultivo, y por tanto, el peso molecular y el grado de acetilación del alginato disminuyeron. Así, para 3.0 g L⁻¹ de alginato, η disminuyó de 28 a 17 mPa·s (medido a $\dot{\gamma} = 300 \text{ s}^{-1}$), el peso molecular de 1880 a 1750 kDa y el grado de acetilación de 5.8 a 3.5 %, para los cultivos desarrollados a 100 y 200 rpm, respectivamente (figura 2.6). Lo anterior indica que cuando se reduce el consumo de P/V y por lo tanto, la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{máx}), es posible incrementar la calidad del alginato en términos de su capacidad viscosificante (Peña *et al.* 2011).



Figura 2.6. Peso molecular y grado de acetilación en función de la VTO_{máx} (Peña et al. 2011).

2. 7. Escalamiento de la producción de alginato por *A. vinelandii*: matraz a biorreactor

Estudios previos en nuestro grupo de investigación han revelado que el peso molecular promedio de alginatos producidos por *A. vinelandii* en matraces agitados puede alcanzar valores de 1.9×10^6 Da y viscosidades de hasta 520 mPa·s (medido a $\dot{\gamma} = 12 \text{ s}^{-1}$) para caldos con una concentración de 5 g L⁻¹ de alginato (matraces de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado) (Peña *et al.* 1997). Sin embargo, cuando los procesos fueron trasladados a fermentadores agitados en laboratorio (1.5 L), en los que el pH y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se

mantuvieron constantes (3 y 5 %), el peso molecular del alginato fue menor a 0.68×10^6 Da y la viscosidad del caldo fue menor a 100 mPa·s para la misma concentración de alginatos (Peña *et al.* 2000; Seáñez *et al.* 2001; Trujillo-Roldán *et al.* 2001; Reyes *et al.* 2003).

Con el propósito de producir alginatos con pesos moleculares similares a los que se generan en matraces, Reyes *et al.* (2003) utilizaron el consumo de potencia específico (P/V) como criterio de escalamiento. En el trabajo de Reyes *et al.* (2003) se calculó la potencia inicial de un cultivo de *Azotobacter vinelandii* en un matraz de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado a 200 rpm, el valor que se obtuvo fue de 0.27 kW m⁻³. Este estudio reveló que la potencia inicial como criterio de escalamiento no permitió reproducir el comportamiento de los matraces agitados, en términos del peso molecular, ya que en los fermentadores de 1.5 L, el valor de peso molecular más alto encontrado fue de 1.1 x 10⁶ Da, inferior al peso molecular del alginato que se generó en matraces (1.9 x 10⁶ Da) (Reyes *et al.* 2003).



Figura 2.7. Evolución del consumo de potencia específico durante el cultivo de *A. vinelandii* en matraces no bafleados con volumen nominal de 500 mL, 100 mL de volumen de llenado, 200 rpm y diámetro de agitación de 25 mm (Peña *et al.* 2007).

En un estudio posterior, Peña *et al.* (2007) caracterizaron por primera vez el consumo de potencia en cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados (500 mL con 100 mL de volumen de llenado). Observaron que, manteniendo la velocidad de agitación constante a 200 rpm, la potencia específica aumentó exponencialmente (0.27 hasta 1.4 kW m⁻³) durante el curso de la fermentación, debido a un incremento en la viscosidad del cultivo (figura 2.7). Utilizando esta información, Peña *et al.* (2008) propusieron una estrategia de producción de alginato basada en

la manipulación del consumo de potencia, a través de la velocidad de agitación, en un perfil similar al que se genera en los matraces. Los resultados de este trabajo indicaron que empleando esta estrategia en fermentadores de 10 L, era posible producir alginatos con un peso molecular promedio y distribución de pesos moleculares similares a los que se obtuvieron en matraces agitados (Peña *et al.* 2008).

Hasta ahora, la información disponible sobre el efecto del consumo de potencia en la producción de alginato es limitada a un intervalo de condiciones operacionales (Peña *et al.* 2011). Existen regiones de muy baja potencia y transferencia de oxígeno que aún no se han explorado, bajo las cuales, se podría incrementar la capacidad viscosificante del polímero debido a cambios en sus características químicas. Por lo anterior, en este proyecto se propuso estudiar el efecto de condiciones de operación que determinaran muy bajos consumos de potencia y transferencia de oxígeno, así como su relación con la producción del alginato y sus características químicas (peso molecular y grado de acetilación). El presente trabajo pretende contribuir a entender el efecto de los fenómenos físicos en el proceso de síntesis del polisacárido y su capacidad viscosificante, y además proporcionar más información para el desarrollo de estrategias de cultivo en sistemas de fermentación a mayor escala.

3. HIPÓTESIS

La capacidad viscosificante del alginato producido en cultivos de la cepa *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 se incrementa con la disminución del consumo de potencia volumétrica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar los cambios en la capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de las condiciones operacionales (velocidad de agitación y volumen de llenado) sobre la evolución del consumo de potencia en cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados.
- Evaluar el efecto de bajos consumos de potencia volumétrica sobre la producción, la capacidad viscosificante, peso molecular y grado de acetilación del alginato sintetizado por *A. vinelandii* en matraces agitados.
- Proponer una estrategia de escalamiento en fermentadores a nivel laboratorio que reproduzcan las condiciones de consumo de potencia volumétrica que prevalecen a nivel.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La primera etapa consistió en la caracterización de los perfiles de consumo de potencia volumétrica y de velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos con la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 en matraces agitados de 500 mL, a 200 rpm, 25 mm de diámetro de agitación y a tres volúmenes de llenado distintos (100, 200 y 300 mL). Posteriormente se evaluaron los perfiles de consumo de potencia y transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL con 200 mL de volumen de llenado a una velocidad de agitación de 150 rpm y con 300 mL de volumen de llenado, a 125 rpm.

Se evaluó el efecto del consumo de potencia sobre la producción, capacidad viscosificante, peso molecular promedio y grado de acetilación del alginato producido.

Finalmente, se estableció una estrategia de escalamiento a biorreactor de 3 L, con el objetivo de obtener alginato con capacidad viscosificante equivalente al obtenido en matraces. El perfil de potencia correspondiente a la condición en matraz en donde se produjo el alginato de mayor capacidad viscosificante, se utilizó como criterio de escalamiento en un biorreactor de 3 L (figura 5.1).



Figura 5.1. Estrategia experimental para el estudio de la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* en cultivos sometidos a bajos consumos de potencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismo

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando la cepa silvestre *A. vinelandii* ATCC 9046. El microorganismo se conservó en tubos inclinados (*slants*) a 4 °C, llevando a cabo su resiembra mensualmente.

6.2. Medio de cultivo

Se utilizó medio Burk modificado con la siguiente composición (g L⁻¹): sacarosa 20; extracto de levadura 3.0; MOPS 1.42; K₂HPO₄ 0.66; KH₂PO₄ 0.16; CaSO₄ 0.05; NaCl 0.2; MgSO₄·7H₂O 0.2; Na₂MoO₄·2H₂O 0.0029, y FeSO₄ 0.027. El pH inicial se ajustó a 7.2 con NaOH (2 N).

6.3. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo, el microorganismo se cultivó en placas petri con medio Burk modificado (adicionando 18 g L^{-1} de agar, sin extracto de levadura). Las cajas se incubaron por 48 h a 29 °C. De las placas, se tomaron dos muestras (con asa circular) para inocular matraces de 500 mL con 100 mL de medio Burk modificado. Los matraces fueron incubados en una agitadora rotatoria (25 mm de diámetro de agitación) durante 20 h a 29 °C.

6.4. Cultivos en matraces

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL a 29 °C durante 72 horas en una incubadora cuyo diámetro de agitación es de 25 mm (Peña *et al.* 2011), utilizando diferentes volúmenes de llenado: 100, 200 y 300 mL y diferentes frecuencias de agitación: 125, 150 y 200 rpm. Para cada experimento, se realizaron cultivos paralelos con 12 matraces en la plataforma de medición de potencia y 12 en una incubadora convencional. Cada 12 horas se
sacrificaron dos matraces para el muestreo. Los matraces se inocularon con 10% del volumen de llenado (1.0 g L^{-1} de inóculo medido como 0.15 unidades de Abs_{540 nm}).

6. 4. 1. Determinación del consumo de potencia en matraces agitados

El consumo de potencia en los matraces agitados se estima por medio del método propuesto por Büchs *et al.* (2000a), el cual se basa en obtener el equivalente de par de torsión generado por el motor del equipo de agitación y la estimación de las pérdidas ocasionadas por las fuerzas de fricción. En la figura 6.1 se muestran los elementos básicos que componen el equipo de agitación de matraces: control de temperatura (a); plataforma de agitación (b); control de agitación (c); sensor de torque (d). El motor genera un movimiento oscilatorio en la plataforma de agitación, entre la plataforma y la flecha de salida del motor esta ensamblado un sensor de par de torsión (0-1Nm, HiTec Zang). El sensor de par de torsión convierte la deformación elástica en una señal de salida de voltaje. La potencia por unidad de volumen (P/V_L) se estima por medio de la frecuencia de agitación y la medición del par de torsión. Dichos datos son registrados en una computadora de escritorio (PC). Las pérdidas mecánicas por fricción en el motor y la resistencia en matraces se compensan al realizar una medición de referencia con pesas, o agar solidificado, de igual peso que los matraces en cada experimento. Así, el consumo de potencia se estima con la diferencia entre las mediciones con líquido y sólido:

$$\frac{P}{V_L} = \frac{(M_1 - M_2) \cdot 2 \cdot \pi \cdot n}{z \cdot V_L}$$
(Ec. 7)

Donde M_1 es el par de torsión del cultivo, M_2 es el par de torsión del agar, *n* es la frecuencia de agitación, V_L el volumen de llenado y *z* el número total de matraces sobre la plataforma. Las medidas se realizaron en línea durante el cultivo (Peña *et al.* 2011).



Figura 6.1. Equipo de medición de potencia en línea en matraces agitados instalado en México. Control de temperatura (a); plataforma de agitación (b); control de agitación (c); sensor de torque (d).

El equipo de medición de potencia utilizado para este trabajo se instaló y caracterizó recientemente en el grupo de investigación (Pliego 2014). En la figura 6.2 se presentan los perfiles de consumo de potencia de dos cultivos independientes de *A. vinelandii* en matraces convencionales de 500 mL, a 200 rpm con 300 mL de volumen de llenado.

Durante las primeras 4 h de cultivo, se encontraron diferencias en los perfiles de potencia de hasta un 45 % (con respecto al promedio). Esto se debió a que el motor requiere de un calentamiento previo a la experimentación (al menos 2 h), para disminuir la fricción de los cojinetes de la máquina agitadora y estabilizar la medición de torque (HiTec Zang, comunicación personal; Pliego 2014); sin embargo, esto no se realizó en las primeras evaluaciones. A partir de las 4 h y hasta las 72 h de cultivo, los perfiles de consumo de potencia mostraron diferencias menores al 10 %, con respecto al promedio, lo cual es aceptable dentro del intervalo de reproducibilidad del equipo (Pliego 2014).



