



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



TESIS DE LICENCIATURA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
SANDOVAL RAMÍREZ YAICE BERENICE

ESCALAMIENTO DE UN PROCESO FERMENTATIVO MULTITETAPA PARA LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) EMPLEANDO LA CEPA
Azotobacter vinelandii OPNA

CON NÚMERO DE CUENTA: **308325098**

DIRECTOR:
DR. CARLOS F. PEÑA MALACARA

ASESOR:
MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Peña Malacara, en el laboratorio del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización del mismo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB-2014/238535, además de financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto IT 200216.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por todo el amor y la confianza.

A la UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y al Instituto de Biotecnología, por darme todo lo que jamás les voy a poder devolver.

Al Dr. Carlos F. Peña, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación. Gracias por apoyarme constantemente durante el proyecto y después de él.

Al Dr. Enrique Galindo y al Dr Leobardo Serrano, por sus observaciones y enseñarnos a siempre dar lo mejor de nosotros.

A la Dra. Celia Flores, por su ayuda en los momentos complicados, por cuidar de nuestra integridad y la del laboratorio.

A la Dra. Tania Castillo Marengo, por apoyarme tanto a lo largo del proyecto, con la discusión de los resultados, enseñarme, guiarme y por la amistad.

A mis compañeros del Laboratorio 10, Jonathan, Andrés, Miriam, Salvador, Leo, Julio, Karina, Sergio, Agustín, Alehli, Magda, Rita, Sandra, Esmeralda, Yesenia, por el apoyo siempre incondicional.

A Mario Caro Bermúdez y Veronica Albiter por compartir su conocimiento conmigo, por guiarme y apoyarme, con sencillez y cariño.

A Leticia Díaz, Xochitl González y Antonio Dorantes, por hacer posible nuestro trabajo y ayudarnos incondicionalmente.

DEDICATORIAS

A mis padres, por haberme dado la vida, por ser el pilar más importante, guiarme y amarme; por enseñarme el valor de las cosas, a esforzarme y luchar por lo que deseamos.

A mi familia, los que me levantan y animan con su cariño y alegría.

A todos los héroes que me acompañaron en esta historia, Tania Castillo, Mario Caro, Magda Brito, Karina Balderas, Arturo Guevara, Jessica Rubí, Iván y Lizbeth.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación, a quienes admiro y respeto profundamente, Tomás Santos, María Eugenia Yépez, Arturo Cisneros, David Serrato, Rosa María Peñaloza y Aurelio.

A todas las mujeres del IBt, que me enseñaron que uno puede ser profesionista, madre, hija, esposa, estudiante, novia y más, al mismo tiempo.

ÍNDICE GENERAL

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
3	ANTECEDENTES.....	5
3.1	Polihidroxicanoatos	5
3.2	Poli- β -hidroxibutirato (<i>PHB</i>).....	6
3.3	Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	7
3.3.1	Biosíntesis de PHB y su regulación en <i>A. vinelandii</i>	7
3.3.2	Cepas de <i>A. vinelandii</i> modificadas genéticamente.....	10
3.4	Producción de PHB a nivel de fermentador tanque agitado.....	12
3.5	Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de PHB	13
3.6	Uso de sustratos de bajo costo en la producción de PHB.....	15
3.7	Escalamiento.....	17
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
5	HIPÓTESIS.....	20
6	OBJETIVO GENERAL.....	20
6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
7	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
8.1	Equipos.....	22

8.2	Instrumentos	22
8.3	Reactivos	23
8.4	Cepa.....	23
8.5	Medio de cultivo	24
8.6	Desarrollo de los Cultivos.....	26
7.6.1	Pre-inóculo	26
7.6.2	Inóculo	26
7.6.3	Cultivos en matraz agitado	26
7.6.4	Cultivos en Biorreactor de 3 L	27
7.6.5	Escalamiento a Biorreactor de 30 L.....	29
8.7	Técnicas analíticas.....	29
8.7.1	Determinación de biomasa por peso seco.....	29
8.7.2	Cuantificación de proteína (Método de Lowry)	29
8.7.3	Cuantificación de azúcares reductores (Método de β -fructofuranosidasa-DNS).....	31
8.7.4	Cuantificación de PHB.....	33
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
9.1	Caracterización del lote de melaza de caña.....	35
9.2	Proceso de esterilización de medios de cultivo con melaza de caña.....	36
9.3	Etapa 1. Diseño del medio de cultivo	39

9.4	Etapa 2: Cultivos en Biorreactor de 3 L.....	46
9.5	Etapa 3. Escalamiento a Biorreactor de 30 L.....	58
10	CONCLUSIONES.....	64
11	PERSPECTIVAS.....	65
12	REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Estructura general de los Polihidroxicanoatos (PHA's).....	5
Figura 3.2 Estructura de monómero de 3-hidroxibutirato	6
Figura 3.3. Micrografía electrónica de transmisión de <i>A. vinelandii</i> conteniendo gránulos de PHB.....	7
Figura 3.4 Mapa metabólico de la síntesis y degradación de PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	8
Figura 3.5. Modelo de los sistemas de regulación que controlan la expresión de los genes <i>phbBAC</i>	10
Figura 7.1 Estrategia experimental.....	21
Figura 8.1 Descripción del equipo Applikon de 3 L.....	28
Figura 8.2 Curva patrón para la cuantificación de proteína.	31
Figura 8.3 Curva patrón para cuantificación de azúcares reductores.....	32
Figura 8.4 Curva patrón para cuantificación de PHB.....	34
Figura 9.1 Tinción de Gram de microorganismo contaminante. 100x	36
Figura 9.2. Cinéticas de crecimiento con base en proteína total (A), consumo de azúcares reductores (B) y producción de biomasa (C), en cultivos en matraz de <i>A. vinelandii</i> OPNA en medios con diferentes concentraciones de melaza.....	41
Figura 9.3 Cinéticas de crecimiento con base en proteína total (A), consumo de azúcares reductores (B) y producción de biomasa (C), en cultivos en matraz de <i>A. vinelandii</i> OPNA con el medio control y melaza 5%-E.L.	43
Figura 9.4 Perfiles de Oxígeno disuelto y agitación en cultivos lote-alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA, con medio melaza 5 %- E.L.....	46

Figura 9.5 Cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa (A), consumo de azúcares reductores (B), producción y acumulación de PHB (C), en cultivos lote alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA con melaza 5%- E.L. en fermentador de 3 L	50
Figura 9.6 Perfiles de oxígeno disuelto y agitación en cultivos lote-alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA, con medio melaza 3 %- E.L.....	53
Figura 9.7 Cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa (A), consumo de azúcares reductores (B), producción y acumulación de PHB (C), en cultivos lote alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA con melaza 3%- E.L. en fermentador de 3 L	55
Figura 9.8 Perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) de cultivos alimentados de <i>A. vinelandii</i> OPNA realizados por Sanguino, en medio sacarosa y extracto de levadura. .	58
Figura 9.9 Perfiles de oxígeno disuelto y agitación en cultivos lote-alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA, con S-E.L.....	59
Figura 9.10 Cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa (a), consumo de azúcares reductores (b), producción y acumulación de PHB (c), en cultivos lote alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA con S.-E.L.. en fermentador de 30.0 L	61
Figura 9.11 Acumulación y producción de PHB en cultivos de <i>A. vinelandii</i> OPNA a diferentes escalas	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Cepas mutantes de <i>A. vinelandii</i> en cultivos en matraz con medio Burk.	11
Tabla 3.2 Resumen de la producción de PHB por diferentes cepas de <i>A. vinelandii</i>	13
Tabla 3.3 Composición de melaza de caña.	16
Tabla 8.1 Composición del medio PY	24
Tabla 8.2 Composición de medios de cultivo evaluados	25
Tabla 8.3 Dilución de muestras para cuantificar PHB por HPLC.	33
Tabla 9.1 Análisis elemental del lote de melaza de caña adquirida en Alymel S.A. de C.V.	35
Tabla 9.2 Ensayos de esterilización para medios con melaza de caña	38
Tabla 9.3 Concentración de PHB y porcentaje de acumulación calculados al finalizar el cultivo (84 h) en matraz de <i>A. vinelandii</i> OPNA con medios con melaza.	42
Tabla 9.4 Concentración de PHB y porcentaje de acumulación calculados al finalizar el cultivo (84 h) en matraz de <i>A. vinelandii</i> OPNA con diferentes medios.....	45
Tabla 9.5 Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos lote alimentados de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> OPNA, en medio melaza 5%- E.L.	49
Tabla 9.6 Análisis preliminar de costos por sustrato de los cultivos lote alimentado con sacarosa y melaza al 5 %	52
Tabla 9.7 Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos lote alimentados de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> OPNA en medio melaza 3 % suplementado con extracto de levadura.	54
Tabla 9.8 Análisis de costos por sustrato de cultivos lote alimentados con sacarosa y melaza 3% suplementado con E.L.	57
Tabla 9.9 Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos lote alimentados de <i>A.</i> <i>vinelandii</i> OPNA en medio sacarosa - extracto de levadura.	60

1 RESUMEN

El Polihidroxibutirato (PHB) es un biopolímero de interés industrial que es sintetizado intracelularmente por al menos 300 especies microbianas, siendo *Azotobacter vinelandii* una de ellas. La particularidad de esta bacteria, radica en que tiene la capacidad de sintetizar polímero de alto peso molecular (> 1000 kDa). En el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha desarrollado un proceso multi-etapa para la obtención de PHB con valores de producción que no habían sido reportados para cepas de *A. vinelandii*, por lo que se tiene interés de escalar el proceso a volúmenes mayores. Sin embargo, previo al escalamiento, se desea estudiar la posibilidad de reducir el costo de proceso, debido a que la principal limitante para que el PHB entre al mercado es su elevado costo, en comparación a los derivados del petróleo. En el presente trabajo, se diseñó un medio de cultivo compuesto de melaza de caña (como fuente de carbono de bajo costo) y extracto de levadura, buscando sustituir un medio basado en el uso de la sacarosa y extracto de levadura. En ambos medios, se obtuvieron valores de producción similares (8.3-8.6 g/L PHB). En el medio con melaza se realizaron cultivos lote alimentado en fermentadores de 3 L, controlando la tensión de oxígeno disuelto (TOD) a 4 %, obteniendo una producción de 17.9 g/L de PHB. Lo anterior se refleja en un ahorro, proveniente de sustrato de 2 USD por Kg de polímero; sin embargo, se encontró que el proceso de esterilización de la melaza, resultó ser costoso y complicado operacionalmente. Debido a lo anterior, el escalamiento se realizó usando el medio sacarosa-extracto de levadura, manteniendo la TOD a 4 %, del que se obtuvieron 20.74 g/L PHB con una productividad de 0.4 g/Lh.

2 INTRODUCCIÓN

En los últimos 150 años, los polímeros sintéticos han sido materiales clave para la innovación y han contribuido al desarrollo y progreso de la sociedad⁽¹⁾. Características tales como su amplia durabilidad, fuerza y ligereza, los llevaron a sustituir a otros materiales como vidrio o papel⁽²⁾, de tal forma que su producción se ha incrementado en los últimos 50 años, hasta alcanzar 299 millones de toneladas por año⁽¹⁾. Sin embargo, en la mayoría de los casos los productos son de uso único, en especial cuando se trata de la industria alimenticia o farmacéutica. Como resultado de ser no biodegradables, la acumulación de plásticos sintéticos en el ambiente se ha convertido en un problema global⁽³⁾.

Si bien, es complicado reducir el consumo de polímeros sintéticos, existe la posibilidad de sustituirlos por otro tipo de materiales con características similares y que puedan degradarse una vez que sean desechados; es por ello que cada vez se ha prestado mayor atención al desarrollo de los biopolímeros⁽⁴⁾.

Del grupo de biopolímeros de origen microbiano, el Polihidroxibutirato (PHB) es uno de los miembros más estudiados por su gran potencial para reemplazar a los plásticos sintéticos convencionales^(5,6), con la ventaja de ser biodegradables, gracias a la actividad enzimática de diversos microorganismos⁽⁷⁾, además de ser biocompatibles.

A pesar de que se ha realizado investigación desde su descubrimiento en 1920 y a lo largo de estas décadas, no se ha logrado que el costo del PHB (\$2-5 USD/Kg), sea lo suficientemente competitivo para reemplazar a los polímeros sintéticos, como el polipropileno (\$0.70 USD/Kg)^(3,7).

Con la finalidad de reducir el costo del polímero se ha intentado mejorar la producción, a través del uso de diversos microorganismos, medios de cultivo, condiciones y estrategias de fermentación e ingeniería genética. Además, se ha buscado reducir el gasto proveniente de materias primas, que puede representar hasta el 40 % del costo de producción⁽⁹⁾. En este sentido, se ha explorado el uso de fuentes alternativas, como residuos agro-industriales (melaza, suero, lignocelulosa, aceites, etc)⁽⁹⁾, de las que se obtiene PHB con características similares a las que se obtienen con fuentes puras.

En el grupo de investigación de Biopolímeros Microbianos del Instituto de Biotecnología, Sanguino⁽¹⁰⁾ ha desarrollado un proceso multi-etapa que combina estrategias de fermentación e ingeniería genética. De dicho proceso se obtienen valores de producción que no habían sido reportados con anterioridad para cepas del género *A. vinelandii*, por lo que desea transferirse de escala laboratorio a escala piloto y eventualmente a nivel industrial.

Con la finalidad de disminuir el costo de proceso, en el presente trabajo se buscó sustituir el medio de cultivo empleado por Sanguino⁽¹⁰⁾, por uno compuesto por fuentes de carbono

de bajo costo. Por otro lado, se establecieron condiciones para escalar el proceso de escala laboratorio a escala piloto, usando la tensión de oxígeno disuelto como criterio de escalamiento.

3 ANTECEDENTES

3.1 Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA's) son una clase de poliésteres biodegradables, biocompatibles y con propiedades similares a termoplásticos y elastómeros sintéticos. Dichas características le confieren numerosas aplicaciones industriales^(10,11). Estos poliésteres son sintetizados por un grupo aproximado de 300 microorganismos, dentro del cual se encuentran principalmente bacterias^(5, 12, 13). En la mayoría de ellas, los PHA's son sintetizados y acumulados intracelularmente hasta en un 90 % de su peso seco⁽¹⁵⁾. Este se acumula bajo condiciones desfavorables de crecimiento tales como: limitación de nitrógeno, fósforo, magnesio, oxígeno y en la presencia de un exceso de fuente de carbono^(11, 15, 16). La estructura general de los PHA's se muestra en la **Figura 3.1**⁽²⁾

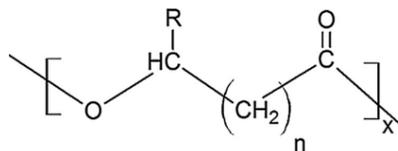


Figura 3.1 Estructura general de los Polihidroxicanoatos (PHA's).

Se han identificado 155 unidades monoméricas que pueden ser incorporadas a las cadenas de PHA's, lo que genera una gran variedad de polímeros⁽⁸⁾; sin embargo, sólo un número limitado de ellos han sido producidos en cantidades suficientes que permitan su caracterización, así como el desarrollo de nuevas aplicaciones, siendo el PHB el más estudiado^(5, 17).

3.2 Poli-β-hidroxibutirato (PHB)

El PHB es un homopolímero formado por unidades monoméricas de 3-hidroxibutirato (Figura 3.2)⁽⁶⁾, en el que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino⁽¹⁴⁾.

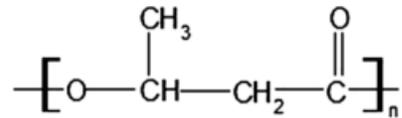


Figura 3.2 Estructura de monómero de 3-hidroxibutirato

Dentro de las funciones biológicas que desempeña el PHB, se encuentra la de fungir como fuente de carbono y energía en periodos de limitación de nutrientes⁽¹⁹⁾. Además, contribuye con la protección del sistema nitrogenasa⁽²⁰⁾ y actúa como un regulador de equivalentes de reducción intracelulares (NADH y NADPH), pues la síntesis de PHB permite regular la concentración de poder reductor, a través del almacenamiento de electrones^(15, 19, 20).

