



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO (PHB) EN CULTIVOS
ALIMENTADOS UTILIZANDO LA CEPA MUTANTE *Azotobacter vinelandii*
OPNA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

IQI. Ehus Jonathan Sanguino Teyer

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Carlos F. Peña Malacara
Instituto de Biotecnología, UNAM**

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

**Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Dr. Daniel Segura González
Instituto de Biotecnología, UNAM**

Cuernavaca, Morelos, Febrero de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos F. Peña Malacara, en el grupo del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización del mismo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 443427. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través de los proyectos PAPIIT-UNAM IT-100513.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE CUADROS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Polihidroxicanoatos.	4
2.2. Aplicaciones de PHB.	5
2.3. <i>Azotobacter vinelandii</i> .	6
2.4. Biosíntesis de PHB y su regulación en <i>A. vinelandii</i> .	7
2.5. Cepas de <i>A. vinelandii</i> modificadas genéticamente.	8
2.6. Producción de PHB por <i>A. vinelandii</i> OPNA.	9
2.6.1. Medio de cultivo.	10
2.6.2. Transferencia de oxígeno.	10
2.6.2.1. Efecto de la transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del PHB.	11
2.6.3. Estrategias de fermentación para la producción de PHB.	
3. HIPOTESIS	12
4. OBJETIVOS	15
4.1. General.	15
4.2. Específicos.	15
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
5.1. Esquema general de la estrategia experimental.	16
5.2. Materiales y métodos.	16
5.2.1. Cepa.	17
5.2.2. Preservación de cepas.	17
5.2.3. Medios de cultivo.	17
5.2.4. Cultivos en tanque agitado de 3L.	17
5.3. Desarrollo de cultivos.	17
5.3.1. Pre-inóculo.	18
5.3.2. Preparación del inóculo para los cultivos en matraz.	18
5.3.3. Preparación del inóculo para los cultivos en biorreactor.	18
5.3.4. Análisis estadístico.	19
5.4. Determinaciones analíticas.	19
5.4.1. Cuantificación de biomasa.	19
5.4.2. Cuantificación de proteína total.	20

5.4.3 Cuantificación de sacarosa.	20
5.4.4. Cuantificación de PHB.	22
5.4.5. Determinación de peso molecular de PHB.	22
5.5. Expresiones matemáticas.	23
5.5.1. Ecuaciones generales para los cultivos microbianos.	23
5.5.2. Ecuaciones generales para los cultivos alimentados en tanque agitado.	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	26
6.1. Cultivos en matraces.	26
6.1.1. Medios de cultivo con la relación C/N 14.	26
6.1.2. Medios de cultivo con diferente relación C/N.	28
6.2. Cultivos en tanque agitado.	31
6.2.1. Etapa lote.	31
6.2.2. Etapa de alimentación: pulso 1.	34
6.2.3. Etapa de alimentación: pulsos 2 y 3.	37
6.2.4. Peso molecular de PHB.	38
7. CONCLUSIONES.	40
8. PERSPECTIVAS.	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estructura química de un polihidroxicanoato (Misra <i>et al.</i> 2006).	4
Figura 2.2.	Fotografías de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046 (a), OP (b) y OPNA (c).	6
Figura 2.3.	Mapa metabólico de la síntesis y degradación de PHB en <i>A. vinelandii</i> . Adaptado de (Dawes, 1988).	8
Figura 2.4.	Esquema de la modificación genética en la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> OPNA (Peña, <i>et al.</i> 2014)	9
Figura 2.5.	Diagrama de flujo de la estrategia de cultivo lote alimentado propuesto por García, <i>et al.</i> (2014).	11
Figura 2.6.	Cinética de acumulación (%) y concentración de PHB (g/L) de García, <i>et al.</i> (2014). Las líneas discontinuas marcan las tres etapas de cultivo alimentado (lote, alimentación exponencial y alimentación intermitente).	13
Figura 5.1.	Esquema general de la estrategia experimental.	16
Figura 5.2.	Descripción del tanque agitado Applikon (García, 2013).	18
Figura 5.3.	Curva patrón de albúmina bovina (BSA) para la cuantificación de proteína total con el método de Lowry.	20
Figura 5.4.	Curva patrón de sacarosa para la cuantificación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS.	21
Figura 5.5.	Curva patrón de PHB para la cuantificación de PHB por el método de ácido crotónico.	22
Figura 6.1.	Cinética de crecimiento en proteína total (a), de consumo de sacarosa (b) y de concentración de PHB (c) de los cultivos en matraces con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA en medios de cultivo con C/N 14.	27
Figura 6.2.	Cinética de crecimiento en proteína total (a), de consumo de sacarosa (b) y de concentración de PHB (c) de los cultivos en matraces con la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA en medios de cultivo con diferente C/N.	29
Figura 6.3.	Perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) de tres réplicas de la etapa lote del cultivo alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA en el medio sacarosa - extracto de levadura.	32
Figura 6.4.	Cinética de crecimiento en proteína total (a), consumo de sacarosa (b) y de producción y acumulación de PHB (c) de la etapa lote del cultivo para la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	33
Figura 6.5.	Perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) de la etapa lote y primer pulso del cultivo alimentado de <i>A. vinelandii</i> OPNA en el medio sacarosa - extracto de levadura.	34
Figura 6.6.	Cinética de crecimiento en proteína total (a), consumo de sacarosa (b) y producción y acumulación de PHB (c) de todo el cultivo alimentado para la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA. Las líneas discontinuas indican el momento del pulso de alimentación.	36
Figura 6.7.	Concentraciones de PHB (g/L) netas producidas en cada etapa del cultivo con <i>A. vinelandii</i> OPNA.	38
Figura 6.8.	Valores de peso molecular de PHB en diferentes momentos del cultivo alimentado de la cepa <i>A. vinelandii</i> OPNA.	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1.	Aplicaciones de poli- β -hidroxibutirato en función del peso molecular (Peña, <i>et al.</i> 2014)	5
Cuadro 2.2.	Producciones volumétricas y específicas de PHB en matraces agitados con diferentes cepas de <i>A. vinelandii</i> . NR: No reportado.	10
Cuadro 2.3.	Peso molecular y módulo de Young del PHB sintetizado por la cepa <i>A. vinelandii</i> OPN en matraces a diferentes condiciones de transferencia de oxígeno.	12
Cuadro 5.1.	Composición de los medios de cultivo evaluados.	17
Cuadro 5.2.	Estándares de polietileno de diferente peso molecular para la determinación del peso molecular del PHB.	23
Cuadro 6.1.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con C/N 14.	28
Cuadro 6.2.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con diferente relación carbono/nitrógeno (C/N).	30
Cuadro 6.3.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la etapa lote del cultivo alimentado.	34
Cuadro 6.4.	Parámetros cinéticos y estequiométricos de la etapa de los pulsos 2 y 3 del cultivo alimentado.	37