Figura 6.2. Medición de potencia de dos pruebas independientes en matraces agitados con cultivos de *A. vinelandii* a 200 rpm y 300 mL de volumen de llenado.

6. 4. 2. Determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno en matraces agitados

La velocidad de transferencia de oxígeno se determinó en un Sistema de Monitoreo de Actividad Respiratoria (RAMOS) (figura 6.3), dispositivo diseñado por Anderlei y Büchs (2001), y Anderlei *et al.* (2004).

El principio de medición en línea del equipo se basa en la repetición de ciclos, los cuales consisten de una fase de medición (10 min) y otra de aireación (20 min), durante el curso del cultivo. En la fase de medición del equipo, la cabeza de los matraces de 500 mL es sellada cerrando las válvulas de entrada y salida de aire. La actividad de respiración del microorganismo resulta en decrementos de la presión parcial de oxígeno (p_{O_2}) en la fase gaseosa, la cual es medida con un sensor de oxígeno montado en el cuello de cada matraz. Los datos de presión de oxígeno son registrados en una computadora de escritorio (PC). A partir de la pendiente de la gráfica de presión parcial de oxígeno, se calcula la VTO (ecuación 8). En la fase de aireación, iniciada al abrir las válvulas, los matraces son alimentados con aire para evitar el agotamiento de oxígeno.

$$VTO = \frac{n_{O_2}}{V \cdot t} = \frac{\Delta p_{O_2}}{\Delta t} = \frac{V_g}{R \cdot T \cdot V}$$
(Ec. 8)

 n_{O_2} representa los moles de oxígeno en la fase gas, V el volumen del líquido, V_g el volumen de gas, t el tiempo de cultivo, T la temperatura y R la constante de los gases. Al mismo tiempo, se realizaron cultivos paralelos en matraces de 500 mL convencionales para toma de muestras y llevar a cabo los análisis fuera de línea (sección 6.6). La velocidad de aireación en los matraces del equipo RAMOS se ajustó para que la concentración de gas en la cabeza se igualara a la concentración de gas en los matraces con los cultivos paralelos con tapones de algodón (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei *et al.* 2004).



Figura 6.3. Sistema de Monitoreo de Actividad Respiratoria (RAMOS). Universidad Tecnológica de Aachen.

6.5. Cultivos en biorreactor

Con el objetivo de escalar la producción de alginato de alta capacidad viscosificante (1.0) con *A*. *vinelandii* a partir de cultivos en matraces agitados, se realizaron cultivos en lote en un biorreactor Applikon de 3 L reproduciendo el perfil de potencia (0.09 a 0.3 kW m^{-3}). El fermentador cuenta con dos turbinas Rushton de 4.5 cm de diámetro y una relación de diámetros tanque-turbina de 3:1. El fermentador se operó a 29 °C con un flujo de aire de 1 L min⁻¹, con un volumen de llenado de 2.0 L. El pH y la tensión de oxígeno disuelto no fueron controlados. El reactor se inoculó con 200 mL de células provenientes del inóculo (1.0 g L⁻¹). Para los análisis se retiraron 10 mL de caldo de cultivo por cada muestra.

Para reproducir el perfil de potencia encontrado en matraces agitados ($P/V_M = 0.09 \text{ a } 0.3 \text{ kW m}^{-3}$) se incrementó la frecuencia de agitación durante el curso del cultivo desde 320 a 500 rpm. El cálculo para seleccionar la frecuencia de agitación se realizó con el algoritmo de la figura 6.4.



Figura 6.4. Algoritmo para reproducir el perfil de potencia encontrado en matraces agitados en un biorreactor a través de cambios en la frecuencia de agitación. P/V_M representa la potencia volumétrica en matraces. P_g/V_B representa la potencia volumétrica en el biorreactor.

El número de Reynolds se calculó con la ecuación 9, suponiendo una densidad (ρ) constante, para frecuencias de agitación desde 200 a 700 rpm. Los valores de los índices de consistencia (K) y flujo (m) se obtuvieron a partir de los perfiles de viscosidad encontrados en matraces (sección 6.6.4) :

$$Re = \frac{\rho D_i^2 n}{K \dot{\gamma}^{m-1}} \tag{Ec. 9}$$

 D_i representa el diámetro del impulsor, y n la frecuencia de agitación.

El número de potencia, *Np*, se estimó a partir de gráficos de *Np* contra *Re* (Metzner *et al.* 1961). La potencia (*P*) se calculó con la ecuación 10:

$$P = N_p D_i^{5} n^3 \rho \tag{Ec. 10}$$

Para el cálculo de la potencia gaseada, se utilizó la ecuación 11 propuesta por Hugmark (1980):

$$\frac{P_g}{P} = 0.1 * \left(\frac{F_g}{nV}\right) - 0.25 * \left(\frac{n^2 D_i^4}{gWV^{2/3}}\right) - 0.20$$
 (Ec. 11)

En donde F_g es el flujo volumétrico de gas, g la constante de la aceleración gravitacional y W el ancho de la hoja del impulsor.

Pg/VB se calculó al dividir la potencia gaseada entre el volumen de operación en el biorreactor.

6. 6. Métodos analíticos

6. 6. 1. Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determinó gravimétricamente por el método descrito por Peña (1998). El procedimiento es el siguiente:

- 10 mL de cultivo se mezclaron con 1 mL de Na₄EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min.
- Se retiró el sobrenadante y el paquete celular se lavó con 0.1 M EDTA: 1 M NaCl (1:1 v/v)
- El *pellet* se aisló y se filtró en membranas *Nucleopre* de 0.45 μm de tamaño de poro previamente secadas durante 24 h a 80 °C y pesadas.

La membrana con el *pellet* fue secada por 24 h a 80 °C para finalmente pesarse y obtener por diferencia de peso la cantidad de biomasa.

6. 6. 2. Cuantificación de alginato

•

Para determinar la concentración de alginato se utilizó la técnica basada en la precipitación de alginato con 2-propanol y cuantificación gravimétrica del mismo (Peña *et al.* 1997). El procedimiento consiste en:

10 mL de cultivo se mezclaron con 1 mL de Na₄EDTA (0.1 M) y 1 mL de NaCl (1.0 M) y se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min.

- Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 3 volúmenes de 2-propanol, el precipitado se filtró en membranas *Nucleopre* de 45 µm de tamaño de poro, previamente secadas durante 24 h a 80 °C y pesadas.
- La membrana con el alginato fue secada por 24 h a 80 °C para finalmente pesarse y obtener por diferencia de peso la cantidad de alginato.

6. 6. 3. Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS

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

Preparación de reactivos: la solución de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Chemical Co.) se preparó pesando 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de DNS, mezclando en ese orden en 1.0 L de agua destilada. Para una disolución total se calentó y el DNS se adicionó lentamente para evitar precipitación. La solución enzimática se preparó adicionando 2.5 mg de la enzima β -fructofuranosidasa (Gist-Brocades con una actividad de 243 U mg⁻¹ a 40 °C) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6). El procedimiento para el análisis de sacarosa fue como sigue:

- Se realizó una dilución a las muestras del cultivo, tratando de que los valores de absorbancia cayeran dentro de la curva patrón y se mezclaron 0.9 mL con 0.1 mL de la solución enzimática.
- La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se adicionó 1 mL de DNS a cada muestra.
- Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 min e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo.
- A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos.

Los valores se interpolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de $0.1 \text{ a } 1.0 \text{ g L}^{-1}$, obteniéndose la siguiente ecuación:

Sacarosa
$$\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{Abs_{540 nm} + 0.001}{0.484} * Dilución$$
 (Ec. 12)

6. 6. 4. Determinación de los índices de flujo y consistencia, y cálculo de la capacidad viscosificante

Los índices de consistencia (*K*) y flujo (*m*) se calcularon a través de las mediciones de viscosidad, las cuales se realizaron con un reómetro (AR 1000 TA Instruements rheometers) utilizando una geometría de cono/plato (60 mm de diámetro con un ángulo de 1° 0' 12''), conectado a un convertidor A/D que envía la señal al software de adquisición (Rheology Advantage TA). Se tomó 1.0 mL de muestra, y la medición se realizó variando la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$) de 10 a 3000 s⁻¹, a temperatura constante igual a 22 °C (Peña *et al.* 2007, 2011). La dependencia de la viscosidad sobre la velocidad de corte está descrita por el modelo de Ostwald-de Waele (Ley de potencia):

$$\eta = K \dot{\gamma}^{m-1} \tag{Ec. 13}$$

Donde η es la viscosidad aparente, *K* es el índice de consistencia, *m* es el índice de flujo y $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte. Durante la medición de las muestras, se utilizaron agua y aceites (50, 100, 500 y 1000 cp; Brookfield Engineering Laboratories, Inc.) como fluidos de referencia para verificar el equipo.

Por otro lado, la capacidad viscosificante (CV) de una solución se puede calcular a partir del ajuste exponencial de las curvas de viscosidad (a una misma velocidad de corte) vs concentración de alginato. La viscosidad del caldo de cultivo, determinada a una velocidad de corte igual a 300 s⁻¹ (Peter *et al.* 2004; Peña *et al.* 2007 y 2011), se graficó contra la concentración de alginato de cada punto de muestra, las curvas resultantes fueron ajustadas a un modelo exponencial para calcular la CV (ecuación 14).

6. Materiales y métodos

$$\eta_{300} = e^{CV * [Alg]}$$
(Ec. 14)

En donde η_{300} es la viscosidad a 300 s⁻¹ y [Alg] la concentración de alginato en g L⁻¹.

6. 6. 5. Preparación de soluciones de alginato reconstituido

Para establecer que la capacidad viscosificante del alginato fuera determinada sólo por las características químicas del polímero, se evaluó su viscosidad en solución. Para este análisis se obtuvo el alginato a las 72 h de cada condición propuesta, y se prepararon soluciones en concentraciones desde 1 a 4 g L^{-1} en medio de cultivo para tener el mismo pH. La extracción se llevó a cabo con el siguiente procedimiento:

- Se separó el alginato del paquete celular, de la misma manera utilizada para la cuantificación del alginato.
- Se obtuvo el alginato precipitado con la ayuda de una espátula y se colocó a recipientes Eppendorf de 2.0 mL de capacidad. Se retiró la humedad en una centrífuga de vacío (Eppendorf vacufuge) y las muestras se guardaron a 4° C hasta el momento del análisis.
- Se pesaron de 3 a 12 mg de alginato seco y se resuspendieron en 3 mL de medio de cultivo, dejando disolver la muestra 2 h.
- Posteriormente, se midió la viscosidad de cada solución en un reómetro (AR 1000 TA Instruements rheometers) a 300 s⁻¹ (sección 6.6.4).