Dentro de sus aplicaciones, destacan las médicas y biomédicas, ya que puede emplearse como materiales de sutura, ingeniería de tejidos (válvulas para el corazón, andamios, etc.), liberación modificada de fármacos, entre otras. Dichas aplicaciones, son definidas por el peso molecular promedio (PMP) del polímero, del que se han reportado valores $<1 \times 10^3$ kDa hasta 5.3×10^3 kDa, considerados de alto peso molecular⁽⁶⁾.

Algunas cepas utilizadas para la producción a escala industrial de este polímero, son *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia coli* recombinante, *Azotobacter*

vinelandii, entre otros^(6, 13). Dentro del grupo de Biopolímeros Microbianos en el Instituto de Biotecnología/UNAM, se emplea *A. vinelandii* como modelo de estudio por sus características potenciales como productor de PHB.

3.3 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

Es una bacteria Gram-negativa, perteneciente a la familia Pseudomonaceae, aerobia estricta y habita en suelos y aguas frescas. Sus células son ovoides, con un diámetro de 1.5 a 2.0 μm . Son quimioorganotróficas, por lo que utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer; así como nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno⁽²⁰⁾. El estudio de *A. vinelandii* resulta interesante debido a que, además de PHB, tiene la capacidad de sintetizar diversas sustancias de interés industrial, tales como el alginato, alquilresorcinoles⁽²²⁾, ácido- γ -aminobutírico, ácido láctico, entre otros⁽²³⁾ **(Figura 3.3)**⁽⁶⁾.

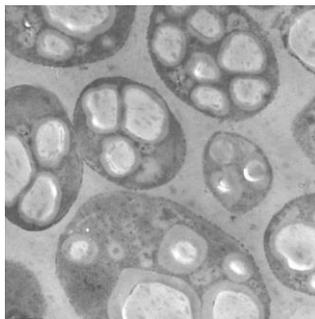


Figura 3.3. Micrografía electrónica de transmisión de *A. vinelandii* conteniendo gránulos de PHB.

3.3.1 Biosíntesis de PHB y su regulación en *A. vinelandii*

La ruta biosintética **(Figura 3.4)**⁽¹³⁾ para la generación de PHB, consta de 3 pasos catalizados por enzimas, cuyos genes se encuentran en el clúster *phbBAC*.

La síntesis comienza con la condensación de dos moléculas de acetil Co-A para formar acetoacetyl Co-A, reacción catalizada por la enzima β -cetotilasa (*phbA*). Posteriormente, la Acetoacetyl Co-A reductasa (*phbB*), reduce la Acetoacetyl Co-A a 3-hidroxi-butiril-CoA usando NADPH. Finalmente la enzima PHB sintasa (*phbC*) polimeriza los monómeros de 3-hidroxi-butiril-CoA, liberando Co-A ^(6, 19).

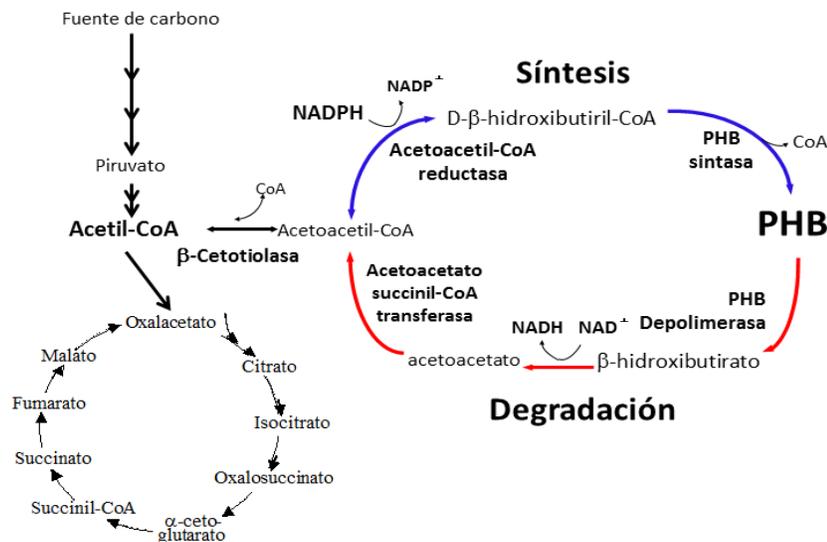


Figura 3.4 Mapa metabólico de la síntesis y degradación de PHB en *Azotobacter vinelandii*.

Se ha establecido que la regulación de la síntesis del polímero es compleja y puede presentarse a diferentes niveles. Entre estos niveles, se encuentran los reguladores transcripcionales y dos sistemas de regulación global que también controlan la expresión de los genes *phbBAC*: el sistema de dos componentes GacS/GacA y el sistema PTS^{Ntr} ⁽¹⁹⁾(Figura 3.5)⁽⁶⁾. El primero constituye un mecanismo mediante el cual, la bacteria responde a los cambios en el ambiente. GacS es una proteína membranal que al detectar ciertas señales, se autofosforila y posteriormente fosforila al regulador GacA, activándolo. Una vez fosforilado, GacA activa la expresión del gen *rsmZY*, cuyo producto es un RNA

no codificante, el cual titula una proteína denominada RsmA, que regula a nivel postranscripcional la expresión de los genes *phbBAC* afectando su estabilidad. *RsmA* es por lo tanto un regulador negativo en la síntesis de PHB

El sistema PTS^{Ntr}, también es un regulador negativo, puesto que afecta de manera negativa los niveles de expresión de los genes implicados por un mecanismo aún no descrito ⁽²⁴⁾.

Además de los mecanismos de regulación genética mencionadas anteriormente, la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*, así como el crecimiento y la producción del polímero depende de otros factores, como la composición del medio de cultivo, la capacidad metabólica de la bacteria ⁽²⁰⁾, así como el pH, temperatura, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) del cultivo ⁽²⁴⁾ y la relación molar Carbono/Nitrógeno (C/N) ⁽¹⁰⁾.

Se ha encontrado que la TOD influye en la síntesis de PHB ⁽²⁵⁾ en dos sentidos: cuando existe limitación de oxígeno, la producción de PHB se favorece debido a que el polímero actúa como pozo para canalizar el poder reductor generado en la célula; en contraste, si existe un exceso de oxígeno en el medio, la enzima β -cetotilasa se inhibe alostéricamente, disminuyendo la síntesis de PHB y dirigiendo la acetil-coA hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos ⁽¹³⁾.

Respecto a la relación C/N, Sanguino⁽¹⁰⁾ realizó estudios para determinar cuál era su influencia sobre el crecimiento y la producción de PHB. Se analizó, por triplicado, una relación C/N = 14, que es aquella que contiene el medio PY (**Tabla 8.1**), utilizado para *A. vinelandii*. Además, se analizaron dos relaciones alternativas, que fueron 10 y 18. Se observó que la relación C/N = 10 favorece el crecimiento respecto a relaciones de 14 y 18, debido a que hay una mayor disponibilidad de nitrógeno y de forma inversa, la acumulación del polímero decae conforme la relación C/N aumenta⁽¹⁰⁾.

3.3.2 Cepas de *A. vinelandii* modificadas genéticamente

Con la finalidad de generar cepas sobreproductoras de PHB, capaces de acumular una cantidad mayor de polímero, en el Departamento de Microbiología Molecular del IBt, se han estudiado y modificado los genes que participan en su biosíntesis y regulación.

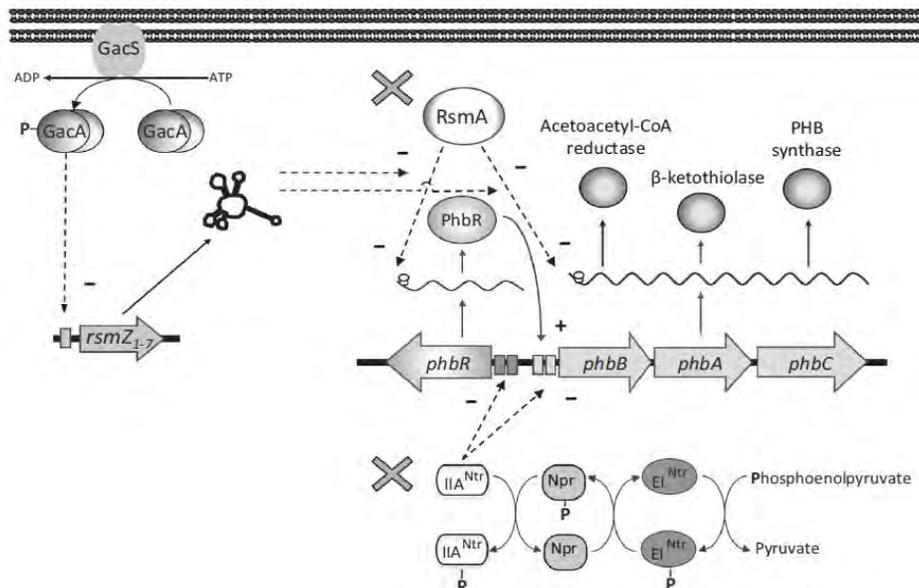


Figura 3.5. Modelo de los sistemas de regulación que controlan la expresión de los genes *phbBAC*.

(+) Indican regulación positiva, (-) indica regulación negativa. Los reguladores inactivados en las cepas OPN, OPA y OPNA, se indican con cruces grises.

Cuando se busca incrementar la producción de PHB, la síntesis de alginato constituye un gasto innecesario de sustrato ⁽¹⁹⁾, es por ello que las modificaciones al genoma para generar cepas sobreproductoras de PHB se han realizado en el fondo genético de la mutante espontánea OP.

Tabla 3.1 Cepas mutantes de *A. vinelandii* en cultivos en matraz con medio Burk.

Cepa	Genotipo	Proteína total (g/L)	PHB (g/L)	Y p/s (g PHB/g sacarosa)
OP	<i>algU-</i>	2.3 ± 0.2	8.5 ± 0.5	0.42
OPA	<i>algU-rsmA</i>	3.3 ± 0.6	7.5 ± 0.3	0.37
OPN	<i>algU-ptsN</i>	2.5 ± 0.6	9.2 ± 0.2	0.45
OPNA	<i>algU-rsmA, ptsN</i>	3.3 ± 0.3	9.3 ± 0.3	0.46

Esta cepa tiene interrumpido el gen *algU-*, que codifica para el factor σE , implicado en la vía principal de síntesis de alginato, por lo que las colonias resultantes son únicamente productoras de PHB. La cepa OPA tiene inactivado el gen *rsmA-*; mientras que, en la cepa OPN, se ha inactivado el gen *ptsN-*; ambos reguladores negativos de la síntesis de PHB. Posteriormente, se generó una doble mutante que contiene mutaciones en ambos genes (*rsmA-* y *ptsN-*), que se denominó OPNA ^(24, 9) (**Figura 3.5**)⁽⁶⁾.

Las modificaciones en el genoma de la bacteria se traducen en una mayor producción de PHB, como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ⁽²⁶⁾ respecto a la acumulación de PHB, se ha reportado que la cepa OPNA, logra alcanzar entre 80-90% de PHB con base en peso seco ⁽¹⁰⁾.

3.4 Producción de PHB a nivel de fermentador tanque agitado

En años recientes, la investigación del grupo de Biopolímeros Microbianos, se ha enfocado a mejorar la producción de PHB. Tal es el caso del trabajo de García et al ⁽²⁴⁾, quien llevó a cabo un proceso multi-etapas con la cepa mutante OPNA, usando medio PY (sacarosa, extracto de levadura y peptona) en tanque agitado de 3 L con volumen de llenado de 2 L. Inicialmente, los cultivos se desarrollaron en un régimen exponencialmente alimentado con medio PY, donde se obtuvo como resultado un incremento de 4.6 g/L a 8.8 g/L de PHB, respecto a los cultivos en lote.

Después de la alimentación exponencial, se implementó una alimentación por pulsos de sacarosa y extracto de levadura, incrementando la producción del polímero hasta 27 g/L. En este proceso, se encontró que el valor de TOD crítico fue de 4 % (con respecto a la saturación de oxígeno), donde la bacteria alcanzó su máximo crecimiento. Por debajo de ese valor, la velocidad de crecimiento se vió afectada. Dicho valor de TOD fue controlado a través de mezcla de gases (oxígeno y nitrógeno). A pesar de que ese valor de PHB no se había reportado anteriormente para cepas de *A. vinelandii*, la propuesta resulta compleja y costosa en cuanto al tiempo de proceso, materia prima, así como el enriquecimiento con oxígeno puro.

Posteriormente Sanguino ⁽¹⁰⁾ mejoró el proceso, proponiendo un cultivo alimentado por pulsos, eliminando la fase de alimentación exponencial. Este autor empleó un medio compuesto solamente por sacarosa y extracto de levadura con una relación C/N de 14;

además, los cultivos fueron únicamente aireados, controlando la TOD a través de la agitación. La producción alcanzada fue de 30 g/L con una productividad global de 0.69 g/L h y con una acumulación de PHB hasta de 80% de su peso seco. Además, en este trabajo se determinó que el peso molecular promedio del PHB fue mayor a 3500 kDa, el cual se mantuvo constante durante todo el cultivo.

La relevancia de los trabajos mencionados, radica en que los valores de producción obtenidos, no habían sido reportados con anterioridad para cepas de *A. vinelandii*, tal como se muestra en el **Tabla 3.1**⁽²⁴⁾.

Tabla 3.1 Resumen de la producción de PHB por diferentes cepas de *A. vinelandii*

Cepa	Estrategia de fermentación	Sustrato	PHB (g/L)	PHB (%)	Referencia
<i>A. vinelandii</i> UWD	Matraz	Glucosa (1%)	2.37	-	(16)
<i>A. vinelandii</i> UWD	Fed-batch	Glucosa/Peptona	25	-	(27)
<i>A. chroococcum</i>	Fed-batch	Almidón	25	46	(28)
<i>A. vinelandii</i> OPNA	Fed-batch	Sacarosa/Extracto de Levadura/Peptona	27	78	(24)
<i>A. vinelandii</i> OPNA	Fed-batch	Sacarosa/Extracto de Levadura	30	80	(10)

3.5 Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de PHB

En la literatura existen publicaciones que demuestran el impacto que tiene la composición del medio de cultivo sobre diversos aspectos de la producción de PHB. William J. Page, es uno de los autores que ha reportado diversos estudios con la cepa *A. vinelandii* UWD, para identificar las condiciones que permitan mejorar los rendimientos de PHB y así aplicar dicho conocimiento para formular un medio de cultivo de bajo costo.

En 1989, Page⁽²⁹⁾ examinó diversas fuentes de carbono puras (glucosa, sacarosa, fructosa, succinato, acetato, etc) y complejas (jarabe de maíz, extracto de malta, melaza de caña y remolacha), con la finalidad de encontrar cuales de ellas favorecían la producción del polímero. Los cultivos se realizaron en matraces de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado, con agitación de 225-250 rpm e incubados a 28-30 °C. De dicho experimento, el autor concluyó que las fuentes complejas mostraron mejores resultados.

Específicamente, en los cultivos suplementados con melaza, se observó que esta fuente de carbono incrementa la producción de PHB, respecto a sacarosa como fuente pura (2.74 mg PHB/mL vs 2.14 mg PHB/mL), aun cuando el análisis de azúcares de la melaza reveló que el contenido de azúcares era casi en su totalidad sacarosa (>96%). Por otro lado, observó que la melaza, estimula el crecimiento de forma significativa respecto a la sacarosa, al alcanzar títulos de 1.3 y 0.7 mg proteína/mL, respectivamente⁽²⁹⁾.

Posteriormente, Chen y Page⁽³⁰⁾ realizaron ensayos en fermentador de 3 L para determinar si el peso molecular del polímero se veía afectado al emplear sacarosa o melaza de remolacha. De dicho estudio, determinaron que el peso molecular era significativamente mayor al emplear melaza que sacarosa (4000 KDa vs 1600kDa).