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo diseñar una estrategia de cultivo para producir poli- β -hidroxibutirato (PHB) utilizando la cepa mutante *Azotobacter vinelandii* OPNA. Este polímero tiene ventajas competitivas por su biodegradabilidad y biocompatibilidad y puede llegar a tener un alto peso molecular. La cepa OPNA es sobre productora de PHB debido a modificaciones en los sistemas de regulación negativa en la vía de síntesis de PHB y tiene la capacidad de crecer en diferentes sustratos de carbono y nitrógeno. En una primera etapa, se definió un medio de cultivo que favoreciera el crecimiento y la producción de PHB. El medio utilizado en este trabajo se basó en sacarosa y extracto de levadura con una relación carbono/nitrógeno (C/N) 14, con el cual se obtuvo mayor cantidad de PHB respecto a otros medios que contienen peptona como fuente nitrogenada. En particular, se ha encontrado que la peptona disminuye el crecimiento por lo que se propuso un medio de cultivo libre de ella. Posteriormente, se desarrolló una estrategia de cultivo con alimentación intermitente basado en el consumo de sacarosa y sin control de oxígeno disuelto ya que se sabe que la tasa de consumo de oxígeno de la cepa OPNA es menor que la parental. A partir de esta estrategia se logró producir alta densidad celular obteniendo hasta 80 % de acumulación de PHB por célula. Se logró alcanzar una concentración volumétrica de 32 g/L de PHB y una productividad de 0.69 g/Lh, los cuales representan casi 20 y 40 % más que lo obtenido con las estrategias similares, respectivamente. El mejoramiento de estos procesos basado en las técnicas de la biotecnología es una alternativa para obtener productos de alto valor agregado capaces de competir con aquellos derivados del petróleo.

INTRODUCCION

Hoy en día, uno de los problemas que enfrenta el hombre es la contaminación por residuos sólidos a costa del confort en la vida cotidiana. La acumulación de estos residuos, particularmente los de material plástico, hace necesario invertir en sistemas complicados de recolección y confinamiento de desechos (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004). Aunado a lo anterior, estos materiales provienen directamente de los productos derivados del petróleo, lo cual conlleva otros tipos de contaminación, además de la advertencia de la extinción de estos recursos naturales.

Dos de los plásticos más utilizados son el polietileno y el polipropileno, cuyas características físicas los hacen adecuados para múltiples aplicaciones. De algunas décadas a la fecha, la búsqueda de alternativas para la reducción y/o sustitución de estos materiales ha permitido la generación de procesos y productos más amigables con el ambiente, pero económicamente inviables. Para este caso, los microorganismos son una fuente inagotable de recursos que se han utilizado para diversos propósitos tales como: la generación de energía, el control biológico, la producción de aditivos alimenticios y la síntesis de biomateriales, entre otros. Particularmente, los bioplásticos ofrecen la oportunidad de reemplazar a aquellos derivados del petróleo, debido a que poseen propiedades funcionales similares. El más común de estos materiales es el poli- β -hidroxibutirato (PHB), el cual pertenece a la familia de los polihidroxialcanoatos (PHA). El PHB tiene características que lo distinguen de los plásticos derivados del petróleo, como son su biodegradabilidad y su biocompatibilidad. Estas propiedades ofrecen ventajas en el uso del PHB para ciertas aplicaciones en medicina, en el empaquetamiento de alimentos, entre otros (Keshavarz y Roy, 2010). Sin embargo, el costo de producción del PHB aún es alto con respecto a los plásticos sintéticos usados actualmente, lo cual no lo hace competitivo para su comercialización (Sathiyarayanan *et al.*, 2013). En comparación con el polipropileno, por ejemplo, el costo por kilogramo de éste es de USD \$0.70; mientras que, el costo del PHB oscila entre USD \$ 2 - 5 por kilogramo (Chanprateep, S., 2010).