6. 6. 6. Análisis de la distribución de pesos moleculares del alginato

El peso molecular promedio del alginato y el análisis de la distribución de pesos moleculares se determinaron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) con una serie de columnas de ultrahidrogel (UG 500 y Linear, Waters) utilizando un sistema de HPLC y como detector un refractómetro diferencial. Se utilizó NaNO₃ 0.1 M como eluente a 35 °C y un flujo de

0.9 mL min⁻¹ (Peña *et al.* 1997). Como referencia de los pesos moleculares, se utilizó la calibración realizada con pululanos de *Aureobasidium pullulans* (5 a 2500 kDa).

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- · Se precipitó el alginato al igual que como se realiza para el análisis del alginato reconstituido.
- Se pesaron entre 4 y 5 mg de alginato seco y se resuspendieron en 2 mL de agua mili Q, dejando disolver la muestra 2 h. La muestra resuspendida se filtró en membranas Millipore de 0.2 μm y se colocó en viales para inyectar en el HPLC.

6. 6. 7. Determinación del grado de acetilación del alginato

La técnica se basa en la cuantificación de grupos acetilos por HPLC utilizando una columna Aminex87H a 50 °C, utilizando H_2SO_4 7 mM como fase móvil a un flujo de 0.65 mL min⁻¹.

Para preparar las muestras se realizó el siguiente procedimiento:

- · Se secó el alginato tal como se describe para la determinación del peso molecular
- Se resuspendió el alginato (5-10 mg en 500 μL de agua) y se le agregaron 500 μL de NaOH 1 N. La mezcla se incubó a 80 °C por 2 h.
- Posteriormente, las muestras se enfriaron y se acidificaron con 625 μL de ácido fosfórico 1.5 M.

Las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 15 min y la fase acusa se recuperó para cuantificación de acetatos.

El ácido acético se determinó por absorción de luz UV con un detector de matriz de fotodiodos a 210 nm (Cheetham y Punruckvong 2004).

6.7. Cálculo de parámetros para describir las condiciones hidrodinámicas

El comportamiento hidrodinámico de los matraces se determinó mediante varios números adimensionales. El número de Newton (*Ne'*) se calculó con el consumo de potencia con la ecuación 1 y a partir del número de Reynolds con la ecuación 3 (sección 2.2).

Para calcular el número de Reynolds es necesario conocer la viscosidad del fluido dentro del matraz. Las soluciones de alginato se comportaron como fluidos pseudoplásticos, por lo que su viscosidad aparente dependió de la velocidad de corte efectiva a las condiciones de operación. La velocidad de corte efectiva ($\dot{\gamma}_{eff}$) se determinó mediante la correlación propuesta por Giese *et al.* (2014):

$$\dot{\gamma}_{eff} = L^{\frac{1}{m+1}} \left[\frac{P/V_L}{K} \right]^{\frac{1}{m+1}} \left[\frac{V_L^{1/3}}{d} \right]^{\frac{\chi}{m+1}} \left[\frac{V_L^{1/3}}{d} \right]^{\frac{\chi}{m+1}}$$
(Ec. 15)

En donde *L*, *x* y *y* son constantes, P/V_L la potencia volumétrica en matraces, V_L el volumen de llenado, *d* el diámetro interno del matraz, y *K* y *m* los índices de consistencia y flujo de la solución de alginato, respectivamente.

Para el desarrollo de la ecuación, Giese *et al.* (2014) tomaron como base en el método utilizado por Metzner y Otto (1957) para reactores agitados, y la propuesta por Peter *et al.* (2004) para matraces. Estos autores propusieron que potencias volumétricas iguales en fluidos newtonianos y pseudoplásticos, a una condición de operación específica, son resultado de viscosidades aparentes iguales (figura 6.5).

La ecuación 15 se ajustó a 126 puntos experimentales por el método de mínimos cuadrados (Giese *et al.* 2014). Se evaluaron matraces agitados con volúmenes nominales de 50 a 1000 mL, con volumen de llenado del 5 al 40 % de su volumen nominal, a frecuencias de agitación de 130 a 380 rpm y diámetro de agitación de 25 a 100 mm. Los fluidos evaluados fueron goma xantana (pseudoplástico) y polivinilpirrolidona (PVP) (newtoniano) a distintas concentraciones, para dar lugar a viscosidades aparentes de 11 a 151 mPa·s. Las constantes *L*, *x* e *y* tienen valores de 2.06, -0.331 y 0, respectivamente. El modelo es válido para velocidades de corte entre 20 y 2000 s⁻¹ (Giese *et al.* 2014).

Finalmente, para determinar si bajo las condiciones evaluadas el sistema se encontraba "dentro de fase" se utilizó la ecuación 5 (sección 2.2.2).



Figura 6.5. Metodología para la determinación de la velocidad de corte efectiva como función de la frecuencia de agitación. Con un fluido pseudoplástico y uno newtoniano, se mide el consumo de potencia como función de la frecuencia de agitación (izquierda superior), así como la viscosidad como función de la velocidad de corte (derecha superior). La intersección en cada diagrama indica un estado hidrodinámico igual. Esta información se combina para dar lugar a la velocidad de corte efectiva como función de la frecuencia de agitación (abajo). Peter *et al.* 2004.

6.8. Cálculo de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir del ajuste a modelos matemáticos reportados en la literatura para fermentaciones de exopolisacáridos microbianos (Klimek y Ollis 1980; Richard y Margaritis 2004).

Los datos de la cinética de crecimiento microbiano fueron descritos por la ecuación logística:

6. Materiales y métodos

$$\frac{dX}{dt} = \mu X (1 - \frac{X}{X_{máx}})$$
(Ec. 16)

donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹) y $X_{máx}$ la concentración máxima de biomasa (g L⁻¹). Integrando la ecuación anterior, considerando que $X_0 = X(t=0)$ y reordenando los términos se obtuvo la ecuación que describe el crecimiento bacteriano en el tiempo.

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{máx}}\right)(1 - e^{\mu t})}$$
(Ec. 17)

Linealizando la ecuación y graficando contra el tiempo se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ) representada por la pendiente del gráfico.

La cinética de formación de producto en función de la biomasa se determinó por el modelo de Leudeking y Piret (Leudeking y Piret 1959):

$$\frac{dP_A}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \tag{Ec. 18}$$

El término $\alpha \frac{dx}{dt}$ representa la producción asociada a la fase de crecimiento bacteriano, en donde α es un rendimiento de producto con base en biomasa. Por otro lado, el término βX es la producción no asociada a la fase de crecimiento, donde β es una velocidad de producción con base en biomasa. Estas constantes dependen de las condiciones de fermentación como pH, temperatura, etc. y del microorganismo utilizado.

Combinando las ecuaciones de formación de biomasa y producto e integrando, se obtuvo la ecuación para formación de producto en el tiempo:

$$P_{A}(t) = P_{A_{0}} + \alpha X_{0} \left[\frac{X_{0} e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_{0}}{X_{máx}}\right)(1 - e^{\mu t})} \right] + \left(\frac{\beta X_{máx}}{\mu}\right) ln \left[1 - \left(\frac{X_{0}}{X_{máx}}\right)(1 - e^{\mu t}) \right]$$
(Ec. 19)

La constante β se evalúa en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento (dX/dt = 0, $X = X_{max}$), obteniéndose a partir de la ecuación 20:

6. Materiales y métodos

$$\beta = \frac{(dP_A/dt)}{X_{max}}$$
(Ec. 20)

De un gráfico de $P_A(t) = P_{A_0} - \left(\frac{\beta X_{máx}}{\mu}\right) ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{máx}}\right)(1 - e^{\mu t})\right]$ contra $\frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{máx}}\right)(1 - e^{\mu t})}$ se

calculó el valor de α representado por la pendiente.

Para el ajuste de la cinética del consumo de sacarosa, se utilizó una ecuación que incluyó tres términos: la velocidad de crecimiento instantánea, la velocidad de formación de producto y una función de mantenimiento de biomasa:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}}\frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S}}\frac{dP_A}{dt} - k_e(X)$$
(Ec. 21)

Donde: $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa en base a sustrato, $Y_{P/S}$ es el rendimiento de producto en base a sustrato y k_e es el coeficiente de mantenimiento.

Combinando las ecuaciones para producción de biomasa y consumo de sustrato e integrando se obtuvo la siguiente:

$$S(t) = S_0 - A(X(t) - X_0) - \left(\frac{BX_{max}}{\mu}\right) ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - e^{\mu t})\right]$$
(Ec. 22)

En donde $A = \frac{1}{Y_{X/S}} + \alpha \frac{1}{Y_{P/S}}$ y $B = \beta \frac{1}{Y_{X/S}} + k_e$. *A* y *B* se resolvieron de manera análoga a α y β para la cinética de producto.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. 1. Análisis teórico para la predicción de la capacidad viscosificante de cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados

Se realizó un análisis teórico con base en datos experimentales existentes para matraces agitados (Peña *et al.* 2011). Se calcularon: el número de potencia (*Ne'*) y la VTO_{máx} para cultivos a 200 rpm con diferentes volúmenes de llenado con el objetivo de predecir la capacidad viscosificante de los cultivos de *A. vinelandii*.

El número de potencia se calculó a partir del número de Reynolds con la ecuación 3 (ver sección 2.2). Por otro lado, la $VTO_{máx}$ se calculó con la ecuación propuesta por Maier y Büchs (2001), adaptando constantes de proporcionalidad con base en los datos disponibles en el trabajo de Peña *et al.* 2011.

$$VTO_{max} \cong \frac{1}{6} (n^{0.84} V_L^{-0.84} d_0^{-0.27} d^{-1.25} - 5)$$
 (Ec. 21)

Para el análisis se consideró un intervalo de VTO_{máx} entre 1 y 3 mmol L⁻¹ h⁻¹, condiciones en las que la bacteria se encontraría limitada por oxígeno (Díaz-Barrera 2007), pero bajo las cuales se esperaría que pudiera crecer. Bajo la suposición de que en condiciones de limitación de oxígeno la velocidad específica de crecimiento (μ) es directamente proporcional a la VTO (Díaz-Barrera 2007), se realizó un análisis teórico con los datos de Peña *et al.* (2011), encontrando que la μ sería de 0.06 h⁻¹, a una VTO_{máx} igual a 1 mmol L⁻¹ h⁻¹. Esta velocidad de crecimiento es mayor a las evaluadas en otros trabajos en quimiostatos (Díaz-Barrera *et al.* 2010; Castillo *et al.* 2013), por lo que se esperaba que el microorganismo pudiera crecer a muy bajas transferencias de oxígeno.

El análisis teórico indicó que al incrementar el volumen de llenado de 100 a 200 y 300 mL, tanto *Ne*' como la VTO_{máx} disminuyen y la capacidad viscosificante del alginato se incrementa de 0.83 a $1.08 \text{ y} 1.18 \text{ Lg}^{-1}$ respectivamente (figura 7.1).

Con base en estos resultados se propuso realizar cultivos a 200 rpm con 200 y 300 mL de volumen de llenado y comparar los resultados con los cultivos desarrollados con 100 mL.