Los efectos positivos que se obtienen al emplear la melaza en el medio de cultivo, son atribuidos a que dicho sustrato contiene sustancias, como ácidos orgánicos, sales o

compuestos nitrogenados, que promueven el crecimiento, así como la formación de polímero de elevado peso molecular ^(31, 30).

Debido a que el proceso de fijación de nitrógeno en *A. vinelandii* demanda un elevado costo energético, la adición de una fuente nitrogenada al medio de cultivo puede influir de manera positiva en la producción de PHB ⁽²⁴⁾. En este sentido, Page ⁽³¹⁾ realizó estudios acerca de fuentes de nitrógeno, determinando que en todos los casos, el rendimiento de PHB se ve aumentado al emplear fuentes complejas, como peptona de pescado o extracto de levadura, sin importar si la fuente de carbono es pura o compleja ⁽³¹⁾.

3.6 Uso de sustratos de bajo costo en la producción de PHB

En 1980 se logró por primera vez comercializar de forma exitosa PHA's bajo el nombre comercial de Biopol. A partir de entonces, diversas compañías en USA, China, Alemania, Austria, Brasil, Japón e Italia se dedicaron a la producción a escala piloto e industrial. Sin embargo, la mayoría de ellas detuvieron las actividades de manufactura debido al alto costo de producción ⁽⁹⁾. Factores como el elevado costo de materias primas, del proceso de recuperación y purificación ⁽³²⁾, así como el bajo rendimiento, contribuyen a un elevado costo de producción ⁽⁹⁾.

Además de las estrategias moleculares y de fermentación desarrolladas, el uso de sustratos de bajo costo es una opción viable para reducir el costo final del polímero, debido a que este rubro puede representar del 30-40% del costo total de producción ⁽⁹⁾. Es por

ello que se han investigado fuentes alternativas para la producción ^(11,32); tal es el caso de los sustratos de bajo costo como el suero de leche, aceites vegetales, glicerol, almidón hidrolizado, celulosa y melaza ⁽¹⁷⁾.

La melaza es un producto de desecho generado en la industria azucarera, cuya composición se muestra en la **Tabla 3.2** ⁽³⁴⁾ La producción global es de 39 millones de toneladas de melaza de caña y 12 millones provenientes de remolacha ^(8,35). Se tiene el conocimiento de que los rendimientos se ven mejorados por esta última; sin embargo, en el presente trabajo se pretende emplear sólo melaza de caña, ya que la melaza de remolacha es producida fuera del país, e importarla representaría un costo adicional.

Tabla 3.2 Composición de melaza de caña.

Componente	Rango usual (%)
Agua	17-25
Sacarosa	30-40
Glucosa	4-9
Fructosa	5-12
Otras sustancias reductoras	1-5
Otros carbohidratos	2-5
Cenizas	7-15
Compuestos nitrogenados	2-6
Ácidos no nitrogenados	2-8
Ceras, esteroles y fosfolípidos	0.1-1

La melaza de caña ha sido utilizada anteriormente para la producción de PHB con *A. vinelandii*, empleando concentraciones entre 2 y 6 % (p/v), ya que se ha observado que en concentraciones superiores, se presenta una inhibición del crecimiento y por lo tanto una menor producción

3.7 Escalamiento

El propósito de un bioreactor es proveer las condiciones óptimas para el adecuado crecimiento y/o producción de metabolitos de interés; idealmente, el ambiente del cultivo debe ser homogéneo y controlado, condiciones que pueden ser alcanzadas en tanques agitados que son el diseño preferido para el escalamiento⁽³⁶⁾. Los bioprocesos se desarrollan usualmente en cuatro etapas o escalas: estudios a nivel matraz⁽³⁷⁾, escala laboratorio, planta piloto y escala de producción⁽³⁸⁾.

Al efectuar el escalamiento, el objetivo es reproducir a gran escala el comportamiento de una fermentación desarrollada y optimizada a una escala menor⁽³⁹⁾, que nos permita obtener un producto de calidad y rendimiento similares que la escala inicial. Para cumplir dicho objetivo se debe (1) alcanzar un mezclado satisfactorio, en términos de la dispersión de gas en el líquido, (2) alcanzar una adecuada transferencia de nutrientes y gases (particularmente oxígeno y CO₂) y (3) prevenir el daño celular y minimizar las alteraciones en la fisiología celular⁽⁴⁰⁾.

Idealmente, el escalamiento debería realizarse de forma en que las condiciones de los biorreactores a escala industrial como los de laboratorio, fuesen lo más parecidas posibles, puesto que la forma tradicional de abordar este proceso se basa en los modelos y el principio de similitud. Sin embargo, esto resulta muy complicado en la práctica por la relación existente entre ciertas variables, como el tiempo de mezclado y el consumo de potencia⁽³³⁾.

Se han propuesto diferentes estrategias y criterios de escalamiento, entre los que se encuentran:

- ✓ Geometría del reactor
- ✓ Coeficiente de transferencia de oxígeno K_{La}
- ✓ Máxima cizalla
- ✓ Velocidad de flujo de gas por unidad de volumen (Q/V o VVM)
- ✓ Velocidad superficial del gas v_s
- ✓ Tiempo de mezclado
- ✓ Potencia volumétrica

En el caso de este trabajo, se empleará como criterio el oxígeno disuelto, debido a que estudios previos realizados por García⁽²⁴⁾, demuestran que 4% es el valor de TOD crítico, donde se favorece la producción de PHB.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El polihidroxiбутирато (PHB) es un biopolímero con potenciales aplicaciones dentro del área biomédica, así como un buen candidato para reemplazar materiales derivados del petróleo. Su producción ha sido mejorada a lo largo de los años, con el uso de diferentes cepas, estrategias de fermentación y medios de cultivo. Dentro del grupo de Biopolímeros Microbianos del Instituto de Biotecnología/UNAM, se ha desarrollado un proceso fermentativo multi-etapas, en tanque agitado de 3 L, con la cepa mutante *A. vinelandii* OPNA, a partir del cual se han alcanzado 30 ± 3.6 g PHB/L con un peso molecular promedio mayor a 3500 kDa. Cabe señalar que dicha producción no había sido reportada anteriormente para cepas de *A. vinelandii*; sin embargo, este proceso desea transferirse a escalas mayores, realizando algunas mejoras en el tipo de sustratos usados y formas de operación del biorreactor.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo, se buscó reemplazar el medio de cultivo originalmente utilizado (sacarosa/extracto de levadura), por uno que contenga melaza de caña como fuente de carbono de bajo costo y posteriormente realizar el escalamiento a fermentadores agitados de 30 L, empleando la tensión de oxígeno disuelto como criterio de escalamiento.

5 HIPÓTESIS

- El uso de melaza de caña, como fuente de carbono en cultivos lote-alimentados por pulsos, con la cepa *A. vinelandii* OPNA, permitirá obtener una producción promedio de 30 g PHB/ L.
- El oxígeno disuelto como criterio de escalamiento, permitirá reproducir en tanques agitados de 30 L, la producción de PHB obtenida en tanques de 3 L.

6 OBJETIVO GENERAL

Escalar de 3 a 30 L un proceso fermentativo multi-etapa para la producción de PHB con la cepa *A.vinelandii* OPNA.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un medio de cultivo empleando melaza de caña en cultivos en matraces agitados.
- Evaluar la producción de PHB en cultivos lote-alimentados, empleando el medio diseñado con melaza de caña.
- Comparar el proceso desarrollado con melaza de caña, respecto al de sacarosa, en términos de la producción y costo.
- Escalar a fermentadores agitados de 30 L, manteniendo constante el oxígeno disuelto a 4%.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

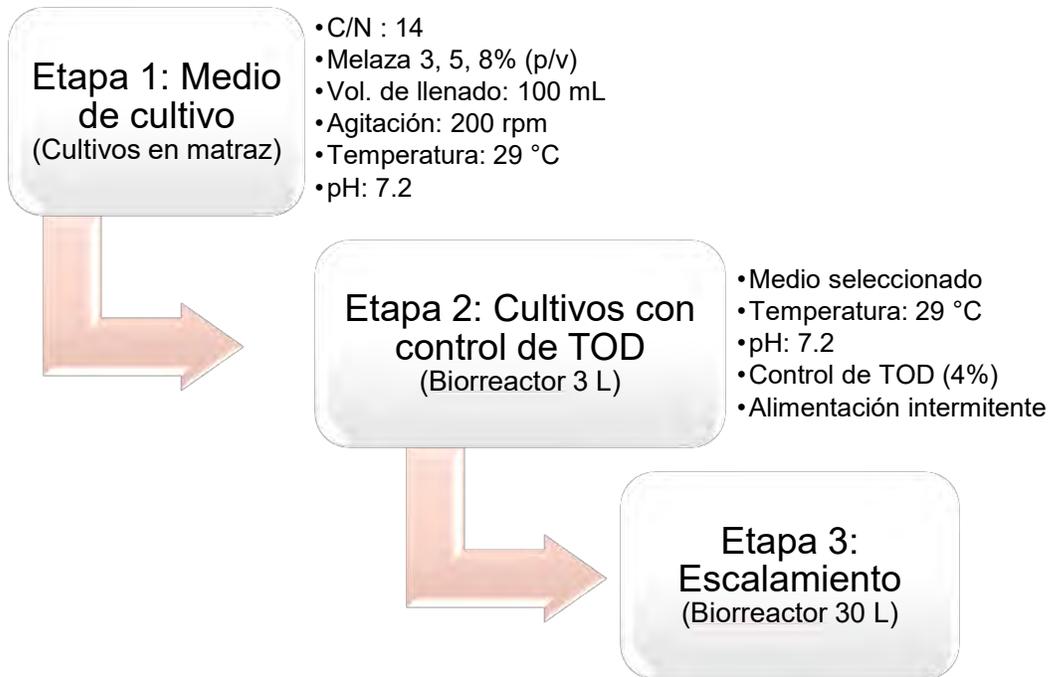


Figura 7.1 Estrategia experimental

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Equipos

- Centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804).
- Centrífuga de vacío (marca Eppendorf)
- Fermentador de 3 L (marca Applikon Schiedam, Netherlands)
- Fermentador de 30 L (marca Sartorius)
- Thermomixer (marca Eppendor, modelo 2233 Hamburg)
- Campana de flujo Laminar (marca Veco)
- Incubadora de matraces (marca New Brunswick Scientific, modelo Innova 4330)
- Incubadora (marca Boekel scientific, modelo 1320000)
- Autoclave (marca Exhaust TOMY Digital, modelo ES-215)
- Refrigerador (marca Goldstar)
- Estufa (marca Felisa)
- Bomba de vacío (Precision medical Inc)
- PC Toshiba Satellite L45-B

8.2 Instrumentos

- Balanza analítica (marca Ohaus Pioneer, modelo PA114)
- Balanza granataria (marca Brainweigh, modelo B500)
- Espectrofotómetro (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10s)
- Cromatografo de líquidos de alta resolución (marca Alliance. Columna Aminex HPX-87H Biorad; Modulo de separación Waters 2695 y Detector de fotodiodos Waters 2996)

8.3 Reactivos

- Melaza de caña (Alymel- Alcoholes y melazas de México S.A. de C.V.)
- Ácido sulfúrico (Macron)
- Hidróxido de sodio en escamas (Reasol)
- Ácido-3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)
- Polihidroxitirato (Sigma Aldrich)
- Fenol Folin Ciocalteau(Sigma Aldrich)
- Antiespumante GA 30% (Droguería Cosmopolita)
- Ácido cítrico (JT Baker)
- Citrato de sodio (JT Baker)
- Enzima β -fosfofructofuronidasa (Sigma Chemical Company)
- Sacarosa (JT Baker)
- Albúmina (USBiological)
- Peptona (BD)
- Extracto de levadura (BD)
- Agar (BD)

8.4 Cepa

La cepa fue proporcionada por el laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín (IBt/UNAM): *Azotobacter vinelandii* OPNA, mutante derivada de la cepa OP que tiene inactivados los sistemas de regulación PTSNtr y RsmA/RsmZY que actúan negativamente en la síntesis de PHB^(43, 44). Para preservar la cepa, se mantuvo a 4 °C en cajas Petri con medio PY solidificado con agar, y se realizaron resiembras mensuales.

Tabla 8.1 Composición del medio PY

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	20
Peptona	5
Extracto de Levadura	3
Agar	18
Antibiótico	Concentración (mg/L)
Kanamicina	1
Espectinomicina	8.3

8.5 Medio de cultivo

En la primera etapa de este trabajo se evaluaron cuatro medios de cultivo con melaza de caña (Alymel-Alcoholes y Melazas de México S.A. de C.V.), cuya composición se señala en la **Tabla 8.2**. La melaza de caña se sometió a un análisis elemental para conocer la composición de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno.

Tabla 8.2 Composición de medios de cultivo evaluados

Medio de cultivo	Componente	Concentración (g/L)	Relación C/N
Control (S-E.L.)	Sacarosa	30	14
	Extracto	13	
	Levadura		
A	Melaza	30	~87
B	Melaza	50	
C	Melaza	80	
D	Melaza	50	~14
	Extracto de	10	
	Levadura		
E	Melaza	30	~14
	Extracto de Levadura	6.5	

Previo a la esterilización, los medios con melaza se centrifugaron durante 30 min a 7000 rpm y se filtró al vacío, con papel filtro con tamaño de poro de 2.7 μm y posteriormente con membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm . El pH se ajustó a 7.2 con NaOH 2 N y se esterilizó con vapor a 121 °C durante 30 min. Al medio control únicamente se le ajustó el pH a 7.2 y se esterilizó por vapor a 121 °C durante 20 min.

8.6 Desarrollo de los Cultivos

7.6.1 Pre-inóculo

El pre-inóculo para cada experimento se generó por resiembra en estriado masivo de *A. vinelandii* OPNA, de cajas Petri de preservación a cajas con medio PY fresco; dichas cajas, fueron incubadas durante 48 h a 29 °C.

7.6.2 Inóculo

Con la finalidad de aumentar la transferencia de oxígeno y por lo tanto, el valor de $\mu^{(25,42)}$ el inóculo se creció en matraces bafleados de 500 mL con volumen de llenado de 100 mL del medio a evaluar. Se inocularon 3 asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo). Se incubaron a 29 °C y 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.15 - 0.19 a 540 nm (12 h aproximadamente). Cuando se alcanzó la D.O. indicada anteriormente, se inocularon los matraces en una relación 1:10.

7.6.3 Cultivos en matraz agitado

En esta etapa se evaluaron los medios de cultivo A, B, C y D. Se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de volumen de llenado total, que fueron incubados a 29 °C y 200 rpm durante 84 h, con muestreos cada 6 h durante las primeras 24 h y posteriormente cada 12 h. Todas las condiciones se analizaron por triplicado.

7.6.4 Cultivos en Biorreactor de 3 L

Los cultivos en biorreactor se realizaron en un equipo Applikon (Schiedam, Netherlands) de 3 L de volumen nominal, con un volumen de trabajo inicial de 1.5 L y 0.2 L de inóculo. En esta etapa se emplearon los medios D y E.

El equipo cuenta con 2 impulsores tipo turbina Rushton ($D_i/D_T = 0.35$ cm) y un difusor de aire con 7 orificios; además, permite medir el pH en línea utilizando un electrodo de pH marca Ingold, y controlar dicho parámetro constante en un valor de 7.2 mediante la adición automática de NaOH 2 N. El control de espuma se realizó de forma automática con la adición de antiespumante silicona al 10 % (p/v). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se registró mediante un electrodo polarográfico de oxígeno, cuya señal se transmite a un amplificador y se adquiere por una PC. El flujo de aire suministrado fue de 2 L/min y la temperatura del cultivo se mantuvo a 29 °C. Para el oxígeno disuelto, el equipo fue programado para mantener dicho parámetro a 4 % mediante el control de agitación del equipo con límites de 400 a 800 rpm.