Existen algunas alternativas que se proponen en investigaciones actuales para abordar este problema. Entre ellas, está la modificación genética del microorganismo, el diseño de medios de cultivo, así como estrategias de cultivo celular en sistemas lote alimentado (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004). En el grupo de investigación se trabaja en el diseño de estrategias de fermentación con cepas de *Azotobacter vinelandii* modificadas con la finalidad de mejorar la producción y calidad del PHB. Parte de la estrategia propuesta en este trabajo es la modificación de un medio de cultivo, esto se hizo con el fin de buscar alternativas para disminuir los costos de producción ya que el sustrato contribuye al 40-50 % del precio final del producto. Ade-

más, se midió el peso molecular del polímero como medida de la calidad del producto, puesto que con estas características se puede considerar una posición en el mercado de alto valor agregado. Aún que estamos lejos de los fines anteriores, este trabajo arrojó resultados interesantes que pudieran servir como base para mejorar las alternativas. En este trabajo se buscó diseñar una estrategia de fermentación de alta productividad para la producción de PHB de alto peso molecular con una cepa modificada genéticamente de *A. vinelandii* en cultivos lote alimentados.

ANTECEDENTES

2.1. Polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros termoplásticos con propiedades físico-químicas y funciones similares a los materiales derivados del petróleo sintetizados por una gran variedad de microorganismos (Salehizadeh y Von Loosdrecht, 2004). Además de tener un papel importante en la fisiología celular de las bacterias, son biodegradables y pueden ser producidos a partir de fuentes renovables como azúcares y ácidos grasos (Patel *et al.*, 2009). Estos polímeros se acumulan en la célula como reserva de carbono y energía, cuando una fuente de carbono se encuentra disponible en exceso y si algún nutriente como nitrógeno, fósforo, hierro, magnesio, potasio u oxígeno está limitado (Kessler y Witholt, 2001). Sin embargo, en condiciones limitantes de sustrato, el PHA puede ser degradado por depolimerasas durante el metabolismo celular (Kessler y Witholt, 2001; Patel *et al.*, 2009).

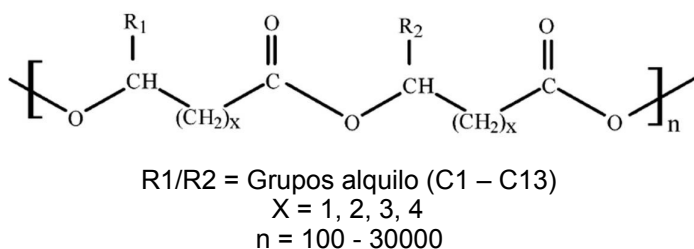


Figura 2.1. Estructura química de un polihidroxicanoato (Misra *et al.* 2006).

Los miembros más comunes de esta familia son el poli-β-hidroxi butirato (PHB), poli-4-hidroxi butirato (P4HB), el poli-β-hidroxi octanoato (PHO), los copolímeros de β-hidroxi butirato/β-hidroxi valerato (PHBV) y β-hidroxi butirato/β-hidroxi hexanoato (PHBHHx). De éstos, el PHB es el que ha recibido más atención, porque es sintetizado de manera natural por más de 90 especies de microorganismos y se ha encontrado que tiene una alta compatibilidad con el cuerpo humano, la cual se confirma por la generación de productos no tóxicos que son absorbibles por vías metabólicas naturales (Ozdil y Aydin, 2014).

El PHB es un poliéster con un grupo metileno (-CH₂-) en su cadena alifática principal y un grupo alquilo (-CH₃) en el carbono β (figura 2.1), que puede alcanzar un peso molecular de hasta 10000 kDa (Peña *et al.* 2014). Su uso se ha explorado en la ingeniería de tejidos para la construcción de nervios y huesos. No obstante, su fragilidad (quebradizo), su alto grado de cristalinidad, su carácter rígido e hidrofóbico y su baja rapidez de degradación (en comparación con

otros biomateriales) limitan su manipulación y función para esas aplicaciones (Ozdil y Aydin, 2014).