Figura 7.1. Análisis teórico para la predicción de la capacidad viscosificante del alginato producido por *A. vinelandii* a 200 rpm y diferentes volúmenes de llenado.

7. 2. Cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados con 200 y 300 mL de volumen de llenado agitados a 200 rpm.

7. 2. 1. Evolución del consumo de potencia

La figura 7.2a muestra la evolución del consumo de potencia en cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados de 500 mL, a 200 rpm con diferentes volúmenes de llenado. Como era esperado, el incremento en el volumen de llenado (de 100 a 300 mL) resultó en una disminución considerable en el consumo de potencia. En matraces con 100 mL se encontró un perfil de potencia que siguió una tendencia exponencial, en donde se alcanzó un máximo de 1.6 kW m⁻³. En contraste, al aumentar el volumen de llenado a 200 y 300 mL, la potencia disminuyó siguiendo un perfil lineal, alcanzando valores máximos de 0.62 y 0.30 kW m⁻³, respectivamente. En términos de la energía suministrada al sistema por unidad de volumen (*E*), calculada como el área bajo la curva de P/V contra tiempo, se determinaron valores de 74, 24 y 12 kW h m⁻³, para los cultivos con 100, 200 y 300 mL, respectivamente (tabla 7.1).



Figura 7.2. Evolución del consumo de potencia (línea continua) y la velocidad de corte efectiva (línea discontinua) en cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL, a 200 rpm y 25 mm de diámetro de agitación a diferentes volúmenes de llenado (a). Evolución de la viscosidad aparente (línea continua) y el número de fase (línea discontinua) en cultivos de *A. vinelandii* (b).

Las diferencias en el consumo de potencia fueron determinadas principalmente por las diferencias en la distribución del líquido y el área específica (*a*) de transferencia de momento (i.e. área entre el líquido y la pared interna del matraz). Al observar directamente el matraz, a altos volúmenes de llenado (200 y 300 mL) el movimiento del líquido se limitó dentro del matraz. Esto posiblemente se debió a que la forma troncocónica del matraz no permite que la altura máxima del líquido en agitación aumentara de manera proporcional con el aumento del

volumen de llenado, lo que resultó en una menor área específica de transferencia de momento (Büchs *et al.* 2000a, 2007) (figura 7.3).

Volumen de llenado (mL)	Frecuencia de agitación (rpm)	P/V _{máx} (kW m ⁻³)	<i>E</i> (kW h m ⁻³)
100	200	1.60	74
200	200	0.62	24
300	200	0.30	12

Tabla 7.1. Resumen de los consumos de potencia en matraces de 500 mL a 200 rpm con diferentes volúmenes de llenado.



Figura 7.3. Distribución de líquido dentro del matraz a distintos volúmenes de llenado. Altura máxima alcanzada a diferentes volúmenes de llenado (a). Área de transferencia de masa (interfase gas-líquido) a diferentes volúmenes de llenado (área en blanco) (b). Adaptado de Büchs *et al.* 2007.

Por otro lado, el alginato en solución se comporta como fluido pseudoplástico, por lo que su viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de corte efectiva. Utilizando la correlación propuesta por Giese *et al.* (2014) (ecuación 15, sección 6.7), se calcularon las velocidades de corte efectivas en cada condición evaluada. El cultivo con 100 mL se caracterizó por velocidades de corte efectivas entre 1300 (al inicio del cultivo, IC) y 320 s⁻¹ (al fin del cultivo, FC). Al incrementar el volumen de llenado, a 200 y 300 mL, las velocidades de corte

disminuyeron a un rango entre 650 (IC) y 210 s⁻¹ (FC), y 510 (IC) a 110 s⁻¹ (FC), respectivamente (figura 7.2a). Esto se debió a que la velocidad de corte disminuyó al incrementar la distancia entre la pared del matraz y la interfase gas-líquido. Büchs *et al.* (2007) propusieron que a bajos volúmenes de llenado se forma una capa delgada de líquido en la pared del matraz, mientras que al incrementar el volumen de llenado, la capa que se forma es más gruesa.

Con base en las velocidades de corte efectivas estimadas, se calcularon las viscosidades aparentes con el modelo de Ostwald-de Waele (ecuación 13, sección 6.6.4). La figura 7.2b muestra los perfiles de viscosidad de los caldos de cultivo de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL, a 200 rpm con diferentes volúmenes de llenado. En el cultivo con 100 mL, los cambios en el consumo de potencia a 100 mL se relacionaron con los cambios de viscosidad del caldo. Bajo esta condición el perfil de viscosidad siguió una tendencia exponencial, llegando a un máximo de 35 mPa·s a las 72 h. Hasta las 36 h, los perfiles de viscosidad del caldo de cultivo con 200 mL de volumen de llenado fue menor a la observada en las otras condiciones, alcanzando un máximo de 34 mPa·s (72 h), lo que apoya que se observaran menores consumos de potencia. En contraste, con 300 mL de volumen de llenado se alcanzaron viscosidades iguales a 55 mPa·s (72 h), sin embargo, el consumo de potencia fue el menor determinado a 200 mL se caracterizó por las menores velocidades de corte.

Similar a lo reportado por Peña *et al.* (2007), después de las 60 h en el cultivo con 100 mL de volumen de llenado, cuando el consumo de potencia alcanzó su máximo, ocurre una disminución hasta 1.4 kW m⁻³. Estos autores atribuyeron la disminución del consumo potencia a un fenómeno denominado "fuera de fase" (Büchs *et al.* 2000b; Peña *et al.* 2007). Este fenómeno ocurre bajo ciertas condiciones operacionales (la viscosidad y el diámetro de agitación son los principales factores determinantes) y está caracterizado por cambios de la distribución del fluido dentro del matraz, en donde la mayoría del líquido se mantiene en la base y sólo una pequeña fracción del fluido está rotando en la pared del matraz, por lo tanto, el consumo de potencia se reduce considerablemente (Büchs *et al.* 2000b, 2001). Para comprobar que la disminución del consumo potencia observada en la figura 7.2a se debía a que el sistema se encontraba "fuera de fase", se calculó el número *Ph* con la ecuación 5 (sección 2.2.2). A partir de las 60 h, el número de fase

alcanza valores de 1.36. Büchs *et al.* (2000b) establecieron como límite "dentro de fase" un *Ph* mayor a 1.26. Sin embargo, los mismos autores proponen que el fenómeno "fuera de fase" no ocurre de manera inmediata, sino que existe una región de transición en valores cercanos a 1.26, a partir de viscosidades mayores a 17 mPa·s (Büchs *et al.* 2000b, 2001). Por lo tanto, considerando un *Ph* igual a 1.36, y viscosidades aparentes mayores a 30 mPa·s (figura 7.2b), es posible decir que la disminución de potencia se podría deber al fenómeno "fuera de fase". Finalmente, a altos volúmenes de llenado (200 y 300 mL), el número de fase fue superior a 1.70 a lo largo del tiempo de cultivo, lo que indica que los cultivos se desarrollaron "dentro de fase".

7. 2. 2. Velocidad de transferencia de oxígeno

La figura 7.4 muestra la evolución de la VTO durante los cultivos de *A. vinelandii* a diferentes volúmenes de llenado. La VTO_{máx} a 100 mL fue igual a 5.5 mmol L⁻¹ h⁻¹; mientras que a 200 y 300 mL la VTO_{máx} disminuyó considerablemente hasta 2.8 y 2.1 mmol L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Maier y Büchs (2001) demostraron que al incrementar el volumen de llenado, se genera un decremento en la VTO. Esto está relacionado, al igual que el consumo de potencia, con cambios en la distribución del líquido en el matraz, que en este caso resultó en la reducción del área específica de transferencia de masa (interfase gas-líquido) (figura 7.3).

Los cultivos, en todas las condiciones evaluadas, mostraron perfiles caracterizados por zonas en donde la VTO permaneció constante, lo que indica que los cultivos se desarrollaron bajo limitación de oxígeno (Anderlei y Büchs, 2001; Anderlei *et al.* 2004). La coexistencia de un sistema nitrogenasa (sensible al oxígeno) y un metabolismo aerobio estricto en *Azotobacter vinelandii* ha sido explicado por una alta tasa de respiración para remover el oxígeno de la superficie celular, un bajo estado redox intracelular (altas concentraciones de NADPH y NADH), así como un metabolismo eficiente en términos energéticos (Setubal *et al.* 2009). Dado que a altos volúmenes de llenado la disponibilidad y la transferencia de oxígeno son menores con respecto a bajos volúmenes de llenado (Maier y Büchs 2001), bajo estas condiciones no se suministró oxígeno suficiente a la bacteria desde el inicio del cultivo, por lo que la limitación fue más evidente en los cultivos con 200 y 300 mL. Finalmente, y como se muestra en la figura 7.4,



la VTO disminuyó cuando se hubo agotado el sustrato limitante y terminó el crecimiento celular (Díaz-Barrera *et al.* 2007).

Figura 7.4. Velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL, a 200 rpm y 25 mm de diámetro de agitación a diferentes volúmenes de llenado.

En el cultivo con 100 mL se observó una zona característica del crecimiento diáuxico entre las 3 y las 30 h. Es posible que esto se deba al agotamiento de algún elemento traza (Fe, Mo, Mg, etc) que impacten en el metabolismo respiratorio, pero que no se ve reflejado en el crecimiento; sin embargo, se requieren de más estudios para entender mejor las causas de la disminución de la VTO en esa zona.

7. 2. 3. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa

La figura 7.5a muestra la cinética de crecimiento de los cultivos con los tres distintos volúmenes de llenado evaluados. En el cultivo a 100 mL se alcanzó una concentración máxima de biomasa (medida como peso seco) igual a 3.74 ± 0.57 g L⁻¹ y la velocidad específica de crecimiento fue de 0.11 ± 0.01 h⁻¹, lo cual es congruente con los valores reportados anteriormente para las mismas condiciones de cultivo (Peña *et al.* 2011). Al aumentar el volumen de llenado, ocurrió un efecto negativo en el crecimiento celular al disminuir la VTO. Las velocidades específicas de crecimiento para los cultivos a 200 y 300 mL fueron 0.09 ± 0.00 h⁻¹ para ambos casos.