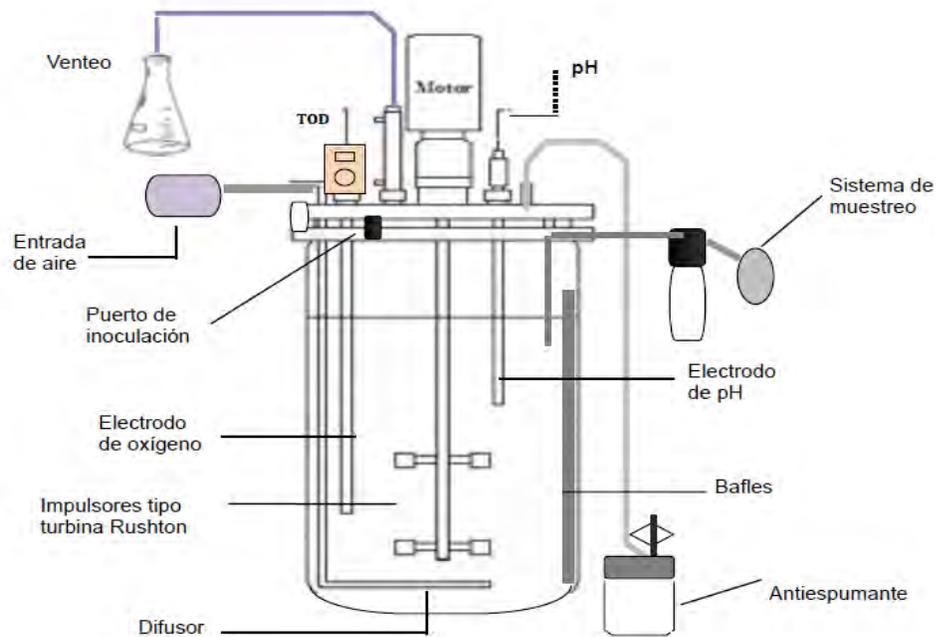


Figura 8.1 Descripción del equipo Applikon de 3 L

Los cultivos iniciaron con una etapa lote, seguido de 3 pulsos de alimentación que consistieron en 100 mL de una solución concentrada de la fuente de carbono y nitrógeno. Para seleccionar el tiempo de adición de pulsos, se monitoreó el contenido de azúcares reductores, a través de la técnica de DNS, evitando el agotamiento de la fuente de carbono. Los cultivos tuvieron una duración de 60 h, con muestreos cada 4 h.

Se analizó el contenido de proteína, azúcares reductores, peso seco, contenido de PHB y pesos moleculares al final del cultivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Una vez obtenidos los resultados, se realizó una comparación de la información generada, con los datos reportados por Sanguino⁽¹⁰⁾ para seleccionar el proceso a escalar.

7.6.5 Escalamiento a Biorreactor de 30 L

Los cultivos en 30 L, se realizaron en un fermentador Sartorius, con volumen de trabajo de 15 L y 2 L de inóculo. El flujo de aire suministrado fue de 17 L/min y el parámetro que se mantuvo constante durante el escalamiento fue el oxígeno disuelto a un valor de 4 % a través de agitación.

8.7 Técnicas analíticas

8.7.1 Determinación de biomasa por peso seco

La determinación de biomasa se realizó por el método gravimétrico de peso seco como se indica a continuación: Se colocó 1 mL de caldo de cultivo, en tubos Eppendorf de 2 mL previamente tarados y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se secó por 24 h a 70 °C. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos se colocaron en un desecador por 20 min. Finalmente, se pesaron los tubos y por diferencia de peso, se obtuvo la cantidad de biomasa, expresada en g/L de medio de cultivo.

8.7.2 Cuantificación de proteína (Método de Lowry)

En la reacción se forma un color azul cuya densidad óptica medida a 625 nm es proporcional a la cantidad de proteína presente⁽⁴⁴⁾.

Soluciones: A) Carbonato de Sodio 2 % en Hidróxido de sodio 0.1 N; B) Tartrato de sodio y potasio 2 % C) Sulfato cúprico 1%.

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

Reactivo de Folin: Se realizó una dilución 1:2 con agua destilada, de reactivo Fenol-Folin Ciocalteu.

Se tomó 1 mL de muestra de medio de cultivo y se centrifugó a 11,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se separó y conservó para análisis de azúcares reductores. Al paquete celular, se adicionó 1 mL de agua destilada y se resuspendió; en el caso de las muestras provenientes de cultivos con melaza de caña, se realizó un lavado con agua destilada, para evitar interferencia. Se transfirieron 200 μ L de muestra a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de solución reactiva, se agitó y dejó reposar por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 100 μ L de reactivo de Folin, se agitó y dejó reposar durante 30 min en obscuridad.

Posteriormente, se centrifugó a 11,000 rpm por 2 min para eliminar restos celulares y se determinó la absorbancia a 625 nm contra un blanco constituido por la mezcla de reactivos y agua destilada.

Adicionalmente, se elaboró una curva patrón utilizando albúmina bovina, con las siguientes concentraciones: 0.005, 0.01, 0.02, 0.04 0.06 y 0.08 mg/mL (**Figura 8.2**).

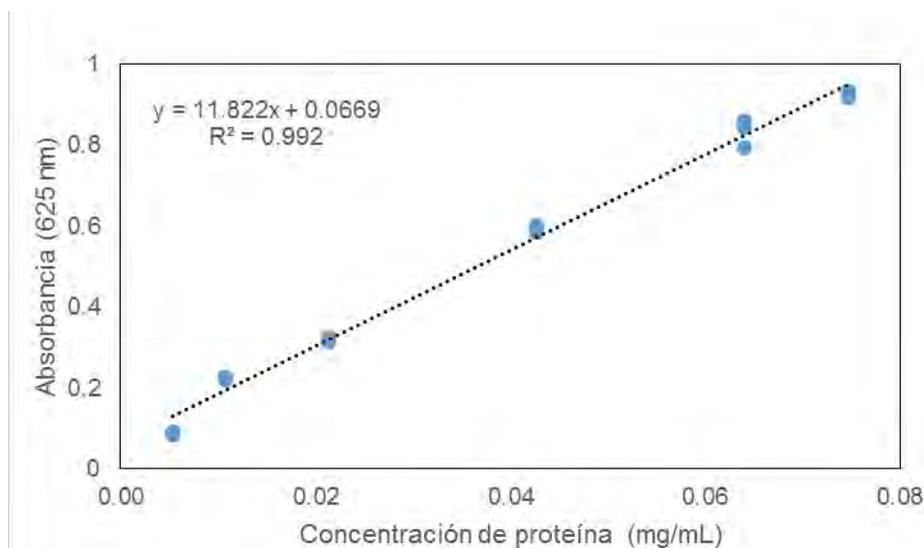


Figura 8.2 Curva patrón para la cuantificación de proteína.

8.7.3 Cuantificación de azúcares reductores (Método de β -fructofuranosidasa-DNS)

En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica medida a 540 nm es proporcional a la concentración de grupos reductores⁽⁴⁵⁾.

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

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

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

Del sobrenadante, se tomaron 20 μ L, se diluyó a 1 mL (dilución 1/50) y se transfirieron 450 μ L a un tubo de ensaye de 5 mL. Se agregaron 50 μ L de solución enzimática, se agitó y se dejó reposar durante 10 min.

Posteriormente, se agregaron 500 μ L de solución de DNS y se colocó en baño de agua en ebullición durante 5 min Inmediatamente después se colocó en baño de hielo y se diluyó con 1 mL de agua destilada. Finalmente, se determinó la absorbancia a 540 nm; usando un blanco constituido por la mezcla de reactivos y agua destilada. Adicionalmente, se elaboró una curva patrón, empleando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.01 0.02, 0.06, 0.11 y 0.13 mg/mL (**Figura 8.3**).

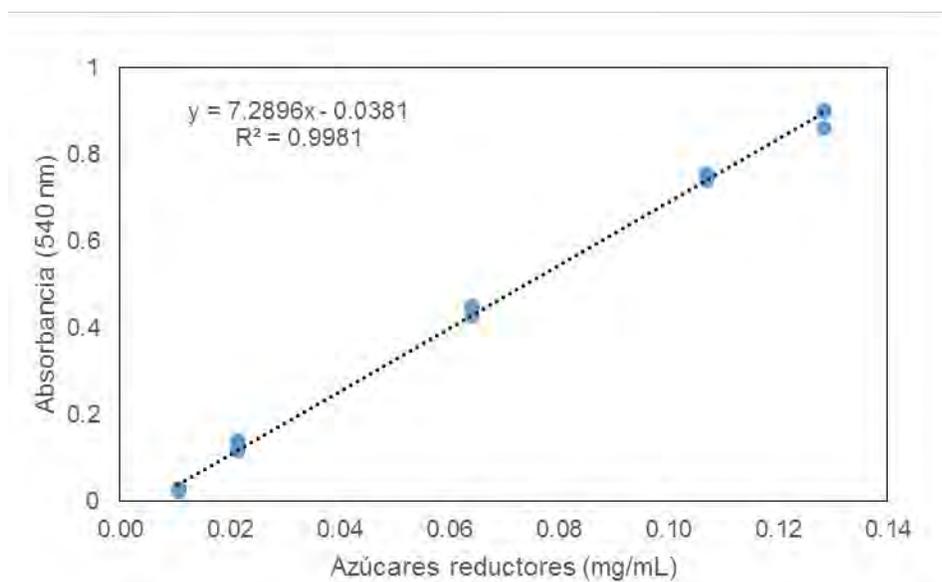


Figura 8.3 Curva patrón para cuantificación de azúcares reductores

8.7.4 Cuantificación de PHB

La cuantificación se basa en la conversión del polímero en ácido crotónico por hidrólisis con H₂SO₄ concentrado; dicha cuantificación se realiza por HPLC usando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), como fase móvil H₂SO₄ 5mM a un flujo de 0.65 mL/min y temperatura de 50 °C, empleando un detector de arreglo de diodos. El análisis se efectuó de la siguiente forma:

Se tomó 1 mL de muestra de medio de cultivo, se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante; en el caso de las muestras provenientes de cultivos con melaza, se realizó un lavado con agua destilada. Posteriormente, se secó el paquete celular en centrífuga de vacío a 60 °C por 6 h. Se registró el peso de la biomasa seca y a continuación, se adicionó 1.0 mL de H₂SO₄ concentrado. Se incubó a 90 °C y 700 rpm durante 1 h en un Thermomixer. Se realizaron diluciones con agua Milli Q de acuerdo a la

Tabla 8.3.

Tabla 8.3 Dilución de muestras para cuantificar PHB por HPLC.

Peso de biomasa seca	Dilución
<2mg	1/10
2-4 mg	1/20
>4mg	1/50

Los valores de las áreas obtenidas a 220 nm se extrapolan a la curva patrón, la cual se elabora con PHB comercial disuelto en H₂SO₄ concentrado a una concentración de 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 g/L (**Figura 8.4**)

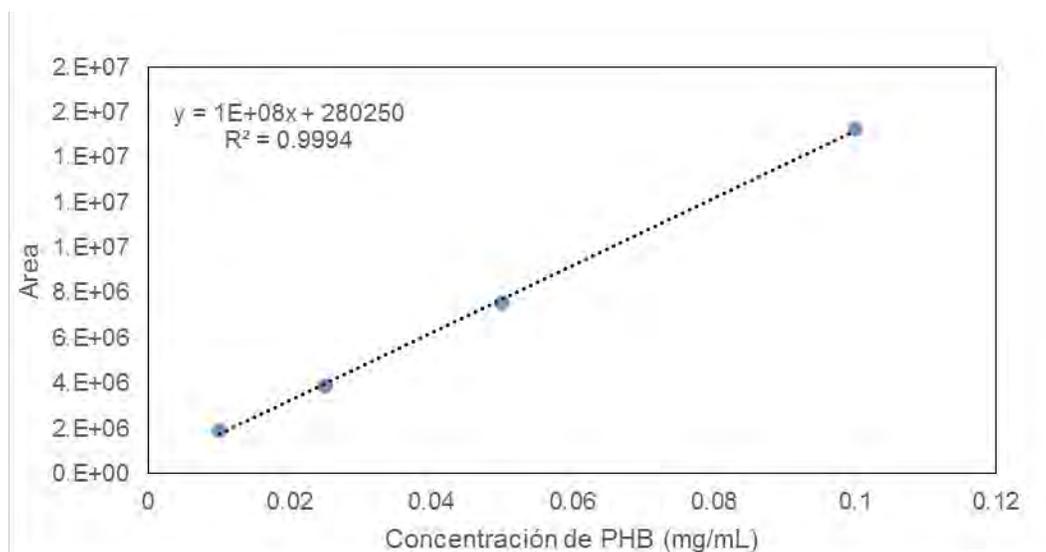


Figura 8.4 Curva patrón para cuantificación de PHB

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Caracterización del lote de melaza de caña

Con la finalidad de conocer la composición elemental del lote de con el que se prepararían los medios de cultivo, se realizó un análisis elemental en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (U.S.A.I.I.) de la Facultad de Química-UNAM, en un analizador Perkin Elmer PE2400 que da información porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. Los resultados se muestran en la **Tabla 9.1**

Tabla 9.1 Análisis elemental del lote de melaza de caña adquirida en Alymel S.A. de C.V.

Elemento	Promedio (%)
Carbono	39.55±0.035
Hidrógeno	5.57±0.163
Nitrógeno	0.39±0.092
Azufre	0.39±0.113

El contenido de nitrógeno es uno de los puntos a los que se prestó especial atención, debido a que en la literatura se reporta que dicho elemento puede encontrarse en concentraciones de 4-10 %, valor que contrasta con el obtenido en el análisis elemental (0.39 % ±0.092). Esta diferencia podría resultar de la variabilidad del sustrato.

Además, se determinó el contenido de azúcares reductores, por el método β -fructofuranosidasa-DNS⁽⁴⁵⁾, para conocer la cantidad de carbono proveniente de azúcares aprovechables, que resultó ser de 56.89% ± 2.4.

La información generada a partir del análisis elemental y el contenido de azúcares, fue útil para determinar la relación molar carbono-nitrógeno (C/N) a través de un análisis estequiométrico, que resultó ser de 87.

Cabe señalar que al ser un sustrato complejo, la composición química de la melaza puede variar entre lotes⁽⁴⁶⁾, dependiendo el tiempo, el lugar de producción o la forma de almacenamiento⁽⁴⁷⁾. Por otro lado, no se conoce la totalidad de las sustancias presentes, así como su naturaleza; por lo que podrían existir sustratos que, al igual que los azúcares, sean metabolizados por la bacteria y que no se estén considerando.

9.2 Proceso de esterilización de medios de cultivo con melaza de caña.

Existen estudios en la literatura en los que se reporta que la contaminación bacteriana es uno de los problemas que se enfrentan al emplear melaza de caña como sustrato para la producción de metabolitos⁽⁴⁸⁾.



Figura 9.1 Tinción de Gram de microorganismo contaminante. 100x
(En un óvalo se señala el microorganismo contaminante)

Se ha encontrado que *Bacillus sp* (*Bacillus subtilis*) y *Lactobacillus sp.* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus. paracasei*, etc) son dos de los géneros contaminantes que se encuentran con más frecuencia, debido a su rápido crecimiento, así como la tolerancia a altas temperaturas y bajos valores de pH^(49,50).

La problemática de esterilización de la melaza, no solo se relaciona con la cantidad y naturaleza de los microorganismos presentes, sino con la viscosidad que puede conferir al medio, en especial en las soluciones concentradas en los pulsos de alimentación, que pueden llegar a contener hasta 100 g de melaza en 100 mL de agua. Dicho aumento en la viscosidad del medio, afecta la transferencia de calor, además de que al permanecer estático, no puede asegurarse la homogeneidad. Es posible que a consecuencia de lo anterior, el protocolo estándar (calor húmedo por 15 min) no sea suficiente para asegurar la esterilización.