2.2. Aplicaciones del PHB

Actualmente, existe un uso excesivo de productos plásticos derivados de la industria petroquímica en el mundo, tal que la producción de éstos a nivel global se elevó a 245 millones de toneladas en el 2008. Se ha sugerido al PHB (y otros biomateriales) por su naturaleza biodegradable como sustituto de estos. Sin embargo, en el caso del PHB, las propiedades no cumplen con los requerimientos mecánicos para soportar las condiciones de fabricación, por lo que, hasta ahora, no resulta adecuado para este tipo de aplicaciones. Con la opción de subsanar esas limitaciones, se está estudiando el mejoramiento de las propiedades mediante la combinación del PHB con materiales plastificantes y/o la síntesis de copolímeros (Ozdil y Aydin, 2014). En la década de los noventa, la compañía Imperial Chemical Industries produjeron el copolímero poli-β-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato [P-(HB-co-HV)] y lo utilizaron para la fabricación de envases de jabón líquido para el cabello (Page y Cornish, 1993).

Cuadro 2.1. Aplicaciones del poli-β-hidroxibutirato en función del peso molecular (Peña *et al.* 2014).

PHB	Aplicaciones	Peso molecular (kDa)
PHB (Bajo peso molecular)	Andamios osteoblásticos.	220
	Andamios de nanofibra para huesos.	144
PHB	Nanopartículas para liberación de ácido retinoico.	350
	Microcápsulas.	300
	Andamios y otolitos.	300
	Andamios 3D.	524
PHB (Ultra alto peso molecular)	Andamios para ingeniería de tejidos.	890
	Andamios para células nerviosas.	1143

La ventaja de la biodegradabilidad y biocompatibilidad de estos productos, particularmente del PHB, les confieren la oportunidad de explotarse en aplicaciones médicas, específicamente en productos cardiovasculares como parches en el pericardio, andamios para la regeneración de tejidos arteriales, injertos vasculares y válvulas cardiovasculares; en la reparación

de tejidos nerviosos, en tratamientos dentales y maxilofaciales, en procedimientos ortopédicos y urológicos y en la aplicación de suturas y apósitos (Keshavarz y Roy, 2010). En el cuadro 2.1 se muestran las aplicaciones de este polímero con diferentes pesos moleculares. Se ha explorado, también, su uso en aplicaciones farmacéuticas, en agricultura, industria de alimentos, así como en la síntesis de productos químicos puros enantioméricos y en la industria de pinturas (Sathiyarayanan *et al.*, 2013).

2.3. *Azotobacter vinelandii*

Una gran diversidad de bacterias tienen la capacidad de sintetizar el PHB y entre ellas, algunas de las más utilizadas son *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y cepas recombinantes de *Escherichia coli* (Keshavarz, y Roy, 2010). Kulpreecha *et al.* (2009) trabajaron con la cepa *B. megaterium* BA-019, una bacteria gram-positiva productora de PHB que puede acumular hasta 60 % de PHB por peso seco celular, utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno de bajo costo. El-Sayed *et al.* (2009) utilizaron las cepas *Ralstonia eutrophus* (conocida como *Cupriavidus necator*) ATCC17697 y *Alcaligenes latus* ATCC29712 para comparar diferentes estrategias de fermentación con la finalidad de mejorar la rentabilidad del proceso de producción de PHB. Estas dos cepas tienen la capacidad de acumular PHB hasta 60 % del peso seco celular bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Por su parte, Chen y Page (1997), han estudiado la producción de PHB con la mutante de *A. vinelandii* UWD (sobre productora de PHB) evaluando diferentes fuentes de carbono. Esta cepa puede sintetizar PHB en la fase de crecimiento sin necesidad de una limitación nutricional y puede acumular hasta 85% del polímero por peso seco celular.

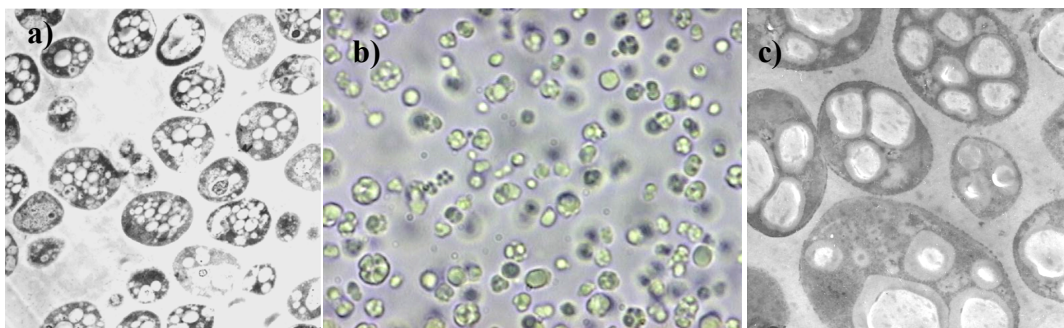


Figura 2.2. Fotografías de *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 (a), OP (b) y OPNA (c).