Tal como sucedió con el crecimiento, al aumentar el volumen de llenado la síntesis del polímero resultó afectada. En todos los cultivos la producción de alginato ocurrió parcialmente asociada al crecimiento, congruente con lo reportado anteriormente para matraces agitados (Reyes *et al.* 2003; Peña *et al.* 2007). El cultivo a 100 mL alcanzó un máximo de 5.89 ± 0.70 g L⁻¹ a las 72 h; mientras que a 200 y 300 mL la máxima concentración de alginato (a las 72 h) fue de 2.90 ± 0.62 g L⁻¹ y 3.26 ± 0.32 g L⁻¹ respectivamente (figura 7.5b). En términos de los rendimientos de alginato en base a biomasa, para el cultivo con 100 mL se observó un rendimiento de 1.14 ± 0.09 g_A g_X⁻¹, a 200 mL 0.48 ± 0.07 g_A g_X⁻¹ y 0.61 ± 0.15 g_A g_X⁻¹ a 300 mL. Bajo la condición de 300 mL de volumen de llenado, ocurrió un incremento en el rendimiento de alginato (*Y*_{X/S}). Esto podría estar relacionado con el papel biológico del polímero en *Azotobacter vinelandii*, ya que el alginato se produce como parte de la estructura del quiste que se forma en condiciones de desecación y en estos quistes se puede esperar limitación por oxígeno (Castillo *et al.* 2013; Priego-Jiménez *et al.* 2005).

Las concentraciones de sacarosa fueron determinadas a lo largo del tiempo de cultivo (figura 7.5c), encontrando que en ninguna de las condiciones la producción de biomasa o alginato estuvo limitada por falta de este sustrato. Lo anterior sugiere que el crecimiento se detuvo debido al agotamiento de algún otro nutriente presente en el medio de cultivo. Para los tres volúmenes de llenado se encontraron concentraciones finales muy similares, 8.24 ± 0.74 g L⁻¹ para 100 mL, 6.42 ± 1.82 g L⁻¹ para 200 mL y 9.88 ± 1.03 g L⁻¹ para 300 mL.

A pesar de que no existieron diferencias significativas entre las concentraciones finales de sacarosa y biomasa en cada cultivo evaluado, sí las hubo en la producción de alginato entre la condición de 100 mL y las otras condiciones evaluadas. Se sabe que *Azotobacter vinelandii*, además de producir alginato produce PHB en condiciones de limitación de oxígeno (Peña *et al.* 2011a), por lo que es posible que a bajas velocidades de transferencia de oxígeno (2.8 y $2.1 \text{ mmol } \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), haya existido un mayor flujo de la fuente de carbono hacia la producción de PHB con respecto a la condición de 100 mL (Castillo *et al.* 2013).



Figura 7.5. Cinéticas de: crecimiento (a), producción de alginato (b), consumo de sacarosa (c) y pH (d) de cultivos de *A. vinelandii* a diferentes volúmenes de llenado. Las líneas continuas en los incisos a-c indican el ajuste a los modelos cinéticos.

Por otro lado, se monitoreó el pH, encontrando a 100 mL una disminución de 7.1 ± 0.0 a 5.4 ± 0.0 , valores que coinciden con lo previamente reportado (Peña *et al.* 2007, 2011). En contraste, los perfiles de pH para los cultivos a 200 y 300 mL son muy similares entre sí, pero distintos al perfil para 100 mL, en donde al final de cada cultivo el pH fue de 6.1 ± 0.2 (figura 7.5d), lo cual es congruente con una menor producción de ácido algínico.

7. 2. 4. Capacidad viscosificante

La figura 7.6 muestra las curvas de viscosidad a 300 s⁻¹ vs concentración del alginato producido a diferentes volúmenes de llenado agitados a 200 rpm. Las capacidades viscosificantes se calcularon ajustando cada curva a un modelo exponencial (ecuación 14, sección 6.6.4). Los valores encontrados demuestran que al incrementar el volumen de llenado del matraz y disminuir la frecuencia de agitación, disminuye el consumo de potencia y la capacidad viscosificante del alginato obtenido se incrementó. La menor capacidad viscosificante, de 0.66 L g⁻¹, se encontró en la condición de alta potencia (74 kW h m⁻³), mientras que al disminuir este parámetro (11 a 24 kW h m⁻³), la capacidad viscosificante incrementó hasta 1.14 L g⁻¹. Esto resultó congruente con la predicción del análisis teórico (sección 7.1) y con lo reportado por Peña *et al.* (2011).



Figura 7.6. Relaciones viscosidad/concentración de los caldos de cultivo de *A. vinelandii* en matraces con diferentes volúmenes de llenado agitados a 200 rpm.

7. 3. Cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados con 200 y 300 mL de volumen de llenado y frecuencias de agitación de 125 y 150 rpm

Con los resultados del análisis teórico (sección 7.1) se predijo que, a altos volúmenes de llenado (200 y 300 mL) y bajas frecuencias de agitación (150 y 125 rpm) sería posible aumentar aún más la capacidad viscosificante del alginato con respecto a capacidad viscosificante encontrada bajo las condiciones a 200 rpm.

7. 3. 1. Evolución del consumo de potencia

En la figura 7.7 se muestra la evolución del consumo de potencia y la viscosidad para cultivos de *A. vinelandii* en matraces agitados de 500 mL, con diferentes volúmenes de llenado y frecuencias de agitación. Al incrementar el volumen de llenado, de 100 a 300 mL, y disminuir la frecuencia de agitación, de 200 a 125 rpm, el consumo de potencia disminuyó a valores muy cercanos a cero (0.02 kW m⁻³). Pliego (2014) observó que a bajas frecuencias de agitación (alrededor de 100 rpm), cuando el movimiento del líquido es muy limitado, el diferencial entre las mediciones con líquido y sólido es menor a la resolución del sensor de torque (0.08 Ncm). Por lo tanto, a esta condición, el consumo de potencia medido se encontró muy cerca del límite de sensibilidad del equipo de medición. En este caso, tanto la transferencia de masa y el mezclado se afectaron severamente; sin embargo, como se mostrará más adelante, la bacteria pudo crecer bajo estas condiciones.

En contraste, en el cultivo con 200 mL de volumen de llenado y 150 rpm, el perfil de potencia fue lineal e incrementó desde 0.13 a 0.22 kW m^{-3} . En términos de la energía suministrada al sistema por unidad de volumen (*E*), en el cultivo a 125 rpm con 300 mL se entregó una potencia total igual a 0.4 kW h m^{-3} ; mientras que en el cultivo a 150 rpm y 200 mL se entregaron 11 kW h m⁻³, un valor muy similar a la condición de 200 rpm y 300 mL de volumen de llenado (tabla 7.2).



Figura 7.7. Evolución del consumo de potencia (línea continua) y la velocidad de corte efectiva (línea discontinua) en cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL con 25 mm de diámetro de agitación a diferentes volúmenes de llenado y frecuencias de agitación (a). Evolución de la viscosidad aparente (línea continua) y el número de fase (línea discontinua) en cultivos de *A. vinelandii* (b).

Similar al cultivo con 200 mL a 200 rpm, en el cultivo con el mismo volumen de llenado agitado a 150 rpm, la velocidad de corte efectiva disminuyó desde 600 hasta 120 s⁻¹. Además, los perfiles de viscosidad fueron muy similares en ambos casos (figura 7.7b). Sin embargo, el consumo de potencia de la condición a 150 rpm fue mucho menor. Las diferencias se pueden atribuir debido a los cambios en la frecuencia de agitación, la cual afecta la distribución del líquido dentro del matraz. Al disminuir la frecuencia de agitación disminuye la altura máxima del líquido y por lo

tanto, el área de transferencia de momento (Büchs *et al.* 2007). Bajo esta condición, el sistema se encontró "dentro de fase", como lo demuestra el número Ph, el cual fue superior a 1.60 durante todo el tiempo de cultivo.

Volumen de llenado (mL)	Frecuencia de agitación (rpm)	P/V _{máx} (kW m ⁻³)	<i>E</i> (kW h m ⁻³)
100	200	1.60	74
200	200	0.62	24
200	150	0.22	11
300	200	0.30	12
300	125	0.02	0.4

 Tabla 7.2. Resumen de los consumos de potencia en matraces de 500 mL a diferentes frecuencias de agitación con distintos volúmenes de llenado.

Por otro lado, el cultivo con 300 mL a 125 rpm se caracterizó por velocidades de corte efectivas desde 220 hasta 30 s⁻¹. Con esta información, se calcularon viscosidades aparentes de 1 a 12 mPa·s. Estos valores, junto con la baja frecuencia de agitación (125 rpm), explican los muy bajos consumos de potencia observados en esta condición.

Para poder comparar los perfiles de viscosidad obtenidos en las condiciones propuestas, se evaluaron a una misma velocidad de corte ($\dot{\gamma} = 300 \ s^{-1}$). En la figura 7.8 se puede observar que la mayor viscosidad (37 mPa·s) se alcanzó en el cultivo desarrollado bajo el mayor consumo de potencia (1.6 kW m⁻³); por otro lado, en los cultivos desarrollados bajo consumos de potencia en el rango de 0.62 a 0.22 kW m⁻³, se alcanzaron viscosidades máximas iguales a 30 mPa·s. Finalmente, en los cultivos desarrollados a 300 mL y 125 rpm, se observaron muy bajas viscosidades (7 mPa·s) en donde el consumo de potencia fue el mínimo determinado en este trabajo (0.02 kW m⁻³).



Figura 7.8. Evolución de la viscosidad del caldo de cultivo de *A. vinelandii* bajo distintas condiciones de operación. Todos los valores son reportados a una velocidad de corte igual a 300 s⁻¹.

7. 3. 2. Velocidad de transferencia de oxígeno

La figura 7.9 muestra la evolución de la VTO en cultivos con 200 mL de volumen de llenado a 150 rpm y 300 mL de volumen de llenado a 125 rpm. En ambas condiciones, al igual que en los cultivos desarrollados a 200 rpm, el organismo se encontró limitado por oxígeno alcanzando una $VTO_{máx}$ de 2.2 y 0.85 mmol L⁻¹ h⁻¹, con 200 y 300 mL respectivamente (tabla 7.3).

Volumen de llenado (mL)	Frecuencia de agitación (rpm)	VTO _{máx} (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)
100	200	5.50
200	200	2.80
200	150	2.20
300	200	2.10
300	125	0.85

Tabla 7.3. Resumen de las velocidades de transferencia de oxígeno máximas en matraces de 500 mLa diferentes frecuencias de agitación con distintos volúmenes de llenado.

Los decrementos en la VTO pueden explicarse, por un lado, por disminuciones en el consumo de potencia, lo que afectó el transporte convectivo. Y por otra parte, por cambios en la distribución del líquido en el matraz, ya que al incrementar el volumen de llenado y disminuir la frecuencia de agitación, disminuyó el radio del paraboloide que describe la distribución del líquido, lo que resultó en la reducción de la interfase gas-líquido (figura 7.3).



Figura 7.9. Velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 500 mL, a 25 mm de diámetro de agitación, a diferentes frecuencias de agitación y con distintos volúmenes de llenado.