En el presente trabajo se probaron diversos métodos para lograr la esterilidad del medio de cultivo en los que se empleó melaza, ya que se observó contaminación proveniente del sustrato. A través de tinción de Gram, se identificaron bacterias Gram positivas de forma bacilar (**Figura 9.1**).

Debido a lo anterior, se evaluaron diferentes procedimientos de esterilización, los cuales se describen en la **Tabla 9.2**. Se plaqueó en medio rico Luria-Bertani para verificar de forma cualitativa si quedaban presentes células viables, además de que el medio líquido

se incubó a 29 °C, 200 rpm por 72 h y se verificó al microscopio la presencia de microorganismos.

Tabla 9.2 Ensayos de esterilización para medios con melaza de caña

Ensayos de esterilización	Células viables presentes	Análisis en el Microscopio (40x)	Observaciones
Calor húmedo (15 min) (Protocolo estándar)	+		-
Calor húmedo (40 min)	+		-
Calor húmedo (60 min)	+		Reducción del tiempo de vida de los electrodos del fermentador
Calor húmedo + Ácido Nalidíxico 10 µg/mL	+		Al aumentar la concentración, podía inhibirse el crecimiento de <i>A. vinelandii</i>
Filtración al vacío (2.7 µm)	Los sólidos suspendidos saturan el papel filtro		
Centrifugación a 7000 rpm + Filtración al vacío (0.45 µm)+ Calor húmedo (40 min)	-		-

De las pruebas realizadas, se seleccionó el procedimiento en el que se centrifugó a 7000 rpm, seguido de filtración al vacío por membranas de 0.45 µm y aplicación de calor húmedo por 40 min. Dicho proceso permitió asegurar la esterilidad del medio,

considerando las soluciones concentradas de melaza (pulsos de nutrientes) que se adicionaron a las fermentaciones lote-alimentado.

9.3 Etapa 1. Diseño del medio de cultivo

En esta etapa, se evaluaron 3 condiciones de medio de cultivo, probando concentraciones de 3, 5 y 8 % (p/v) de melaza para observar los efectos sobre el crecimiento y la producción de PHB.

Como se muestra en la **Figura 9.2**, se encontró que en los medios con melaza al 3 y 5 %, la velocidad específica de crecimiento (medida con base en la proteína) fue de 0.06 h^{-1} y el consumo volumétrico de azúcares cerca de $0.25 \text{ g/L} \cdot \text{h}$; mientras que, en el medio con melaza al 8 % se observa una disminución en ambos parámetros, 0.04 h^{-1} y $0.22 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ respectivamente.

En ninguna de las concentraciones evaluadas se observa una fase estacionaria, lo que resulta natural en las condiciones de 5 % y 8 % debido a que no hay agotamiento de la fuente de carbono. Sin embargo, la condición de 3 % sigue el mismo comportamiento, a pesar de la ausencia de azúcares (medidos como azúcares reductores) a partir de las 60 h, lo que podría explicarse con el aprovechamiento de otras fuentes de carbono presentes en la melaza.

Con relación a la biomasa (medida como peso seco), se observa una mayor producción en el medio al 5 % (4.0 ± 0.17 g/L) respecto al 3 % (3.2 ± 0.09 g/L), lo que puede atribuirse a que hay una mayor cantidad de azúcares disponibles. En los cultivos donde se usó el 8% de melaza, la producción de biomasa fue menor (2.5 g/L) que los casos anteriores.

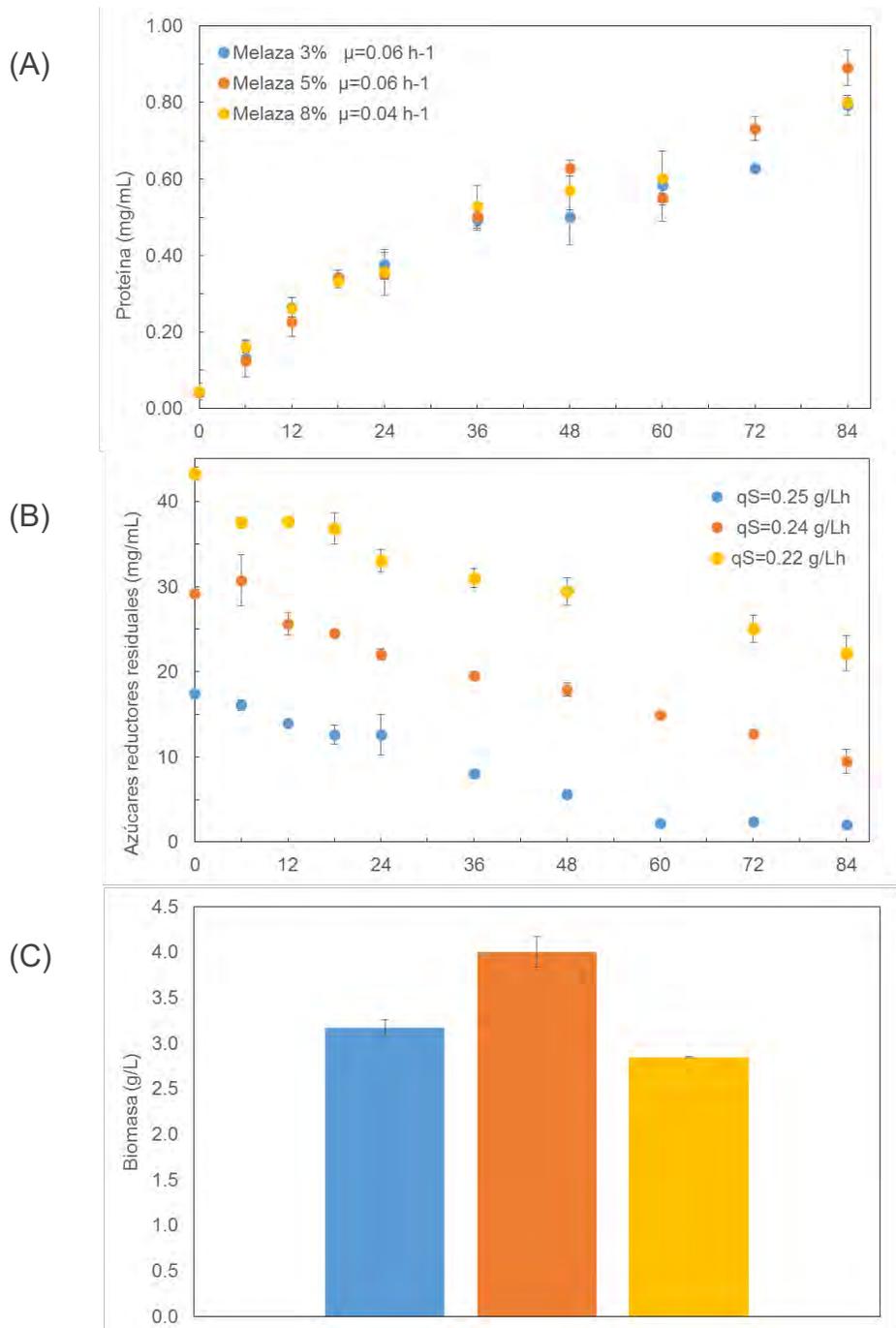


Figura 9.2. Cinéticas de crecimiento con base en proteína total (A), consumo de azúcares reductores (B) y producción de biomasa (C), en cultivos en matraz de *A. vinelandii* OPNA en medios con diferentes concentraciones de melaza.

La disminución en el crecimiento y otros parámetros, en los cultivos con concentraciones de melaza mayores a 6 %, había sido observada anteriormente por Page y había sido descrita como un efecto inhibitorio⁽²⁹⁾. Sin embargo, los datos experimentales obtenidos en este estudio no permiten asegurar que a la concentración de 8 % se presenta dicho efecto, pues la bacteria permanece metabólicamente activa (es decir que crece, consume azúcares y acumula polímero).

Es posible que la concentración de solutos ocasione inhibición por sustrato, tal como lo propusieron Wayman y Tseng⁽⁵⁰⁾, donde hay una disminución del crecimiento y al alcanzar una concentración límite, el crecimiento cesa por completo. Debido a lo anterior, la concentración de 8 % fue descartada, pues en los cultivos lote-alimentados, con la adición de los pulsos podrían acumularse en el medio sustancias potencialmente tóxicas, como arsénico y otros metales pesados, presentes en la melaza⁽³⁴⁾.

Tabla 9.3 Concentración de PHB y porcentaje de acumulación calculados al finalizar el cultivo (84 h) en matraz de *A. vinelandii* OPNA con medios con melaza.

Parámetro	Melaza 3%	Melaza 5%	Melaza 8%
PHB (g/L)	1.6±0.04	1.8±0.07	1.3±0.003
%PHB	50±5.4	45±2.6	44±2.6

Aún con las diferencias en biomasa, la producción y acumulación del polímero no se ve afectada por la concentración de melaza, como se observa en la **Tabla 9.3**

Al comparar la producción y acumulación de polímero obtenida en los medios con melaza, respecto al medio control (**Tabla 9.4**), se observa una diferencia significativa, que se atribuye a la relación C/N que presentan los medios con melaza y control.

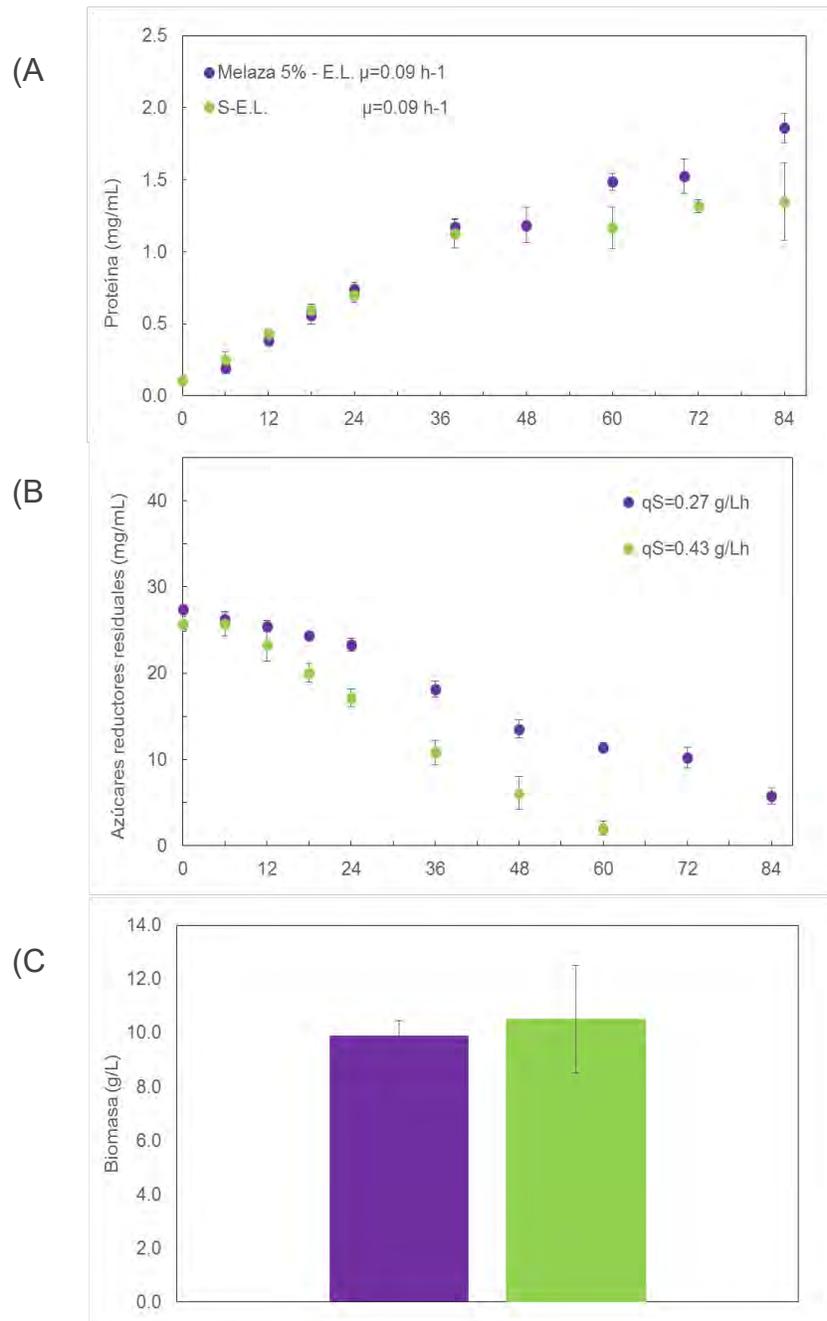


Figura 9.3 Cinéticas de crecimiento con base en proteína total (A), consumo de azúcares reductores (B) y producción de biomasa (C), en cultivos en matraz de *A. vinelandii* OPNA con el medio control y melaza 5%-E.L.

El medio control, con una relación C/N = 14, favorece el crecimiento y proporciona una acumulación de PHB $\geq 70\%$ ⁽¹⁰⁾.

En los medios con melaza, la relación C/N = 87, indica que existe un contenido pobre de nitrógeno y a pesar de que se sabe que la limitación por este nutriente, favorece la acumulación de polímero ⁽³⁾, en los cultivos a 3, 5 y 8 % de melaza se observan valores bajos de acumulación. Es posible que el bajo contenido de nitrógeno en el medio, impacte sobre el crecimiento y por lo tanto la producción de PHB.

Debido a lo anterior, se decidió adicionar extracto de levadura, para aumentar la disponibilidad de nitrógeno y así balancear la relación molar, aproximándola a 14. Dicho valor fue seleccionado, debido a que de acuerdo a los resultados obtenidos por Sanguino ⁽¹⁰⁾ se favorece la producción de polímero.

Debe aclararse, que se seleccionó extracto de levadura, debido a que de acuerdo con los estudios de Page ⁽³¹⁾ la producción de PHA's se favorece al adicionar dicha fuente, independientemente de si el carbono es de origen puro o complejo.

Se seleccionó el medio con 5 % de melaza para ser suplementado con extracto de levadura, debido a que hay una mayor cantidad de azúcares reductores disponibles, respecto al medio con 3 % de melaza.

Al adicionar el extracto de levadura, la velocidad de crecimiento en el medio de melaza al 5 %, aumenta respecto al medio no enriquecido (0.09 h^{-1} vs 0.06 h^{-1}) e incluso se alcanza la velocidad obtenida con el medio control, tal como se observa en la **Figura 9.3**. Del mismo modo, se observa un aumento en la producción de biomasa y del polímero. Este incremento se debe a que al adicionar el extracto de levadura, además de nitrógeno, se proveen micronutrientes como vitaminas, factores de crecimiento, entre otros, que promueven el crecimiento de la bacteria^(52,53)

A pesar de que también se favorece la acumulación de PHB al adicionar el extracto de levadura (**Tabla 9.4**), no se alcanzan los valores reportados para esta cepa, que pueden llegar a ser ≥ 80 % de su peso seco⁽⁵³⁾. Dado que la relación C/N fue ajustada a 14, la baja acumulación de polímero es un fenómeno atribuible a los componentes de la melaza, que podrían impactar negativamente en este parámetro.

Tabla 9.4 Concentración de PHB y porcentaje de acumulación calculados al finalizar el cultivo (84 h) en matraz de *A. vinelandii* OPNA con diferentes medios

Parámetro	S-E.L.	Melaza 5%- E.L.
PHB (g/L)	8.3±2.2	6.6 ±0.37
%PHB	79.5±4.1	66.5±4.6

A la luz de estos resultados, se confirma que la relación C/N, es un factor de gran relevancia en los cultivos de *A. vinelandii* OPNA. Con la información recabada, se seleccionó el medio con melaza 5 % enriquecido con extracto de levadura, en una relación molar C/N de 14, como medio de cultivo para realizar los cultivos lote-alimentado en fermentador de 3 L.