Entre las fuentes bacterianas para producir biopolímeros, destaca *A. vinelandii* como uno de los microorganismos con potencial para producir PHB y alginato (Setubal *et al.* 2009). *A. vinelandii* es una bacteria Gram-negativa de la familia de *Pseudomonadaceae*, es fijadora de nitrógeno, aerobia estricta y tiene una de las tasas más altas de respiración que se conoce (Dawes, 1988). Se puede encontrar en los suelos y es de importancia en la agricultura. Tiene la ca-

pacidad de formar quistes lo cual la hace resistente a la desecación y otros efectos ambientales. Uno de los componentes más importantes de los quistes es el alginato que participa también en la regulación de la transferencia de oxígeno para el sistema nitrogenasa sensible a este compuesto (Setubal *et al.* 2009). Por su parte, el mayor componente de los quistes es el PHB, el cual se utiliza como fuente de carbono y energía pero se ha observado que no es esencial para el proceso de enquistamiento, al menos en condiciones de laboratorio (Segura *et al.* 2014). Las cepas mutantes de *A. vinelandii* pueden acumular hasta el 85 % de PHB por peso seco celular bajo diferentes condiciones de cultivo (Peña *et al.* 2014). En la figura 2.2 se muestran las fotografías de estas cepas y se observa claramente los gránulos de PHB formados en el interior de las células. Sin embargo, en las cepas modificadas genéticamente de *A. vinelandii* que solo producen PHB, la limitación de oxígeno deja de ser un factor esencial en la acumulación de PHB pero sí en el crecimiento de la bacteria.

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

La síntesis de PHB en las bacterias se promueve en condiciones no balanceadas de nutrientes: la fuente de carbono debe estar en exceso y otro componente debe estar limitado. La fuente de carbono se metaboliza, en el caso de *A. vinelandii*, en la vía de Entner-Doudoroff hasta formar el piruvato y, mediante la piruvato deshidrogenasa, el acetil-CoA, precursor del hidroxibutirato. La vía de síntesis del PHB consiste en tres pasos enzimáticos: dos moléculas de acetil-CoA se condensan para formar acetoacetil-CoA mediante la enzima β -cetotiolasa, posteriormente el acetoacetil-CoA se reduce mediante la acetoacetil-CoA-reductasa para generar el D- β -hidroxibutiril-CoA y éste último es polimerizado a poli- β -hidroxibutirato mediante la PHB sintasa, liberando las moléculas de CoA (Figura 2.3).

En *A. vinelandii*, el oxígeno es el componente limitante que está involucrado en la regulación de la vía de síntesis de PHB. La limitación de oxígeno tiene el efecto de hacer lento el ciclo de ácidos tricarbónicos (TCA) por la falta de aceptores finales de electrones, generando poder reductor y acumulando acetil-CoA. El exceso de acetil-CoA activa la enzima β -cetotiolasa, canalizando este metabolito hacia la síntesis de PHB. En el caso contrario, si el oxígeno se encuentra en exceso, la β -cetotiolasa se inhibe alostéricamente, disminuyendo la síntesis de PHB y dirigiendo el acetil-CoA hacia el TCA (Dawes, 1988).

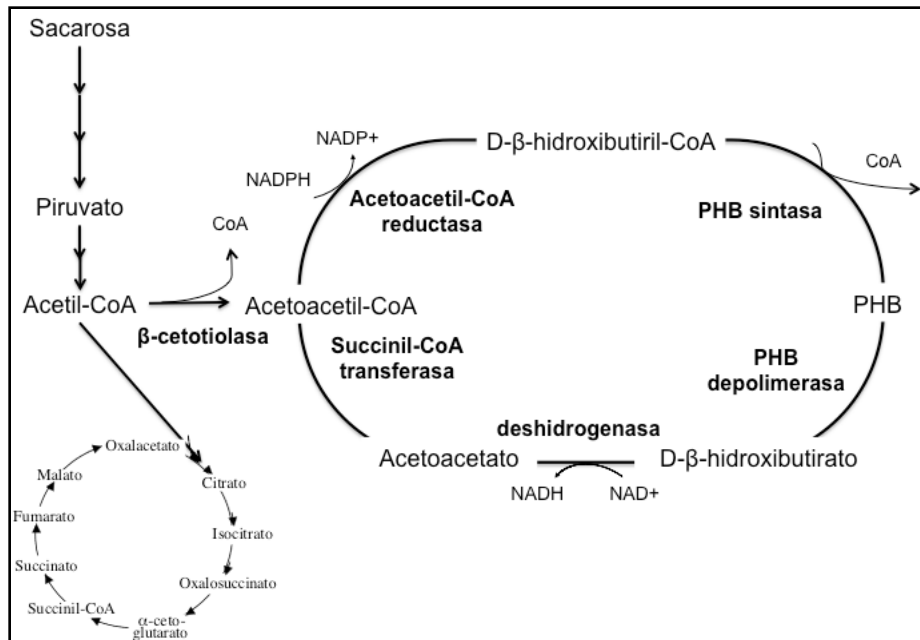


Figura 2.3. Mapa metabólico de la síntesis y degradación de PHB en *Azotobacter vinelandii*. Adaptado de Dawes, (1988).

En estudios con esta bacteria, se ha observado la influencia del oxígeno disuelto en la acumulación de PHB. Castillo *et al.* (2013), encontraron que las condiciones de aireación en matraces agitados influye en la síntesis de PHB en la cepa silvestre ATCC9046 favoreciendo su crecimiento cuando se tuvo alta aireación. Diaz-Barrera *et al.* (2015), por otro lado, observaron que la síntesis de PHB está influenciada por la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en la cepa que no produce alginato, OP, cuando fue cultivada en tanques agitados y variaron la velocidad de agitación. Estos autores encontraron que la acumulación de PHB aumenta cuando la VTO es menor en el cultivo y con ello, confirman que la limitación de oxígeno promueve la acumulación del polímero en respuesta al estrés generado en la bacteria.