En el cultivo con 200 mL a 150 rpm, la VTO incrementó a partir de las 36 h desde 1.65 a 2.2 mmol L⁻¹ h⁻¹. La transferencia de masa en la película de líquido en la pared del matraz puede describirse con la teoría de penetración de Higbie bajo ciertas condiciones de operación; sin embargo, su validez depende sensiblemente del grosor de la película y el tiempo de contacto (Maier *et al.* 2004). La teoría de Higbie se deriva de la suposición de un espacio semi-infinito, lo que significa que sólo es aplicable cuando la profundidad de la penetración es mucho menor comparada con el grosor total de la película de líquido (Higbie 1935). Giese *et al.* (2014a) demostraron que a viscosidades mayores a 10 mPa·s, como en el caso del cultivo con 200 mL a 150 rpm, la teoría de Higbie no es aplicable. La VTO_{máx} en un matraz agitado incrementó cuando la viscosidad aumentó de 1 a 10 mPa·s. A viscosidades iguales a 80 mPa·s, la VTO_{máx} puede ser mayor que a viscosidades iguales a las del agua. Esto se debe a que, a altas viscosidades, y por lo tanto altos grosores de película, la concentración de oxígeno en la pared del matraz es muy cercana a 0 mol m⁻³; contrario a lo que pasa a bajas viscosidades, donde la concentración de

oxígeno en la película es mayor a 0 mol m⁻³. Esto maximiza el gradiente de concentración en la interfase gas-líquido, lo que resulta en incrementos en la transferencia de oxígeno en la película del líquido (Giese *et al.* 2014a).

Tanto en los perfiles de viscosidad aparente (evaluados a la misma velocidad de corte $\dot{\gamma}$ =300 s⁻¹, figura 7.8) y de transferencia de oxígeno, pueden distinguirse tres grupos: el primero (AP), representado por los cultivos con 100 mL de volumen de llenado donde se alcanzaron una alta potencia y elevadas viscosidades; un segundo grupo intermedio (PI), representado por los cultivos con 200 y 300 mL de volumen de llenado a 200 y 150 rpm; y un tercer grupo de muy baja potencia (MBP), representado por los cultivos con 300 mL de volumen de llenado a 125 rpm. Es importante notar que en el grupo intermedio se utilizaron distintas condiciones operacionales que dieron por resultado respuestas muy similares, lo cual es indicador de que independiente de la estrategia a seguir, la manipulación de distintos parámetros operacionales puede dar lugar a áreas de transferencia muy similares.

7. 3. 3. Cinéticas de crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa

En los perfiles cinéticos, al igual que en los perfiles de viscosidad y VTO, se pueden distinguir 3 grupos (figura 7.10). En el caso del cultivo con 200 mL a 150 rpm, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.10 ± 0.00 h⁻¹, alcanzando concentraciones finales de biomasa y alginato iguales a 4.11 ± 0.08 y 3.27 ± 0.52 g L⁻¹, respectivamente. Estos valores fueron muy similares a los encontrados para los cultivos a 200 rpm con 200 y 300 mL (tabla 7.4).

Por otro lado, a muy bajos consumos de potencia (i.e. cultivo con 300 mL a 125 rpm) la bacteria se encontró bajo una alta limitación de oxígeno (0.85 mmol L⁻¹ h⁻¹), por lo tanto, el crecimiento y la producción de alginato resultaron afectados negativamente. La velocidad específica de crecimiento fue igual a 0.07 ± 0.00 h⁻¹, y la cantidad máxima de alginato producido fue igual a 1.64 ± 0.23 g L⁻¹ (figura 7.10b); sin embargo, el rendimiento fue mayor comparado con las condiciones de intermedia y baja potencia. Como se mencionó anteriormente, rendimientos elevados de alginato para *A. vinelandii* han sido reportados bajo condiciones de limitación de oxígeno y nutrientes, los cuales pueden ser respuesta de la bacteria para sobrevivir en ambientes adversos (Castillo *et al.* 2013; Priego-Jiménez *et al.* 2005) (figura 7.11).



Figura 7.10. Cinéticas de: crecimiento (a), producción de alginato (b), consumo de sacarosa (c)
y pH (d) de cultivos de *Azotobacter vinelandii* a diferentes volúmenes de llenado y frecuencias de agitación. Las líneas continuas en los incisos a-c indican el ajuste a los modelos cinéticos.



Figura 7.11. Rendimiento de alginato con respecto a la biomasa en función de la energía suministrada al matraz.

El consumo de sacarosa, en el cultivo con 200 mL a 150 rpm la sacarosa residual (72 h) fue igual a 10.29 ± 1.29 g L⁻¹ (figura 7.10c). Estos valores coinciden con los encontrados en los cultivos desarrollados PI (24 y 12 kW h m⁻³). En este grupo se observaron perfiles de viscosidad, crecimiento, producción de alginato y consumo de sacarosa similares. Esto sugiere que bajo esas condiciones, no hubo diferencias en la movilización de la fuente de carbono hacia las diferentes vías metabólicas en *A. vinelandii*, probablemente debido a que las velocidades de transferencia de oxígeno fueron similares.

<i>E</i> (kW h m ⁻³)	VTO (mmol L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Alg _{máx} producido (g _A L ⁻¹)	$Y_{A/X}$ (g _A g _X ⁻¹)
74	190	0.11 ± 0.01	5.89 ± 0.70	1.14 ± 0.09
24	153	0.09 ± 0.00	2.90 ± 0.62	0.48 ± 0.07
11	129	0.10 ± 0.00	3.27 ± 0.52	0.68 ± 0.14
12	133	0.09 ± 0.00	3.26 ± 0.32	0.60 ± 0.15
0.4	54	0.07 ± 0.00	1.64 ± 0.23	0.90 ± 0.09

 Tabla 7.4. Resumen de los parámetros cinéticos de los cultivos de *A. vinelandii* a diferentes volúmenes de llenado y frecuencias de agitación.

En contraste, la concentración final de sacarosa (72 h) en el cultivo con 300 mL a 125 rpm, fue igual a 15.74 ± 0.70 g L⁻¹ (figura 7.10c). El menor consumo de sacarosa observado en esta condición fue congruente con menores producciones de biomasa y alginato. Debido a esto, la producción de ácidos orgánicos asociados al metabolismo disminuyó considerablemente, lo que resultó en un decremento mínimo de pH de 7.05 ± 0.05 hasta 6.69 ± 0.04 (figura 7.10d).

7.4. Viscosidad de caldos de cultivo y alginato reconstituido producido por *A. vinelandii* en matraces agitados

La figura 7.12 muestra las curvas de viscosidad vs concentración del alginato producido en las condiciones evaluadas en este trabajo. La menor capacidad viscosificante (0.66 L g⁻¹) se encontró en la condición de AP. En contraste, las mayores capacidades viscosificantes (1.00 a 1.14 L g^{-1}) se observaron bajo las condiciones de PI, con VTO_{máx} similares (2.1 a 2.8 mmol L⁻¹ h⁻¹). A muy bajos consumos de potencia, y VTO, la viscosidad alcanzada por el caldo de cultivo fue baja y no se pudo realizar un ajuste exponencial (constante de correlación $r^2 < 0.90$).

En la figura 7.13 se puede observar la capacidad viscosificante (CV) en función del consumo total de potencia (E). La capacidad viscosificante es inversamente proporcional a la energía entregada al sistema, de acuerdo con Peña *et al.* (2011).



Figura 7.12. Relaciones viscosidad/concentración de los caldos de cultivo de *A. vinelandii* en matraces agitados a diferentes volúmenes de llenado y frecuencias de agitación.



Figura 7.14. Capacidad viscosificante (CV) en función del consumo de potencia (*E*). En azul se muestran los valores generados en este trabajo; en blanco se muestran datos de Peña *et al.* (2011).



Figura 7.13. Viscosidad aparente de soluciones de alginato reconstituido obtenido bajo distintas condiciones de operación en matraces agitados.

Adicionalmente, se determinó la viscosidad del alginato reconstituido en soluciones con medio de cultivo para evaluar bajo las mismas condiciones de pH (figura 7.14). Como se puede observar, de acuerdo con reportes anteriores (Peña *et al.* 2006, 2007), la relación de viscosidad vs concentración de alginato reconstituido sigue una tendencia lineal. Al igual que las capacidades viscosificantes de los caldos de cultivo, las mayores viscosidades corresponden al alginato obtenido a bajos consumos de potencia (11 y 12 kW h m⁻³), lo cual sugiere que ambos productos poseen características químicas similares. Por otro lado, contrario a la capacidad viscosificante del caldo de cultivo desarrollado a 24 kW h m⁻³, la viscosidad del alginato reconstituido es menor a la de las condiciones mencionadas anteriormente, así como el alginato

producido a MBP, cuya solución generó muy bajas viscosidades en comparación al sintetizado bajo potencias mayores. Una vez ajustado el pH, el efecto de la viscosidad se debe a las características químicas del alginato (peso molecular, acetilación y relación M/G). Bajo condiciones de PI, no hubo diferencias significativas en el peso molecular ni el grado de acetilación (sección 7.5), por lo que es posible que los cambios en la viscosidad de las soluciones de alginato reconstituido se deban a diferencias en la relación y organización monomérica. La distribución de los monómeros en una cadena de alginato no puede describirse estadísticamente, por lo que no es suficiente conocer la composición monomérica del alginato para determinar la estructura o las propiedades del polímero (Skjak-Braek y Draget 2012). Por otro lado, estudios de difracción de rayos X han demostrado que los residuos de guluronato en bloques homopoliméricos se encuentran en conformación ${}^{1}C_{4}$, mientras que los residuos de manuronato se encuentran en conformación ⁴C₁. Por lo tanto, el alginato contiene los cuatro enlaces glucosídicos posibles: diecuatorial, diaxial, ecuatorial-axial, y axial-ecuatorial (figura 7.15). El enlace diaxial entre los bloques G resulta en una rotación obstaculizada alrededor del enlace glucosídico, lo que puede dar lugar a cadenas de alginato más extendidas y fuertes. Además, las repulsiones electrostáticas entre los grupos cargados del polímero pueden incrementar la extensión de la cadena y, por lo tanto, su viscosidad (Skjak-Braek y Draget 2012).



Figura 7.15. Estructura conformacional del alginato. Posibles enlaces glucosídicos: diaxial (GG) (a); axial-ecuatorial (GM) (b); diecuatorial (MM) (c); ecuatorial-axial (GM) (d). Skjak-Braek y Draget 2012.

7.5. Características químicas del alginato producido en matraces agitados por A. vinelandii

Las propiedades reológicas del alginato dependen principalmente del peso molecular (PMP), el grado de acetilación y la relación M/G (Clementi 1997; Peña *et al.* 2006; Peña *et al.*, 2011; Skjak-Braek y Draget 2012). Varios autores han descrito el efecto positivo de la limitación de oxígeno en el peso molecular y el grado de acetilación del alginato (Peña *et al.*, 1997; Díaz-Barrera *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2013). Este fenómeno puede explicarse como resultado de distintos cambios metabólicos que favorecen los procesos de polimerización y acetilación del alginato. En este sentido, los cultivos evaluados en este trabajo se desarrollaron en condiciones de muy bajo consumo de potencia, y por lo tanto, de limitación de oxígeno, con valores de VTO_{máx} entre 0.85 y 5.5 mmol L⁻¹ h⁻¹.