9.4 Etapa 2: Cultivos en Biorreactor de 3 L

En esta etapa se realizaron cultivos con alimentación intermitente, controlando el oxígeno disuelto a 4 % a través de cambios en la agitación. Dicho valor de oxígeno fue seleccionado debido a que, de acuerdo a los estudios de García y colaboradores⁽¹⁴⁾, es el valor crítico para el crecimiento de *A. vinelandii* OPNA.

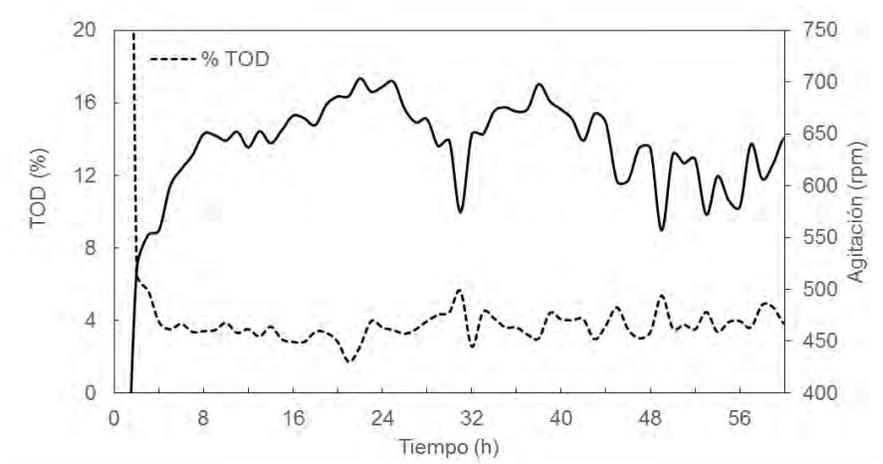


Figura 9.4 Perfiles de Oxígeno disuelto y agitación en cultivos lote-alimentado de *A. vinelandii* OPNA, con medio melaza 5 %- E.L.

La tensión de oxígeno disuelto se mantuvo por arriba de 6 % hasta la tercera hora de cultivo, tiempo a partir del cual, el equipo ejerció la acción de control a través de la agitación, manteniendo la TOD en un valor promedio de $4.9 \% \pm 1.48$ (**Figura 9.4**)

Para mantener la TOD al valor seleccionado, el equipo se programó para manipular la agitación, de acuerdo a los requerimientos de oxígeno, es decir, conforme aumenta el consumo de oxígeno, también la agitación. Lo que resulta en un aumento en el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) y por lo tanto en el oxígeno disuelto disponible en el medio. La agitación máxima alcanzada fue de 749 rpm alrededor de las 20 h, lo que corresponde con el crecimiento exponencial de la etapa lote. Posteriormente, la agitación varió entre 500 rpm y el valor máximo registrado (**Figura 9.4**).

Cabe destacar, que el hecho de que el oxígeno disuelto pueda ser controlado sólo con agitación, es una ventaja operacional, debido a que no es necesario recurrir a otras estrategias, como el enriquecimiento del medio con oxígeno puro.

En el caso específico de *A. vinelandii*, la cepa silvestre es una bacteria con una de las tasas respiratorias más altas reportadas ($56 \text{ mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$)⁽⁵⁴⁾; sin embargo, el resultado de las modificaciones en su fondo genético, trajo como consecuencia una disminución de la tasa respiratoria de hasta un 30 %, lo que indica que las cepas mutantes generadas a partir de la cepa OP, pueden crecer adecuadamente a niveles más bajos de oxígeno. De acuerdo a la evidencia recabada, la disminución de la tasa de consumo de oxígeno, está relacionada con una alteración en la citocromo oxidasa *bd* que es una de las principales rutas de transferencia de electrones hacia el oxígeno en el proceso de respiración⁽⁵⁵⁾. Las modificaciones anteriores permiten satisfacer las necesidades de oxígeno del cultivo a través de la agitación.

La etapa lote tuvo una duración de 20 h, tiempo en el que se realizó el primer pulso de nutrientes. Para establecer los tiempos de alimentación, se monitoreó la concentración de azúcares reductores, seleccionando 20, 33 y 44 h, siendo los tiempos en que la fuente de carbono estaba próxima a agotarse.

En la **Figura 9.5** se muestra la cinética de crecimiento con base en proteína, biomasa, consumo de azúcares, así como la producción y acumulación de PHB.

En la etapa lote se alcanzó una velocidad específica de crecimiento de 0.14 h^{-1} , valor que resulta 1.5 veces mayor que la μ obtenida en cultivos en matraz (0.09 h^{-1}). Lo anterior, se debe al suministro de oxígeno, puesto que en matraces, el cultivo se mantiene en condiciones de limitación de oxígeno debido a la baja transferencia de oxígeno ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)⁽⁵⁶⁾; mientras que en el biorreactor, los cultivos no se encuentran limitados por oxígeno.

En cuanto a la acumulación de PHB, los valores se encuentran por debajo del 50 %, debido a que en esta etapa el microorganismo favorece el crecimiento, más que la producción del polímero. Este comportamiento se explica debido a que la TOD se encuentra a un valor de $6.9 \% \pm 15$, puesto que es la etapa en que comienza a consumir el oxígeno disponible.

El comportamiento que sigue la acumulación del polímero, resulta congruente con los datos reportados por García⁽²⁴⁾, quien encontró que cuando se crece *A. vinelandii* OPNA a valores de TOD mayores a 4 %, se favorece la producción de proteína y biomasa, con una baja acumulación de polímero.

Tabla 9.5 Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos lote alimentados de *A. vinelandii* OPNA, en medio melaza 5%- E.L.

Parámetro	Etapa lote	1er pulso	2do pulso	3er pulso
μ (h ⁻¹)	0.140	0.050	0.020	0.008
qs (gs/Lh)	0.93	1.35	1.56	0.96
Prod. Vol. (g/Lh)	0.120	0.290	0.110	-
Y x/s (gx/gs)	0.091	0.037	0.046	0.046
Y p/s (gp/gs)	0.151	0.194	0.060	-

Una vez que se realizó el primer pulso, se produce una disminución drástica en la velocidad de crecimiento, que a su vez se refleja en el rendimiento con base en proteína. Paralelamente, hay un aumento en el consumo volumétrico de azúcares (

Tabla 9.5), que se explica a través de la síntesis de PHB, pues hay un aumento en el rendimiento con base a producto y en la producción volumétrica, lo que indica que el microorganismo está movilizand o la fuente carbono hacia la síntesis de polímero.

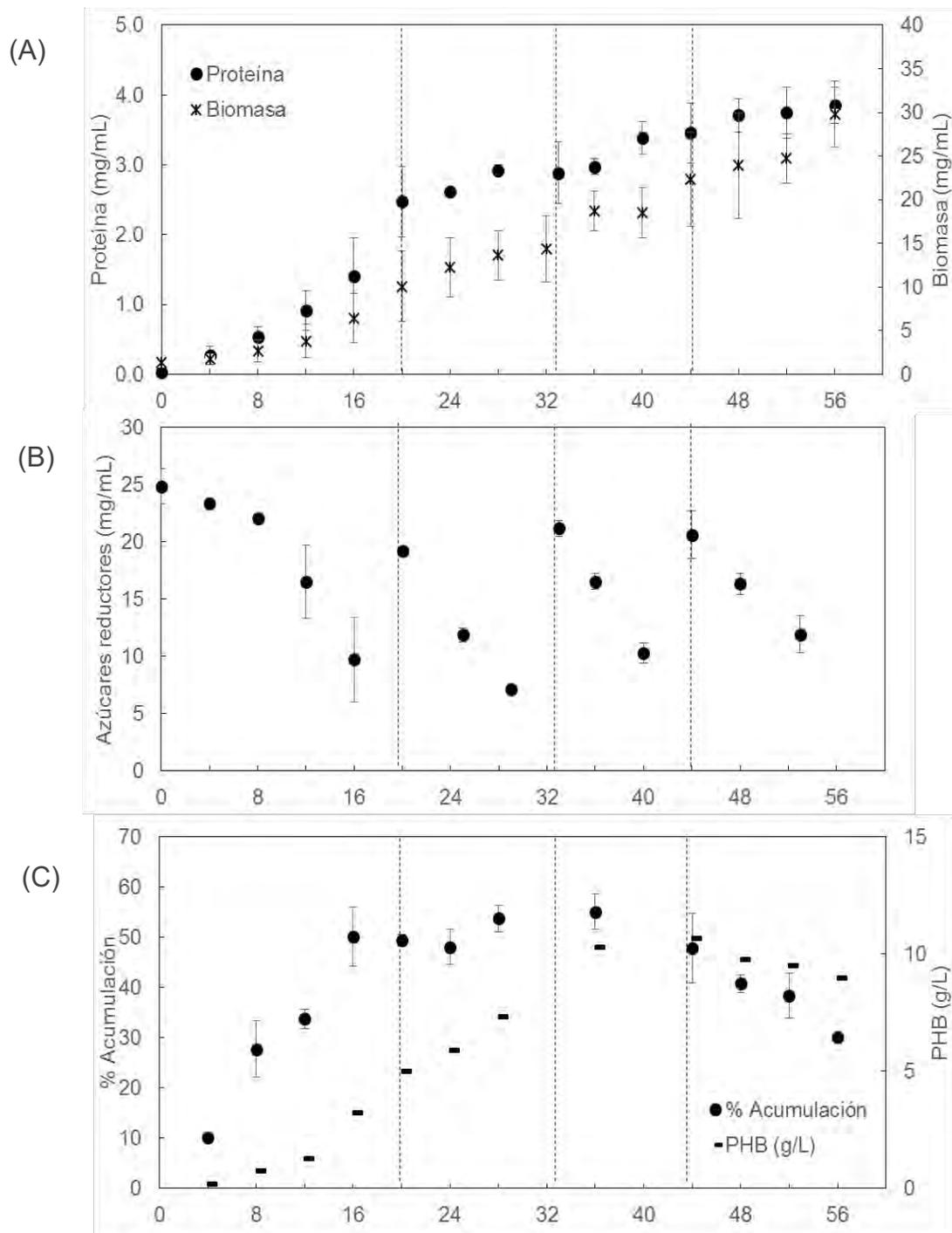


Figura 9.5 Cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa (A), consumo de azúcares reductores (B), producción y acumulación de PHB (C), en cultivos lote alimentado de *A. vinelandii* OPNA con melaza 5%- E.L. en fermentador de 3 L

Al adicionar el segundo y tercer pulso de alimentación, disminuye nuevamente el crecimiento (de 0.05 hasta 0.008 h⁻¹) (

Tabla 9.5), además de que en esta ocasión hay una caída en la producción (10.6 a 8.9 g/L PHB) y acumulación de PHB (55 a 30 %) (**Figura 9.5 (C)**).

En el tercer pulso de alimentación, se observa una disminución en la producción del polímero. Es posible que éste sea consumido por la bacteria, ya que es bien sabido que el polímero funge como reserva de carbono. Sin embargo, no se explicaría por qué la bacteria mostrase preferencia por consumir el polímero a los azúcares disponibles en el medio. Otra posible explicación al descenso de PHB, se relaciona con el hecho de que la bacteria puede lisarse⁽²⁴⁾ por dos razones: (1) se ha observado que los porcentajes altos de acumulación favorecen la ruptura de las células o bien (2) debido a un efecto osmótico, producido por los componentes de la melaza (azúcares, sales, etc), que pudiesen afectar la regulación del volumen celular y culminar en la lisis⁽⁵⁷⁾. Como resultado de la lisis, el polímero se liberaría al medio, de modo que al realizar el análisis, la fracción liberada no se estaría cuantificando.

En el proceso desarrollado previamente con Sacarosa-EL se alcanzan 33.6 g PHB/L⁽¹⁰⁾, que al comparar con la producción obtenida con el medio con melaza al 5 %-EL, se advierte una notable diferencia. Sin embargo, al emplear la melaza se busca abatir costos,

por lo que se realizó un análisis de costos proveniente de sustrato, para determinar si pese a la baja producción, el costo justifica el uso de la fuente de carbono señalada (**Tabla 9.6**).

Tabla 9.6 Análisis preliminar de costos por sustrato de los cultivos lote alimentado con sacarosa y melaza al 5 %

Fuente de Carbono	Cantidad (kg)	Costo por Kg (USD)	Cantidad E.L.(kg)	Costo por Kg E.L.(USD)	Costo total (USD)
Sacarosa	2.47	0.7	1.23	3.6	6.03
Melaza 5%	16.20	0.1	3.47		14.13

De acuerdo al análisis, no se justifica el uso de melaza, puesto que el costo es de más del doble que al emplear sacarosa y esto se debe a que la producción es muy baja, además de que se requiere una cantidad mayor de extracto de levadura el cual tiene un precio muy alto (3.6 USD/kg), con relación al precio de la sacarosa y la melaza (0.7 y 0.1 USD/Kg, respectivamente). Considerando lo anterior, se decidió realizar cultivos lote- alimentado con medio con melaza al 3% suplementado con extracto de levadura en una relación C/N de 14, sustentado en el hecho de que en los cultivos en matraces, las condiciones de 3 y 5 % no mostraron diferencias significativas.

Al realizar cultivos en esta condición, no se esperaba aumentar la producción, pero si una reducción en el consumo de materias primas y por lo tanto en el gasto proveniente de esa fuente. Los cultivos lote alimentados, se realizaron bajo las mismas condiciones de los cultivos con melaza al 5 %, salvo que en esta ocasión, los pulsos de alimentación se realizaron a las 16, 28 y 44 h, debido a que la solución de alimentación contenía una menor cantidad de azúcares reductores, por lo que se agota con mayor rapidez.

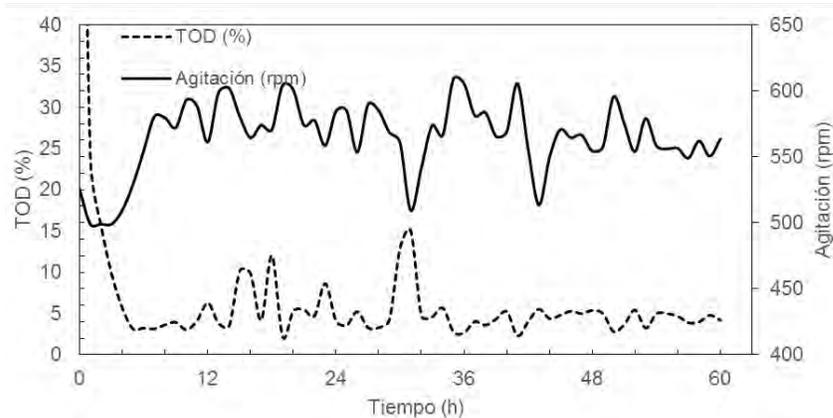


Figura 9.6 Perfiles de oxígeno disuelto y agitación en cultivos lote-alimentado de *A. vinelandii* OPNA, con medio melaza 3 %- E.L.

En estos cultivos, la tensión de oxígeno disuelto se mantuvo en promedio a $4.9 \% \pm 2.5$, después de las 5 h y se alcanzó una agitación máxima de 661 rpm, lo que indica que la agitación requerida para mantener el oxígeno disuelto es menor que en los cultivos con melaza al 5 %.

Al emplear el medio con melaza al 3 % suplementado con extracto de levadura, se observa que la velocidad de crecimiento es similar a la obtenida en los cultivos desarrollados con melaza al 5 % (0.15 vs 0.14 h^{-1}); además de que se repite la caída en μ durante el primer pulso, pero no así en el segundo, donde en esta ocasión se mantiene la misma velocidad de crecimiento (**Tabla 9.7**).

Una explicación de la caída en el crecimiento, puede estar relacionada con un efecto inhibitorio por las sustancias que pudieran estar presentes en la melaza, tal como se había

mencionado para los cultivos en matraz. Sin embargo, en los cultivos lote-alimentado aumenta la posibilidad de observar dicho efecto, ya que se adicionan las soluciones concentradas de melaza. Inmediatamente después de la alimentación, los azúcares disponibles se consumen por el microorganismo, caso contrario a las sustancias no metabolizables (cenizas y/o metales pesados), que a lo largo de la fermentación se acumulan en el medio y que podrían ser potencialmente tóxicas. Siguiendo este razonamiento, el efecto se vería acentuado a una concentración mayor de melaza, tal como ocurre en el medio al 5 %.