2.5. Cepas de *A. vinelandii* modificadas genéticamente.

En el grupo de investigación, se trabaja con cepas de *A. vinelandii* modificadas genéticamente en los sistemas de regulación negativa que controlan la síntesis de PHB (Figura 2.4). En trabajos previos, se ha utilizado la cepa *A. vinelandii* OP la cual tiene una mutación espontánea en el gen *algU* (*algU*), el cual codifica para un factor sigma involucrado en la transcripción de genes de síntesis de alginato y en genes cuyos productos están involucrados en las cadenas respiratorias. En el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM, se ha estudiado la genética de esta cepa y se han diseñado cepas mutantes capaces de acumular mayor cantidad de PHB. Una de ellas es la cepa *A. vinelandii* OPN, la cual tiene inactivado el gen *ptsN*, el cual codifica para la proteína IIA^{Ntr} del sistema fosfotransferasa de-

pendiente del fosfoenolpiruvato asociado al nitrógeno y que es un regulador negativo de la expresión del gene *phbB* (Peña *et al.*, 2013). Otra de las cepas mutantes es *A. vinelandii* OPNA, que además de tener la modificación en el sistema regulador anterior, tiene inactivado el gen *rsmA*, el cual codifica para un regulador negativo a nivel postranscripcional de los genes *phbBAC* y *phbR* (figura 2.4, Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

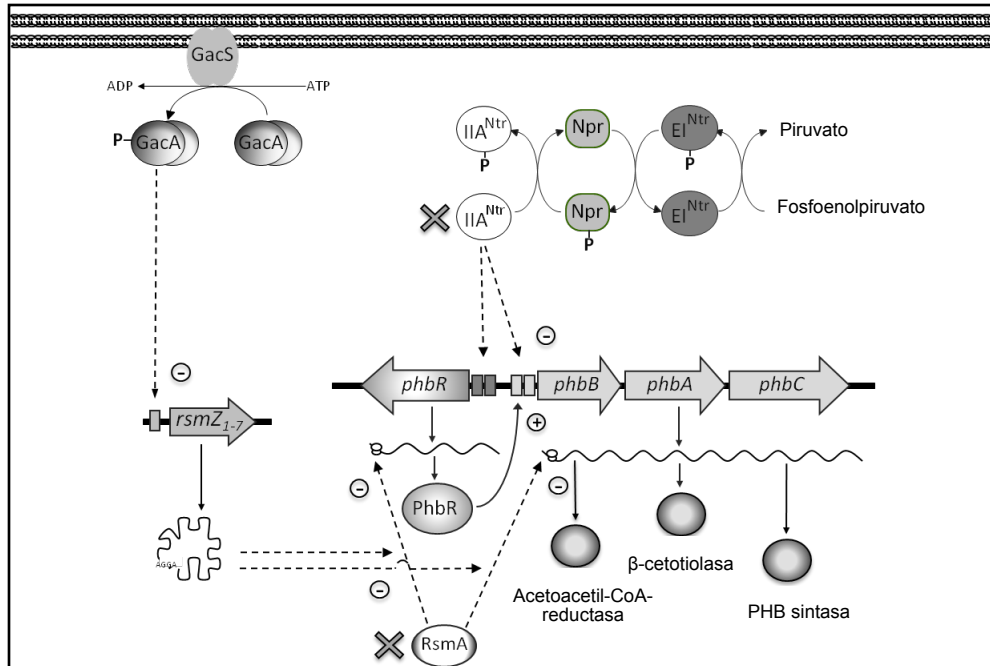


Figura 2.4. Esquema de la modificación genética en la síntesis de PHB en *A. vinelandii* OPNA (Peña *et al.*, 2014). Están representados las dos regulaciones negativas que están suprimidas: *rsmZ*/*rsmA* y IIA^{Ntr} .

En el cuadro 2.2 se comparan las producciones volumétricas de estas cepas. Peña *et al.*, (2013) comprobaron el efecto de la mutación en la cepa OPN respecto a la producción de PHB y obtuvieron una mayor cantidad de polímero respecto a la cepa de la cual se derivó (OP). Por su parte, García (2013), utilizó la cepa OPNA para maximizar la producción volumétrica de PHB y confirmó que la cantidad de PHB producida es mayor con respecto a la cepa parental. Este autor seleccionó un medio de cultivo (PY), condiciones de oxígeno disuelto y estrategias de alimentación en cultivos alimentados que favorecieron el crecimiento celular y la acumulación del polímero. En la siguiente sección se abordará con detalle los resultados de ese trabajo.