Entre los cultivos desarrollados a 12 y 74 kW h m⁻³, se encontraron las diferencias más importantes en la capacidad viscosificante. Como se puede observar en la figura 7.16, el peso molecular promedio, al igual que la CV, es inversamente proporcional a la potencia. En los cultivos desarrollados a 74 kW h m⁻³ el peso molecular fue igual a 1760 \pm 95 kDa, al disminuir el consumo de potencia a un rango entre 0.4 y 12 kW h m⁻³, el peso molecular incrementó a valores alrededor de 2200 \pm 200 kDa. Con similitud a estos resultados, Peña *et al.* (2011) reportaron incrementos en el PMP del alginato producido en cultivos desarrollados a 74 y 15 kW h m⁻³, desde 1750 \pm 50 a 1880 \pm 40 kDa.



Figura 7.16. Peso molecular promedio y grado de acetilación del alginato en función del consumo de potencia (*E*).
Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el grado de acetilación en los cultivos evaluados entre 11 y 74 kW h m⁻³, con valores entre 2.60 ± 0.60 y 3.00 ± 0.37 %, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de acetilación reportado para cultivos bajo condiciones de limitación de oxígeno (Castillo *et al.* 2013); sin embargo, no se encontró el incremento reportado por Peña *et al.* (2011) desde 3.5 ± 0.3 a 5.8 ± 0.3 % para cultivos desarrollados a 74 y 15 kW h m⁻³, respectivamente. En contraste, en los cultivos desarrollados a la más baja potencia (0.4 kW h m^{-3}), el grado de acetilación de los alginatos disminuyó hasta 1.90 ± 0.45 %. Se ha propuesto que bajo condiciones de limitación de oxígeno, el flujo de acetil-CoA se dirige hacia la producción de PHB y la acetilación del alginato (Castillo *et al.* 2013). Es posible que bajo la condición de menor VTO_{máx}, el acetil-CoA se haya utilizado principalmente para la producción de PHB, disminuyendo su disponibilidad para la acetilación del alginato.

7.6. Escalamiento en biorreactor

En la última etapa de este proyecto, se propuso realizar el escalamiento de la producción de alginato con una alta capacidad viscosificante de matraz a fermentador de 3.0 L. El consumo de potencia es uno de los parámetros operacionales más importantes, especialmente en cultivos de reología compleja, ya que está relacionado con la hidrodinámica del sistema, el mezclado y la transferencia de masa (Büchs et al. 2000a, 2001). Existen reportes de escalamiento exitoso de matraz a fermentador utilizando como criterio de escalamiento la potencia volumétrica (Cull *et al.* 2002; Rocha-Valadez *et al.* 2006; Peña *et al.* 2008; Gamboa-Suasnavart *et al.* 2013). Además, en este trabajo, se demostró que a bajos consumos de potencia (11 kW h m⁻³), es posible obtener alginato de alta capacidad viscosificante (0.9 a 1.1). Por estas razones, se propuso utilizar el perfil de consumo de potencia como criterio de escalamiento.

La condición seleccionada para el escalamiento fue donde se obtuvo la mayor capacidad viscosificante del alginato producido en matraces agitados, en el intervalo de condiciones evaluadas en este trabajo. Por lo tanto, el perfil de potencia obtenido en matraces con 300 mL de volumen de llenado a 200 rpm, que va desde 0.09 a 0.30 kW m⁻³, se reprodujo en un fermentador

incrementando la frecuencia de agitación de 320 a 500 rpm (velocidades que se determinaron con el algoritmo propuesto en la sección 6.5).

En la figura 7.17 se presentan los perfiles de potencia del cultivo en fermentador y del cultivo en matraces agitados con 300 mL de volumen de llenado agitados a 200 rpm. Para reproducir el consumo de potencia se incrementó la frecuencia de agitación.



Figura 7.17. Cambios en la frecuencia de agitación en el biorreactor de 3 L para reproducir el perfil de potencia de matraces agitados.

En la figura 7.18a se muestra el perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el biorreactor de 3 L. El perfil de TOD coincide con información previamente reportada para cultivos de *A. vinelandii* en biorreactor sin control de TOD (Díaz-Barrera *et al.* 2007; Millán 2006), en donde generalmente se distinguen 3 etapas. La fase de adaptación (hasta las 7 h), en donde rápidamente el oxigeno disuelto disminuye a valores cercanos a cero, lo anterior como resultado de la alta tasa de consumo de oxígeno, característico de esta bacteria (Díaz-Barrera *et al.* 2007; Millán 2006; Castillo *et al.* 2013). En la segunda fase, la TOD permaneció constante en valores cercanos a 0 %, es decir, en limitación de oxígeno (Castillo *et al.* 2013), esto coincidió con la fase de crecimiento de *A. vinelandii.* Finalmente, al iniciar la fase estacionaria, la velocidad de respiración de la bacteria disminuyó y la TOD se incrementó (62 h). A partir de las 46 h ocurrieron incrementos en la TOD, esto se puede deber a que la reología del caldo de cultivo cambió, lo que podría dar lugar a un mezclado deficiente y, por lo tanto, lecturas incorrectas en el sensor de O_2 .



Figura 7.18. Perfil de TOD (a), pH (b), cinética de crecimiento (c) y de producción de alginato (d) en fermentador de 3 L y matraz agitado con 300 mL agitado a 150 rpm con cultivos de *A. vinelandii*.

El pH en el biorreactor (figura 7.18b) disminuyó de 7.0 a 5.7 debido a la producción de ácido algínico, similar a lo ocurrido en los cultivos en matraces agitados. En la figura 7.18 se muestran la producción de biomasa (c) y alginato (d) en el biorreactor de 3 L. En el escalamiento se lograron obtener tendencias muy similares en producción de polímero. Al final del cultivo (70 h) se alcanzó una concentración máxima de biomasa igual a 4.4 g L⁻¹. En términos de la producción de alginato, se alcanzaron 3.7 $g_A L^{-1}$ al final del cultivo. Existen reportes (Díaz-Barrera *et al.* 2007, 2009; Peña *et al.* 2011) que demostraron que el crecimiento celular y la producción de alginato son función de la VTO. Era posible que al igualar el perfil de consumo de potencia entre el matraz agitado y el fermentador, ocurrieran también condiciones similares de transferencia de oxígeno, como se puede observar en el perfil de TOD, el cultivo en biorreactor, al igual que los cultivos en matraces, se desarrolló bajo limitación de oxígeno.

Por otro lado, se encontró una capacidad viscosificante de 0.94 Lg^{-1} , en donde, a concentraciones de alginato alrededor de 3.5 g L^{-1} se alcanzaron viscosidades iguales a 34 mPa·s (figura 7.19). Estos valores fueron equivalentes a los obtenidos en matraces agitados desarrollados a potencias de 11 kW h m⁻³. En el fermentador, el peso molecular promedio fue de 1760 kDa, y el grado de acetilación fue 2.42 %, ambos valores se encontraron dentro del intervalo determinado en los matraces agitados.



Figura 7.19. Capacidad viscosificante de los caldos de cultivo de *A. vinelandii* en matraces agitados y fermentador de 3 L.

La información generada en este proyecto contribuye al entendimiento de los fenómenos de transporte e hidrodinámicos que ocurren dentro de un matraz agitado bajo diferentes condiciones operacionales, y cómo éstos pueden determinar el comportamiento de un cultivo bacteriano. Los resultados indican que la capacidad viscosificante del alginato, producido en cultivos de *Azotobacter vinelandii,* está influenciada por el consumo de potencia y, por lo tanto, por la velocidad de transferencia de oxígeno.

Desde el punto de vista tecnológico, este estudio proporciona un acercamiento para entender el escalamiento del proceso de producción de alginato, con la posibilidad de utilizar esta información en la implementación de distintas estrategias de cultivo que permitan mejorar la producción y/o calidad del polímero.

8. CONCLUSIONES

- En este trabajo se logró caracterizar el consumo de potencia y la transferencia de oxígeno en cultivos de *Azotobacter vinelandii* en matraces agitados, en una región de baja potencia, la cual no había sido estudiada hasta el momento.
- Los cultivos de *A. vinelandii* en matraces con volúmenes de llenado de 200 y 300 mL agitados a 150 y 125 rpm respectivamente, generaron consumos de potencia de 0.4 a 11 kW h m⁻³ y velocidades de transferencia de oxígeno de 0.85 a 2.8 mmol L⁻¹ h⁻¹.
- Estas condiciones de baja potencia y transferencia de oxígeno tienen un efecto negativo sobre el crecimiento celular y la producción de alginato de *A. vinelandii*, debido a la limitación de oxígeno.
- La capacidad viscosificante del alginato producido por *A. vinelandii*, en estas condiciones de baja potencia y limitación, se incrementa significativamente de 0.66 a 1.14 Lg^{-1} , debido al incremento en el peso molecular del polímero (de 1760 ± 95 a $2200 \pm 200 \text{ kDa}$).
- Utilizando el consumo de potencia como criterio de escalamiento, es posible producir alginato de alta capacidad viscosificante (0.94 L g⁻¹) en un biorreactor, similar al polímero obtenido en matraces.

9. Perspectivas

9. PERSPECTIVAS

- Es recomendable medir el consumo de potencia y la velocidad de transferencia de oxígeno en el biorreactor de tanque agitado para entender cuál de estos parámetros determina el escalamiento de la producción de alginato de alta capacidad viscosificante.
- Existen reportes en donde se ha encontrado que el peso molecular es inversamente proporcional a la velocidad específica de crecimiento (Priego *et al.* 2005; Díaz-Barrera *et al.* 2009, 2010). Considerando que en este trabajo el rango de velocidades de crecimiento estudiado fue de 0.07 a 0.11, sería conveniente evaluar velocidades de crecimiento menores, en sistemas tipo quimiostato en condiciones de baja P/V y/o VTO, para tratar de incrementar el peso molecular.

10. REFERENCIAS

Anderlei, T., Büchs, J. 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. Biochem. Eng. J. 7: 157-162.

Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. Biochem. Eng. J. 17: 187-194.

Bazou, D., Coakley, W., Hayes, A., Jackson, S. 2008. Long-term viability and proliferation of alginate-encapsulated 3-D HepG2 aggregates formed in an ultrasound trap. Toxicol. In Vitro. 22: 1321-1331.

Büchs, J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. Biochem. Eng. J. 7 (6): 91-98.

Büchs, J., Lotter, S., Milbradt, C. 2001. Out of phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. Biochem. Eng. J. 7 (2): 135-141.

Büchs, J., Maier, U., Lotter, S., Peter, C. P. 2007. Calculating liquid distribution in shake flasks on rotary shakers at waterlike viscosities. Biochem. Eng. J. 34: 200-208.

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., Zoels, B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary machines: I. Power consumption measurements in unbaffled flasks at low viscosity. Biotechnol. Bioeng. 68 (6): 589-593.

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., Zoels, B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. Biotechnol. Bioeng. 68 (6): 594-601.