Tabla 9.7 Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos lote alimentados de *A. vinelandii* OPNA en medio melaza 3 % suplementado con extracto de levadura.

Parámetro	Etapas lote	1er pulso	2do pulso	3er pulso
μ (h⁻¹)	0.15	0.05	0.05	0.01
qs (gs/Lh)	0.85	1.46	1.16	0.53
Prod. Vol. (g/Lh)	0.23	0.39	0.44	0.18
Y x/s (gx/gs)	0.089	0.059	0.071	0.078
Y P/s (gP/gs)	0.284	0.327	0.287	0.422

En cuanto a los azúcares, la velocidad de consumo es similar en los cultivos con melaza a 3 y 5 %. Sin embargo, el rendimiento con base a proteína y producto son mayores en los cultivos al 3 %. Lo anterior indica que la condición melaza al 5 % no favorece a la bacteria y por lo tanto no hay crecimiento ni producción adecuada, pese a que tiene nutrientes suficientes y no se encuentra limitado por oxígeno.

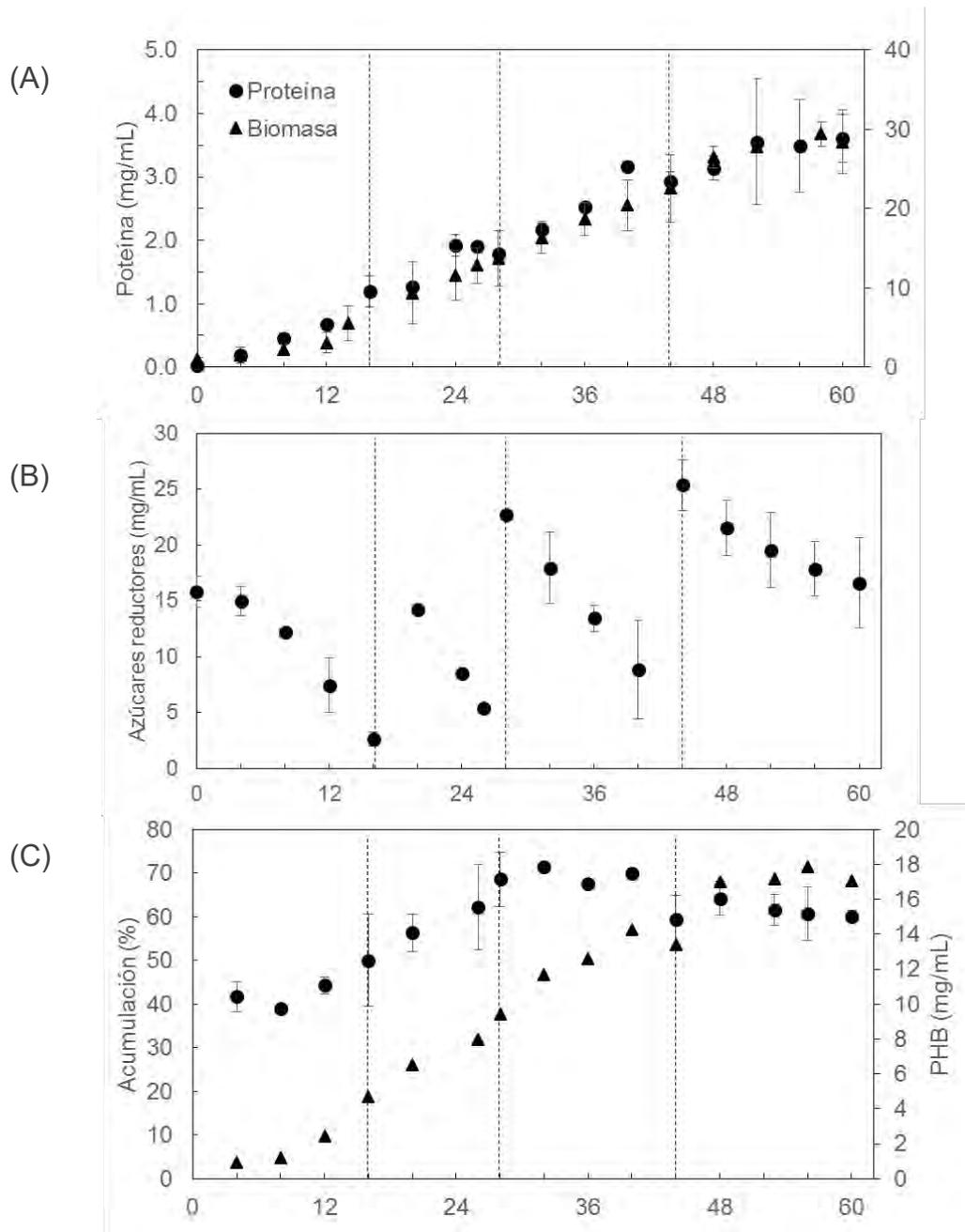


Figura 9.7 Cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa (A), consumo de azúcares reductores (B), producción y acumulación de PHB (C), en cultivos lote alimentado de *A. vinelandii* OPNA con melaza 3%- E.L. en fermentador de 3 L

En cuanto a la producción de biomasa, en ambas condiciones (3 y 5 %) se obtienen cantidades similares (28.4 y 28.3 g/L, respectivamente), a pesar de que al 5% de melaza

hay una disponibilidad mayor de azúcares reductores. Otro aspecto que parece favorecerse en los cultivos con melaza al 3% y que contribuye a que la cantidad de biomasa sea similar en ambas condiciones, es la acumulación del polímero, ya que durante la etapa de alimentación se encuentra en $63.8 \% \pm 4.9$ con base en peso seco; mientras que en los cultivos con melaza al 5 % el valor de acumulación en el primer y segundo pulso es de $51.5 \% \pm 3.0$ y posteriormente desciende hasta valores de 30 %. En los cultivos con melaza al 3 % se alcanza una producción de 17.9 g PHB/L a las 56 h de cultivo.

Una situación que llama la atención y que se había discutido anteriormente en los cultivos en matraz, es que los valores de acumulación nunca llegan a ser tan elevados como en los cultivos con sacarosa ($> 80 \%$), lo que de cierto modo, confirma que al emplear melaza no se favorece la acumulación de polímero, ya que a pesar de que se brindan las condiciones propicias para la producción del producto, no se ve reflejado en los títulos alcanzados.

Al comparar ambos medios en cultivos lote-alimentado, se pudo observar que la condición de melaza a 3 % resulta una mejor opción, puesto que se obtiene una mayor producción de polímero, empleando una cantidad menor de materias primas, además de que el consumo de potencia es menor. Aún con las mejoras, la producción es baja respecto a los cultivos con sacarosa.

Para conocer si efectivamente había una disminución de costos por materia prima, se realizó un análisis de costos de sustratos, el cual se muestra en la **Tabla 9.8**

Tabla 9.8 Análisis de costos por sustrato de cultivos lote alimentados con sacarosa y melaza 3% suplementado con E.L.

Fuente de Carbono	Cantidad (kg)	Costo por Kg (USD)	Cantidad E.L. (kg)	Costo por Kg E.L (USD)	Costo total (USD)
Sacarosa	2.47	0.7	1.23	3.6	6.03
Melaza 3%	7.61	0.1	1.01		4.44

Se observa que hay una disminución del costo de sustrato de 1.6 dólares por kg de PHB producido cuando se emplea la melaza al 3 %, respecto a los cultivos donde se emplea sacarosa. Sin embargo debe considerarse que, a pesar de esta reducción en el costo por sustrato, el proceso de esterilización representaría una dificultad operacional a nivel industrial, ya que se requiere una etapa de centrifugación y filtración de la melaza, tal y como se describió previamente. Es importante señalar que cada operación unitaria adicionada al proceso implica un gasto extra de energía, que no se tendría al emplear un medio basado en sacarosa y extracto de levadura, donde el procedimiento de esterilización es el convencional. Debido a lo anterior, el ahorro que pudiese producirse al emplear melaza como sustrato de bajo costo, se contrarresta con el gasto energético que implica su esterilización.

Por las razones mencionadas anteriormente, se decidió realizar el escalamiento del proceso en cultivos en tanque agitado de 30 L empleando el medio basado en sacarosa y extracto de levadura con una relación C/N de 14.

9.5 Etapa 3. Escalamiento a Biorreactor de 30 L

Debe mencionarse que los cultivos realizados en fermentador de 30 L son un primer acercamiento al escalamiento, puesto que éste, es un proceso de iteración en el que al final se seleccionan las condiciones que favorecen la producción del polímero.

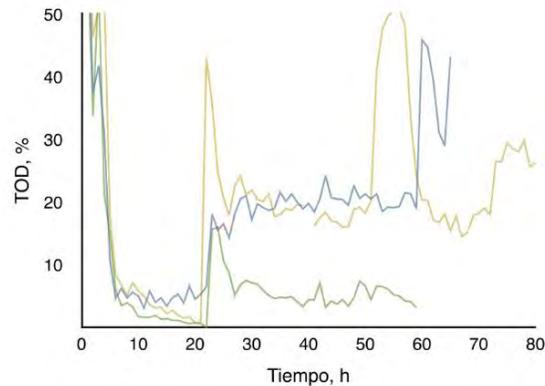


Figura 9.8 Perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) de cultivos alimentados de *A. vinelandii* OPNA realizados por Sanguino, en medio sacarosa y extracto de levadura.

Como se mencionó anteriormente, Sanguino⁽¹⁰⁾ estableció que los cultivos lote-alimentado podían realizarse sin control de oxígeno disuelto. Este autor empleó una agitación constante de 500 rpm (0.15 W/L) en la etapa lote y 700 rpm ($P/V = 0.89$ W/L) en la etapa de alimentación para asegurar la transferencia de oxígeno. Sin embargo, el oxígeno disuelto se elevó a valores cercanos a 20 % en la etapa de alimentación (**Figura 9.8**)⁽¹⁰⁾. A pesar de que operacionalmente pueda ser mejor opción mantener una agitación constante, la tensión de oxígeno disuelto se encuentra en un rango que no favorecería la producción de PHB^(13,23).

El equipo logró controlar el oxígeno disuelto a $4.3 \% \pm 1.2$, a través de agitación, que alcanzó una velocidad máxima de 563 rpm (**Figura 9.9**), lo que equivale a una potencia volumétrica de 3.1 W/L.

Respecto al crecimiento, en la etapa lote se encontró la misma velocidad específica de crecimiento que en los cultivos en matraz (0.09 h^{-1}) y posteriormente una caída en este parámetro.

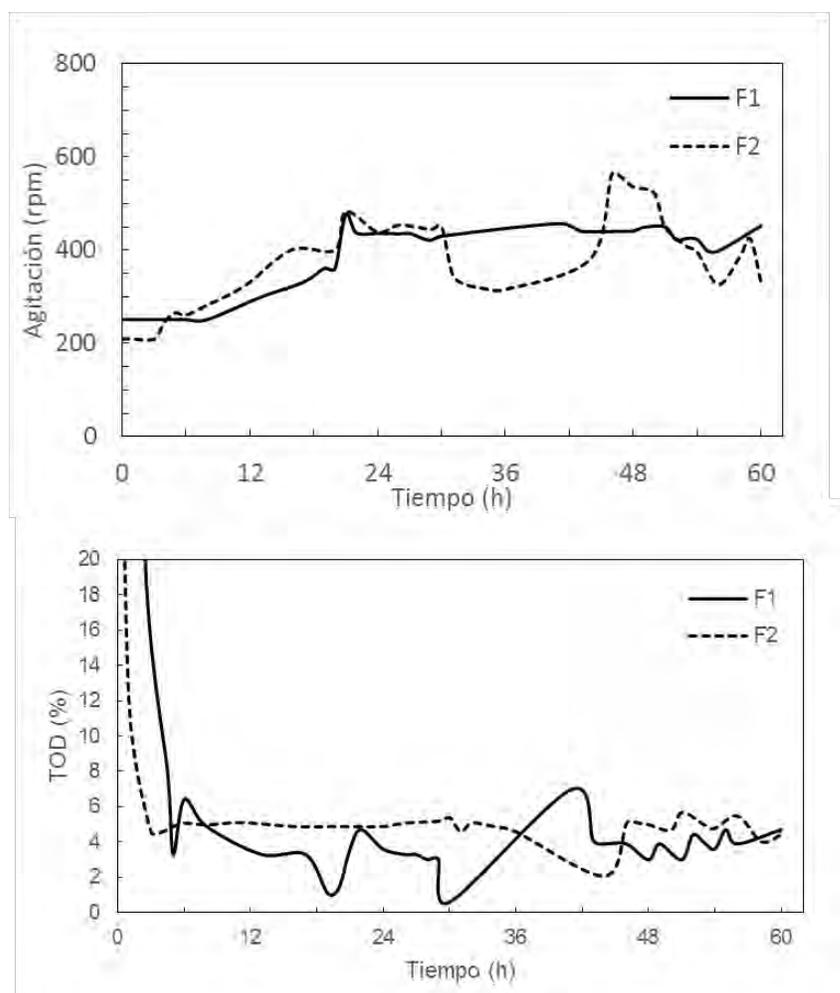


Figura 9.9 Perfiles de oxígeno disuelto y agitación en cultivos lote-alimentado de *A. vinelandii* OPNA, con S-E.L.

Cabe destacar que la μ en la etapa lote de los cultivos con sacarosa, no alcanzan los valores obtenidos en los cultivos con melaza de caña al 3 y 5 % (0.14 y 0.15 h⁻¹, respectivamente), a pesar de que ambos cultivos se desarrollan con la misma relación C/N y sin limitación de oxígeno. Este aumento en la velocidad de crecimiento al emplear melaza, había sido observada anteriormente en la cepa *A. vinelandii* UWD por Page⁽²⁹⁾ y la atribuye a otro tipo de sustancias presentes en la melaza (ácidos orgánicos, sales, compuestos nitrógenados, etc)⁽³⁰⁾ que favorecen el crecimiento respecto a medios con sacarosa. En este caso, es probable que a pesar de que ambos cultivos estén suplementados con extracto de levadura, la melaza aporte compuestos que favorezcan el crecimiento y que no estén presentes en el extracto de levadura.

Tabla 9.9 Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos lote alimentados de *A. vinelandii* OPNA en medio sacarosa - extracto de levadura.

Parámetro	Etapa lote	1er pulso	2do pulso	3er pulso
μ (h ⁻¹)	0.090	0.050	0.060	0.030
qs (gs/gxh)	2.834	0.672	3.771	1.483
Prod. Vol. (g/Lh)	0.39	0.14	0.22	-
Y x/s (gx/gs)	0.032	0.074	0.016	0.020
Y p/s (gp/gs)	0.308	0.062	0.083	-

A las 52 h de cultivo, se alcanzaron 31.58 g/L de biomasa con una acumulación de polímero del 65.9 % \pm 2.9 y por lo tanto una producción de 20.81 g PHB/L (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En las horas posteriores se observa un detrimento en la producción de PHB, lo que probablemente se deba a un efecto de lisis, como se explicó anteriormente. Para

determinar si las células están lisándose, podría efectuarse un análisis de viabilidad, para cuantificar si en las últimas horas del cultivo está disminuyendo el número de células viables.