2.6. Producción de PHB por *A. vinelandii* OPNA

Existen diversos trabajos en la literatura en los que se han estudiado varias estrategias para mejorar la producción de PHB con distintas cepas como ya se mencionó anteriormente. En esos trabajos, los parámetros más importantes que se toman en cuenta para evaluar la rentabi-

lidad de la estrategia son la acumulación del polímero (productividad específica) y la productividad volumétrica. En los procesos con biorreactores se han alcanzado de 40 a 85 % de acumulación de PHB y productividades entre 0.1 a 1.2 g/L·h con diferentes estrategias y con diferentes microorganismos, tales como *B. megaterium*, *A. latus*, *C. necator* y *A. vinelandii* (Chen y Page, 1997; Kulprecha *et al.* 2009; El-Sayed *et al.* 2009). De éstos, el último particularmente, ha proporcionado rendimientos de PHB superiores a los reportados con otras cepas estudiadas.

La producción de PHB en cultivos de *A. vinelandii* dependen de diversos factores, entre los que destacan principalmente la transferencia de oxígeno y el medio de cultivo. En este grupo de investigación, García *et al.* (2014), trabajaron con la cepa OPNA de *A. vinelandii* en cultivos alimentados, con la estrategia que se muestra en la figura 2.5 y lograron obtener 27 g/L de PHB, controlando la TOD a 4 %, enriqueciendo el aire con oxígeno y usando el medio de cultivo PY (sacarosa, peptona y extracto de levadura). La importancia de estos resultados radica en que no se había alcanzado esta concentración de PHB para las cepas modificadas de *A. vinelandii* diseñadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

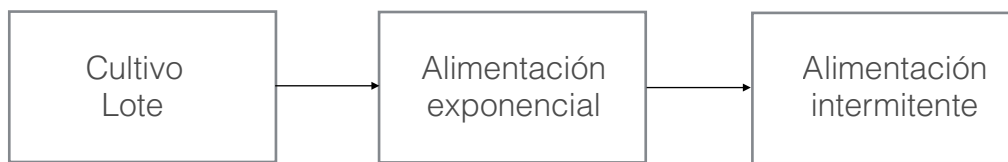


Figura 2.5. Diagrama de flujo de la estrategia de cultivo lote alimentado propuesto por García, *et al.* (2014).

2.6.1. Medio de cultivo

Para las cepas de *A. vinelandii* se han diseñado medios de cultivo para diversos fines. En este caso, el medio PY, que contiene sacarosa, extracto de levadura y peptona, se utiliza para mejorar la acumulación de PHB en la célula y en el trabajo de García *et al.* (2014); se utiliza como medio base para la estrategia de producción de PHB. Sin embargo, estos autores en-

Cuadro 2.2. Producciones volumétricas (concentración) y específicas (cantidad de PHB respecto a cantidad de biomasa seca) de PHB en matraces agitados con diferentes cepas de *Azotobacter vinelandii*. NR: No reportado.

Cepa	Acumulación (%)	Concentración (g/L)	Referencia
ATCC9046	60	2.2	Castillo, <i>et al.</i> (2013)
OP	73	3.5	García, <i>et al.</i> (2014)
OPN	NR	4.1	Peña, <i>et al.</i> (2013)
OPNA	75	4.6	García, <i>et al.</i> (2014)

contraron que el crecimiento celular disminuye en la etapa de alimentación exponencial y se ha sugerido que algún componente en el medio tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria. Page y Cornish (1993), sugieren que la concentración de glicina proporcionada por fuentes nitrogenadas complejas como la peptona y los extractos podría causar pleomorfismo en las cepas de *A. vinelandii*, ocasionando el debilitamiento de la membrana celular y por consiguiente, una disminución en el crecimiento.

En el sistema de cultivo de las tres etapas de García *et al.* (2014), al detectar el problema de la disminución del crecimiento, se propuso para la alimentación intermitente utilizar pulsos de sacarosa y extracto de levadura. El extracto de levadura proporciona menos glicina al medio que la peptona utilizada en la estrategia. Con base en lo anterior, es importante buscar un medio de cultivo libre de peptona y bajo en glicina que promueva el crecimiento celular y la síntesis de PHB.

2.6.2. Transferencia de oxígeno

El oxígeno disuelto es importante tanto en el crecimiento de *Azotobacter* como en la síntesis de PHB, por ello, se debe hacer incapié en la utilidad de la mezcla de gases para controlar la TOD dada la alta tasa de consumo de oxígeno de esta bacteria. Sin embargo, el uso del enriquecimiento con oxígeno suele ser muy caro, puesto que se requieren los componentes puros y su manipulación en el proceso de producción es complicado.