Büchs, J., Zoels, B. 2001. Evaluation of maximum to specific power consumption ration in shaking bioreactors. J. Chem. Eng. Japan. 34 (5): 647-653.

Castillo, T., Galindo, E., Peña, C. F. 2013. The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 40 (7): 715-723.

Cheetham, N. W. H., Punruckvong, A. 1985. An HPLC method for determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. Carb. Polym. 5: 399-406.

Clementi, F., Mancini, F, Mancini, M., Moresi, M. 1997. Rheological behavior of aqueous dispersions of bacterial sodium alginate. En Engineering and food at ECEF7. Parte 1. Jowitt R. Sheffield Academic Press, Sheffield (UK). E25-E28.

Cull, S. G., Lovick, J. W., Lye, G. J., Angeli, P. 2002. Scale-down studies on the hydrodynamics of two-liquid phase biocatalytic reactors. Bioprocess Biosyst. Eng. 25:143-153.

Díaz-Barrera, A., Peña, C., Galindo, E. 2007. The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:903-910.

Díaz-Barrera, A. 2007. Estudio de la producción de alginato por *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones de limitación de oxígeno. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM.

Díaz-Barrera, A., Silva, P., Ávalos, R., Acevedo, F. 2009. Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O₂ transfer rate in chemostat cultures. Biotechnol. Letters. 31: 825-829.

Díaz-Barrera, A., Silva, P., Berrios, J., Acevedo, F. 2010. Manipulating the molecular weight of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. Bioresource Technol. 101: 9405-9408.

Draget, K. I., Smidsrod O., Skjàk-Bræk, G. 2005. Alginate from algae. En: Polysaccharide and Polyamides in the food Industry. Steinbüchel, A.; Rhee, S.K. (eds); Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, pp. 1-30.

Ertesvag, H., Hoidal, H. K., Hals, I. K., Rian, A., Doseth, B., Valla, S. 1995. A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. Mol. Microbiol. 16:719-731.

Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C., Galindo, E. 2013. Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. Enzyme Microbiol. Technol. 53 (2): 85-91.

FMC Biopolymer. 2014. (citado 20.08.2014). Disponible en: www.fmcbiopolymer.com.

Danisco DuPont. 2014. (citado 18.11.2014). Disponible en: http://www.danisco.com/food-beverages/.

Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. Microbiol. Cell Fact. 7:1–16.

Gamboa-Suasnavart, R.A., Marín-Palacio, L.D., Matínez-Sotelo, J.A., Espitia, C., Servín-González, L., Valdez-Cruz N.A., Trujillo-Roldán M.A. 2013. Scale-up from shake flask to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis*. World J. Microb. Biotechnol. 29: 1421-1429.

García-Ochoa, F., Gomez, E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. Biotechnol. Adv. 27: 153-176.

Giese, H., Azizan, A., Kümmel, A., Liao, A., Peter, C. P., Fonseca, J. A., Hermann, R., Duarte, T. M., Büchs, J. 2014a. Liquid films on shake flask walls explain increasing maximum oxygen transfer capacities with elevating viscosity. Biotechnol. Bioeng. 111 (2): 295-308.

Giese, H., Klöckner, W., Peña, C., Galindo, E., Lotter, S., Wetzel, K., Meissner, L., Peter, C. P. 2014. Effective shear rates in shake flasks. Chem. Eng. Scien. 118: 102-113.

Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, F., Wang, Y., Rehm, B. H. A. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. Microbiol. Biotech. 6: 637-650.

Higbie, R. 1935. The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. Trans. Am. Inst. Chem. Eng. 31(2): 365-388.

Hugmark, G. 1980. Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 19: 638-641.

Jain, S., Franklin, M. J., Ertesvag, H., Valla, S., Ohman, D. E. 2003. The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 47:1123-1133.

Jain, S., Ohman, D. E. 1988. Deletion of *algK* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polyer formation and results in uronic acid secretion. J. Bacteriol. 180: 634-641.

Klimek, J., Ollis, D. 1980. Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. Biotechnol. Bioeng. 22:2321–2342.

Klöckner, W., Büchs, J. 2011. Bioreactors - Design: Shake-Flask bioreactors. En Comprehensive biotechnology. Elsevier. (2):213-226.

Klöckner, W., Büchs, J. 2012. Advances in shaking technologies. Trends Biotechnol. 30(6): 301-314.

Lee, K. Y., Mooney D. J. 2012. Alginate: Properties in biomedical applications. Prog. Polym. Sci. 37: 106-126.

Lozano, E., Galindo, E. Peña, C. 2011. Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. Microbial Cell Fact. 10: 13.

Luedeking, R., Piret, E. L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 1: 393-412.

Lynn, A. R., Sokatch, J. R. 1984. Incorporation of isotope from specifically labeled glucose into algiantes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 158:1161-1162.

Maier, U., Büchs, J. 2001. Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. Biochem. Eng. J. 7: 99-106.

Maier, U., Losen, M., Büchs, J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. Biochem. Eng. J. 17: 155-167.

McHugh, D. J. 2003. Alginate: en A guide to the seaweed industry. FAO. (5): 39-50.

Metzner, A. B., Otto, R. E. 1957. Agitation of non-newtonian fluids. AIChE J. 3(3): 3-10.

Metzner, A., Feehs, R., Lopez Ramos, H., Otto R., Tuthill, J. 1961. Agitation of viscous Newtonian and non-Newtonian fluids. AIChE J. 7 (1): 3-9.

Millán, M. 2006. Estrategias para el escalamiento –de matraz a fermentador de 10 L- de la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Miranda, J., Rodrigues, A., Tostoes, R., Leite, S., Zimmermann, H., Carrondo, M., Alves, P. 2010. Extending hepatocyte functionality for drug-testing applications using high-viscosity alginate-encapsulated three-dimensional cultures in bioreactors. Tissue Eng. Part C Methods. 16 (6): 1223-1232.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31:426–8.

Mrotzek, C, Anderlei, T., Henzler, H.-J., Büchs, J. 2001. Mass transfer resistance of sterile plugs in shaking bioreactors. Biochem. Eng. J. 7:107-112.

Narbad, A., Russell, N. J., y Gacesa, P. 1988. Radiolabelling patterns in alginate of *Pseudomonas aeruginosa* synthesized from specifically-labelled 14C-monosaccharide precursors. Micribios. 54: 171-179.

Peña, C. 1998. Producción de alginatos bacterianos por fermentación líquida: estudio de los factores determinantes en la biosíntesis y composición del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología. UNAM.

Peña, C., Campos, N., Galindo, E., 1997. Changes in alginate molecular mass distribution, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. Appl Microbiol Biotechnol. 48: 510-515.

Peña, C., Castillo, T., Núñez, C., Segura, D. 2011a. Bioprocess design: fermentation strategies for improving the production of aginate and poly-β-hydroxyalkanoates (PHAs) by

Azotobacter vinelandii. En Progress in molecular and environmental bioengineering – from analysis and modeling to technology applications. Intech. (9):217-242.

Peña, C., Galindo, E., Büchs, J. 2011. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. Process Biochem. 46: 230-257.

Peña, C., Hernández, L., Galindo, E. 2006. Manipulation of the acetylation degree of *Azotobacter vinelandii* alginate by supplementing the culture medium with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonicacid (MOPS). Lett. Appl. Microbiol. 43:200–204.

Peña, C., Millán, M., Galindo, E. 2008. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. Process Biochem. 43: 775-778.

Peña, C., Peter, C., Büchs, J., Galindo, E. 2007. Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. Biochem. Eng. J. 36:73-80.

Peña, C., Trujillo-Roldán, M.A., Galindo, E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. Enzyme Microbiol. Technol. 27 (6): 380-387.

Peter, C. P., Stefan, L., Maier, U., Büchs, J. 2004. Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. Biochem. Eng. J. 17: 205-215.

Peter, C. P., Suzuki, Y., Rachinskiy, K., Lotter, S., Büchs, J. 2006. Volumetric power consumption in baffled shake flasks. Chem. Eng. Scien. 61: 3771-3779.

Pliego, M. 2014. Montaje, validación y caracterización de un equipo para medir el consumo de potencia en línea en cultivos en matraces agitados. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. UAEM.

Priego-Jiménez, R., Peña, C., Ramírez, O. T., Galindo, E. 2005. Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Eng. J. 25: 187-193.

Remminghorst, U., Rehm, B. H. 2006a. Alg 44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. 580:3883-3888.

Remminghorst, U., Rehm, B. H. 2006b. In vitro aginate polymerization and the fuctional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Micribiol. 72:298-305.

Reyes, C. , Peña, C., Galindo, E. 2003. Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. J. Biotechnol. 105:189-98.

Richard, A., Margaritis, A. 2004. Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly (glutamic acid) production and other microbial biopolymers. Biotechnol. Bioeng. 87 (4): 501-515.

Robles-Price, A., Wong, T. Y. Sletta, H., Valla, S., Schiller, N. L. 2004. AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 186: 7369-7377.

Rocha-Valadez, J. A., Estrada, M., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. 2006. From shake flasks to stirred fermentors: scale-up of an extractive fermentation process of 6-pentyl-α-pyrone production by *Trichoderma harzianum* using volumetric power input. Process Biochem. 41: 1347-1352.

Sabra, W., Zeng, A. P., Deckwer, W. D. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 315-325.

Schlichting, H. 1979. Boundary layer theory. 7th edition. New York, NY: McGraw-Hill.

Seáñez, G., Peña, C., Galindo, E. 2001. High CO₂ affects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. Enzyme Microbiol. Technol. 24: 535-540.

Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espín, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T. J., Latreille, P., Ligon, L. S., Lu, J., Mærk, M., Miller, N. M., Norton, S., O'Carroll, I. P., Paulsen, I., Raulfs, E. C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S. L., Studholme, D. J., Sun, J., Viana, C. V., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D. R., Dixon, R., Wood, D. 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. J. Bacteriol. 191:4534–4545.

Skjak-Braek, G., Draget, K. I. 2012. Alginates: properties and applications. En Carbohydratebased polymer building blocks and biopolymers. Elsevier. (10): 213-218.

Sumino, Y., Akiyama, S., Fukada, H. 1972. Performance of the shaking flask. I. Power consumption. J. Fermen. Technol. 50: 203-208.

Sumino, Y., Sonoi, K., Doi, M. 1993. Scale-up of purine nucleoside fermentation from a shaking flask to a stirred-tank fermentor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 581-585.

Suresh, S., Srivastava, V. C., Mishra, I. M. 2009. Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. Crit. Rev. Biotechnol. 29: 255–278.

Trujillo-Roldán, M. A., Peña, C., Ramírez, O. T., Galindo, E. 2001. The effect of oscillating dissolved tension upon the kinetics of growth, alginate production and molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. Biotechnol. Prog. 17: 1042-1048.

Zimmermann, H., Shirley, S., Zimmermann, U. 2007. Alginate-based encapsulation of cells: past, present and future. Curr. Diab. Rep. 7 (4): 314-320.