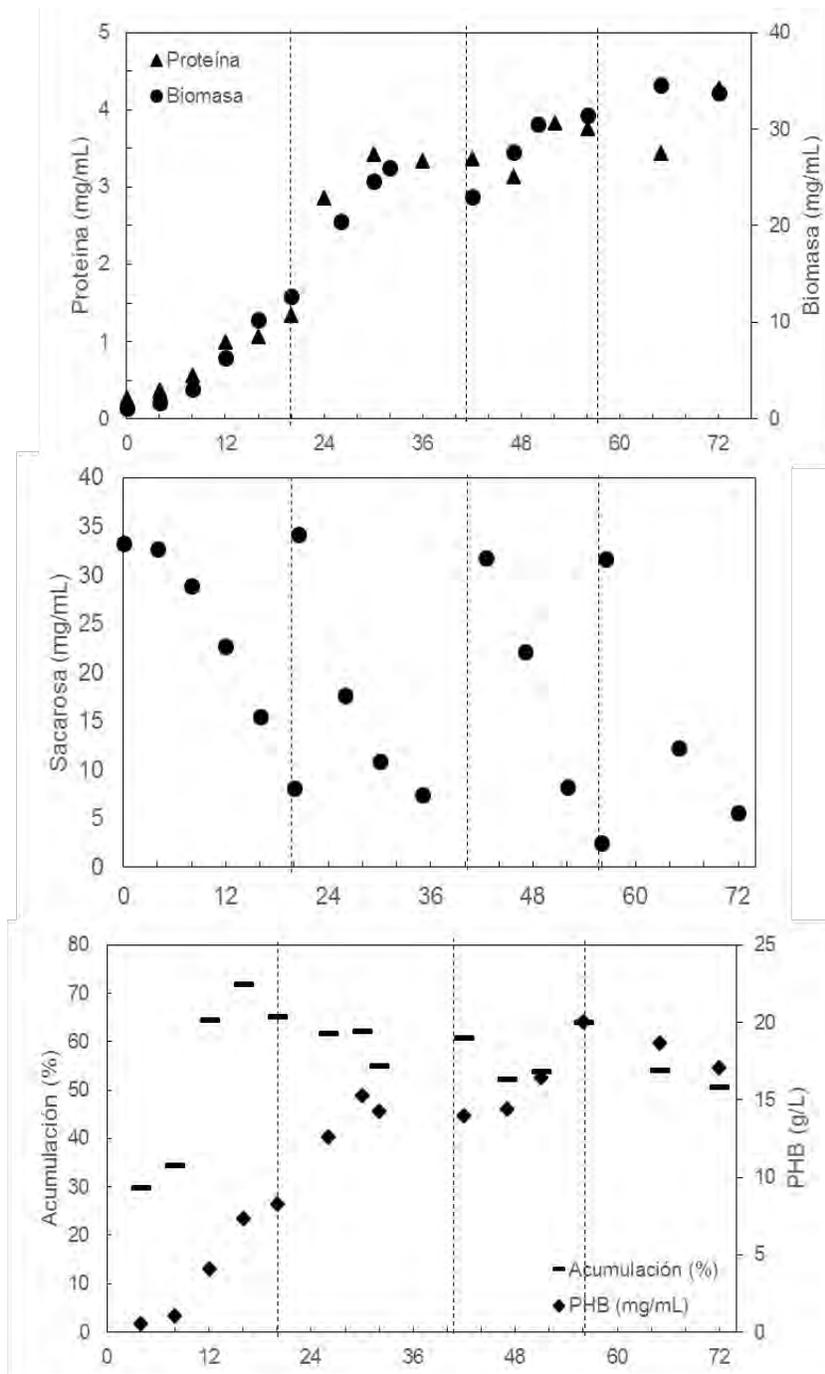


Figura 9.10 Cinética de crecimiento con base en proteína y biomasa (a), consumo de azúcares reductores (b), producción y acumulación de PHB (c), en cultivos lote alimentado de *A. vinelandii* OPNA con S.-E.L.. en fermentador de 30.0 L

Respecto a los valores de acumulación de PHB, se observa que en ninguna etapa del cultivo se alcanzan porcentajes mayores al 70 %, es decir, que las condiciones no favorecen la acumulación del polímero, pues se sabe que se puede alcanzar hasta 90 % con base en peso seco.

La producción obtenida de PHB en 3 L por Sanguino⁽¹⁰⁾ es significativamente mayor (33.6 g/L) que los cultivos realizados en tanque agitado de 30.0 L (20.74 g/L). Lo que por un lado, se debe a que la producción de biomasa es menor (42.0 g/L vs 31.6 g/L PHB), además de que la acumulación es más baja (**Figura 9.11**).

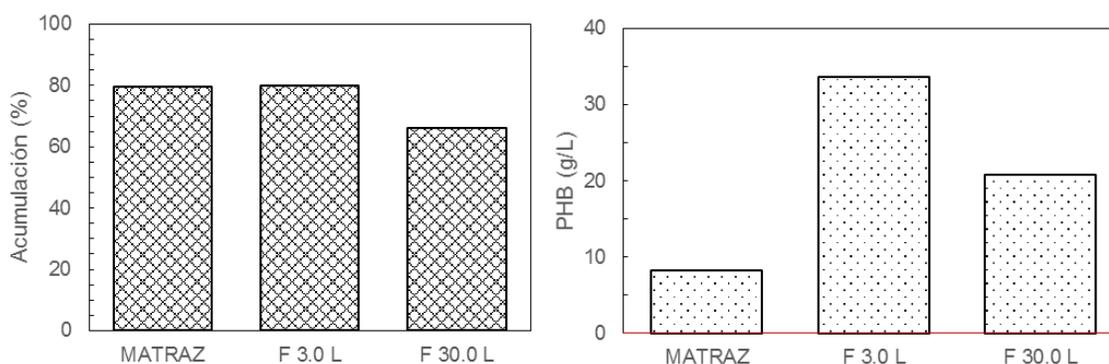


Figura 9.11 Acumulación y producción de PHB en cultivos de *A. vinelandii* OPNA a diferentes escalas

Sin embargo, la diferencia en la producción, no se ve reflejada en la productividad, puesto que se obtienen 0.5 g/Lh en el proceso de Sanguino y 0.4 g/Lh en el fermentador de 30.0 L.

Esto se debe a que la mayor concentración de PHB en los cultivos en 30.0 L se alcanzó en menor tiempo. Lo que implica una ventaja operacional puesto que se está

disminuyendo el gasto de energía, al disminuir el tiempo de fermentación en al menos 12 h.

A pesar de que la producción obtenida en el escalamiento no es la que se esperaba, brinda información importante, que en el futuro permitirá afinar el proceso y brindar las condiciones adecuadas para la producción del polímero.

Una posible estrategia para aumentar la acumulación del polímero sería disminuir la TOD, a valores menores de 4 %, lo que además de aumentar el valor de acumulación, adicionaría una ventaja operacional al utilizar valores de potencia volumétrica menores.

10 CONCLUSIONES

- En cultivos en matraces, el medio con melaza de caña, suplementado con extracto de levadura, permite tener una producción de PHB similar a la alcanzada con el medio sacarosa- extracto de levadura.
- El medio de cultivo con melaza de caña suplementado con extracto de levadura, en cultivos lote-alimentado de *A. vinelandii* permite reducir el gasto proveniente de sustrato por kilogramo de polímero. Sin embargo, resulta inviable utilizarlo debido a que el proceso de esterilización resulta complicado y costoso.
- Al realizar el escalamiento de fermentadores de 3 a 30 L, se obtiene un valor de producción de PHB menor; sin embargo, los valores de productividad son similares en ambos procesos, lo que indica que el escalamiento fue exitoso en términos de este último parámetro.

11 PERSPECTIVAS

- Monitorear el peso molecular del polímero en cultivos lote-alimentado de 30,0 L, para determinar si permanece constante o existen variaciones a lo largo del proceso.
- Evaluar estrategias de alimentación distintas a las que se han estudiado hasta ahora, como la alimentación lineal, buscando aumentar la producción del polímero.

12 REFERENCIAS

1. PlasticsEurope. Plastics-The Facts 2013: An analysis of European latest plastics production, demand and waste data. Oct 2013 [Internet]. 2013;1–40. Disponible en: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2013.aspx?Page=DOCUMENT&FoIID=2>
2. Możejko-Ciesielska J, Kiewisz R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiol Res* [Internet]. 2016;192:271–82. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131630043X>
3. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2010;110(6):621–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
4. Chen GG-Q. Plastics from bacteria: Natural functions and applications. [Internet]. Chen GG-Q, editor. Springer; 2010. 446 p. Disponible en: <http://www.springer.com/la/book/9783642032868>
5. Lee SY. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1996;14(11):431–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167779996100615>
6. Peña C, Castillo T, García A, Millán M, Segura D. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly- (3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2014;7(4):278–93. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12129/abstract>
7. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial

- uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 1990;54(4):450–72.
8. Agnew DE, Pflieger BF. Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. *Chem Eng Sci* [Internet]. 2013;103:58–67. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2012.12.023>
 9. Du C, Sabirova J, Soetaert W, Ki Carol Lin S. Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Curr Chem Biol* [Internet]. 2012;6(1):14–25. Disponible en: <http://benthamscience.com/journal/abstracts.php?journalID=ccb&articleID=96373>
 10. Sanguino-Teyer E. Producción de Poli- β -hidroxibutirato (PHB) en cultivos alimentados utilizando la cepa mutante *Azotobacter vinelandii* OPNA. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 11. Albuquerque MGE, Eiroa M, Torres C, Nunes BR, Reis MAM. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J Biotechnol* [Internet]. 2007;130(4):411–21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602776>
 12. Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MGE, Reis MAM. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2008;81(4):615–28. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1757-y>
 13. Dawes E a. Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer. *Biosci Rep* [Internet]. 1988;8(6):537–47. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3242641>
 14. García A, Segura D, Espín G, Galindo E, Castillo T, Peña C. High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochem Eng J* [Internet].

- 2014;82:117–23. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X1300301X>
15. Reddy CSK, Ghai R, Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates : an overview. *Bioresour Technol* [Internet]. 2003;87:137–46. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765352>
16. Page WJ, Knospt O. Hyperproduction of Poly-3-Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Culture* [Internet]. 1989;55(6):1334–9. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/55/6/1334>
17. Lee SY. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 1996;49(1):1–14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623547>
18. Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Chang HN. Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 1994;44(2):256–61. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/107624167/abstract>
19. Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2007;6:7. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1805506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Espin G. Biología de *Azotobacter vinelandii* [Internet]. Instituto de Biotecnología. 2002. Disponible en: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>
21. Aldor IS, Keasling JD. Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2003;14(5):475–83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580576>

22. Acevedo R. Alquilresorcinoles: compuestos naturales con importancia biológica. Univ Mil Nueva Granada [Internet]. 2014;10(2):1–48. Disponible en: revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/download/332/129
23. Yoneyama F, Yamamoto M, Hashimoto W, Murata K. Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. Bioengineered [Internet]. 2015;6(4):209–17. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2015.1040209>
24. Romero AG. Producción de Polihidroxibutirato en cultivos multietapas y en lote alimentado usando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
25. Castillo T, Heinzle E, Peifer S, Schneider K, Peña M CF. Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. Process Biochem [Internet]. 2013;48(7):995–1003. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511313001670>
26. Rayado DR. Optimización de un medio de cultivo para la producción de Polihidroxibutirato(PHB) utilizando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
27. Page WJ, Cornish A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-3-hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol. 1993;59(12):4236–44.
28. Kim BS, Chang HN. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. Biotechnol Lett [Internet]. 1998;20(2):109–12. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005307903684>

29. Page WJ. Production of polyhydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1989;31(4):329–33. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00257598>
30. Chen G, Page WJ. The effect of substrate on the molecular weight of poly- β -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol Lett* [Internet]. 1994;16(2):155–60. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF01021663>
31. Page WJ. Production of polyhydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1992;38(1):117–21. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00169430>
32. Yu J, Chen LXL. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2006;22(2):547–53. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16599575>
33. Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles* [Internet]. 2da ed. California: Elsevier Science & Technology Books; 1995. Disponible en: <https://cld.pt/dl/.../Bioprocess Engineering Principles - Livro.pdf>
34. Teclu D, Tivchev G, Laing M, Wallis M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. *J Hazard Mater* [Internet]. 2009;161(2–3):1157–65. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541372>
35. Exterior IB de Co. El mercado de la azúcar en la Unión Europea [Internet]. 2009. Disponible en: http://www.santacruztrade.com.bo/images/sectores_exporte/azucar-perfil-mercado.pdf

36. Palomares LA, Ramirez OT. Bioreactor scale-up. En: Flickinger MC, editor. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology [Internet]. John Wiley & Sons; 2009. p. 1–17. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470054581.eib143/full>
37. Votruba J, Sobotka M. Physiological similarity and bioreactor scale-up. Folia Microbiol Off J Inst Microbiol Acad Sci Czech Repub [Internet]. 1992;37(5):331–45. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02815659>
38. Ju LK, Chase GG. Improved scale-up strategies of bioreactors. Bioprocess Eng [Internet]. 1992;8(1–2):49–53. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00369263>
39. Diaz A, Acevedo F. Scale-up strategy for bioreactors with Newtonian and non-Newtonian broths. Bioprocess Eng [Internet]. 1999;21(1):21–3. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s004490050634>
40. Varley J, Birch J. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. Cytotechnology [Internet]. 1999;29:177–205. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003342>
41. Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernandez A, Juarez K, Espín G. Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. J Mol Microbiol Biotechnol [Internet]. 2008;15(4):244–54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878711>
42. Hernandez-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millan LF, et al. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. Microbiology [Internet]. 2012;158(8):1953–63. Disponible en:

http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/158/8/1953_mic059329.pdf?expires=1480476281&id=id&accname=guest&checksum=B3624400053B5B94C31896DE1D4112FD

43. Pazarín KDG. Capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951;193:265–75. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/193/1/265.long>
45. Miller GL, Detns RC, Taken S, Co FS, Smith F, Co C, et al. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination for reducing sugar. *Pioneer Res* [Internet]. 1979;31(3):426–8. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>
46. Tortora Gerard J, Funke Berdell R CCL. *Introducción a la Microbiología* [Internet]. 9na ed. Panamericana EM, editor. Madrid; Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwpIC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
47. Hernández Peñaranda A, Alfaro I, Arrieta R. *Microbiología industrial* [Internet]. Distancia EUE a, editor. Costa Rica; 2013. 269 p. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA3&dq=Microbiología+industrial&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiPh4CLw8_QAhXI44MKHRSBBbIQ6AEIGjAA#v=onepage&q&f=false
48. Saithong P, Nakamura T, Shima J. Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from

- molasses. J Biosci Bioeng [Internet]. 2009;108(3):216–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.022>
49. Skinner KA, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. J Ind Microbiol Biotechnol [Internet]. 2004;31(9):401–8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338420>
50. Wayman M, Tseng MC. Inhibition-threshold substrate concentrations. Biotechnol Bioeng [Internet]. 1976;18(3):383–7. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260180308/abstract>
51. Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. The Microbial world [Internet]. 5th ed. Reverté, editor. New Jersey: Prentice Hall; 1992. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA30&dq=EXTRACTO+DE+LEVADURA+MICROBIOLOG%C3%8DA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjH3qeQ6LjQAhXqzIMKHf42AMkQ6AEIGjAA#v=onepage&q&f=false>
52. Quagliano J, Miyazaki S. Effect of aeration and carbon/nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- β -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 1997;48(5):662–4. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s002530051112>
53. Castillo T, Sanguino J, Segura D, Espín G. Production of polyhydroxybutyrate (P3HB) with high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in fed-batch cultures. 2016;(52):1–32.
54. Flores C. Expresión de genes involucrados en la polimerización de alginato y actividad alginasa en función del oxígeno disuelto y su relación con el peso

molecular del alginato producido por *Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.

55. Díaz-Barrera A, Andler R, Martínez I, Peña C. Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2016;91(4):1063–71. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4684/abstract>
56. Gómez-Pazarín K, Flores C, Castillo T, Büchs J, Galindo E, Peña C. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2015;(April):n/a-n/a. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4747>
57. Latorre R, López-Barneo J, Bezanilla F, Llinas R. *Biofísica y fisiología celular* [Internet]. Sevilla U de, editor. Nueva York: Secretariado de publicaciones; 1996. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=jgVxyb2JIOgC&printsec=frontcover&dq=biofisica+y+fisiologia+celular&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi44979xc_QAhWm2YMKHag9B7IQ6AEIGjAA#v=onepage&q=biofisica+y+fisiologia+celular&f=false