Díaz-Barrera *et al.* (2015), estudiaron el comportamiento de *A. vinelandii* respecto a los requerimientos de oxígeno en la producción de PHB en cultivos lote aireados en tanque agitado en un rango de 300 a 600 rpm y sin control de oxígeno disuelto. Ellos confirman la menor tasa de respiración que tiene la cepa modificada OP, que es tres veces menor con respecto a la de la cepa silvestre ATCC9046, la cual sintetiza alginato y PHB. Por su parte, García *et al.* (2014), indican que la cepa modificada genéticamente *A. vinelandii* OPNA, en los cultivos alimentados con control de oxígeno disuelto a 700 rpm, tiene una velocidad específica de consumo de oxígeno de $16 \text{ mmol/g}_{\text{prot}} \cdot \text{h}$, la cual representa al menos la mitad de la reportada para la misma cepa silvestre productora de alginato y PHB. Lo anterior representa una oportunidad para mejorar el proceso desde un punto de vista económico y operacional, ya que se necesitaría menor cantidad de oxígeno. De este modo, dada la baja tasa de consumo de oxígeno de la cepa OPNA (con respecto a las cepas productoras de alginato y PHB) y con base en un análisis teórico de transferencia de oxígeno, el control de la TOD sobre los valores críticos para la cepa podría llevarse a cabo utilizando aire manipulando la velocidad de agitación.

2.6.2.1 Efecto de la transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del PHB.

Además del efecto de la transferencia de oxígeno sobre la producción de PHB, se ha encontrado que el peso molecular pudiera ser afectado por este factor. Peña *et al.* (2013), realizaron experimentos en matraces, variando el volumen de llenado para modificar la velocidad de transferencia de oxígeno y midieron el peso molecular en todas las condiciones y reportaron que el peso molecular del PHB es dos veces mayor cuando la velocidad de transferencia de oxígeno es baja. La cepa utilizada en ese trabajo fue *A. vinelandii* OPN (derivada de la cepa OP), la cual es sobreproductora de PHB. En cierta medida, el peso molecular es un parámetro que representa la calidad del producto y se puede indicar mediante el módulo de Young. Este es la capacidad de resistencia a esfuerzos mecánicos en el polímero y se muestra en el cuadro 2.3 junto con los pesos moleculares medidos bajo diferentes condiciones.

Cuadro 2.3. Peso molecular y módulo de Young del PHB sintetizado por la cepa *A. vinelandii* OPN en matraces a diferentes condiciones de transferencia de oxígeno (Peña *et al.* 2013).

Condición	Peso molecular (kDa)	Módulo de Young
Baja aireación	3670	560
Alta aireación	2600	180

Es importante señalar que las propiedades funcionales del PHB y por tanto sus aplicaciones específicas dependen del peso molecular del polímero. Con estos experimentos, se establece la posibilidad de controlar el peso molecular del PHB variando las condiciones de transferencia de oxígeno en los cultivos de producción.

2.6.3. Estrategias de fermentación para la producción de PHB.

Previamente se ha documentado que en los sistemas de cultivo lote alimentado se obtiene una alta productividad y alto rendimiento para metabolitos como el PHB, debido a que se pueden mantener niveles óptimos de concentración de sustrato (Grothe y Chisti 2000; Kanjanachumpol *et al.*, 2013) y generar una alta densidad celular (Ienczak *et al.* 2013). Sin embargo, la viabilidad de este proceso depende de los métodos de alimentación, del medio de cultivo y la condición de oxígeno disuelto. Además, es importante resaltar que las propiedades finales del producto (en el caso del PHB es el peso molecular promedio) juegan un papel importante en el proceso puesto que determinan la aplicación a la cual este producto va dirigido. Los regímenes de alimentación de este tipo de cultivos varían para cada caso particular dependiendo del método de control aplicado a la adición de medio de cultivo fresco y van desde el más sencillo como la alimentación intermitente, hasta la alimentación controlada por la variación de pH o TOD.

El-Sayed *et al.* (2009), utilizando las cepas productoras de PHB *R. eutropha* y *L. latus*, probaron tres estrategias diferentes para la producción de este polímero y una de ellas, el cultivo alimentado por pulsos, resultó la más efectiva para este proceso. Estos autores reportan que con el cultivo alimentado intermitente se mejora la productividad en un 100 % con respecto a otros regímenes de alimentación como el exponencial y el continuo. Por su parte, Kanjana-chumpol *et al.* (2013), estudiaron el proceso de producción de PHB con la cepa *B. megaterium* BA-019 en cultivos con alimentación intermitente y se obtuvo una productividad volumétrica de 1.73 g/Lh, el cual es uno de los mayores obtenidos para este producto. La alimentación por pulsos es el régimen más sencillo de manipular y se obtienen resultados de alta densidad celular y alta concentración de PHB.

En el estudio realizado por García *et al.* (2014), se implementó un proceso de tres etapas. En la figura 2.6 se muestra la concentración de PHB alcanzada y la acumulación de PHB durante todo el cultivo alimentado. Como se mencionó en los párrafos anteriores, en esta estrategia se controló la TOD a 4 % enriqueciendo aire con oxígeno y manteniendo la velocidad de agitación a 700 rpm. En la primera etapa de esta estrategia se utilizó el medio PY con sacarosa en un cultivo tipo lote en el cual la bacteria acumula más del 60 % en peso de PHB. En la segunda etapa se realizó la alimentación exponencial del medio PY-sacarosa diseñada para mantener la fase de crecimiento de la cepa y en la última etapa se realizó la adición de pulsos de sacarosa y extracto de levadura. Cabe señalar que en este trabajo no se midió el peso molecular del PHB, por lo que fue interesante hacerlo en el presente trabajo para explorar su contribución al proceso.

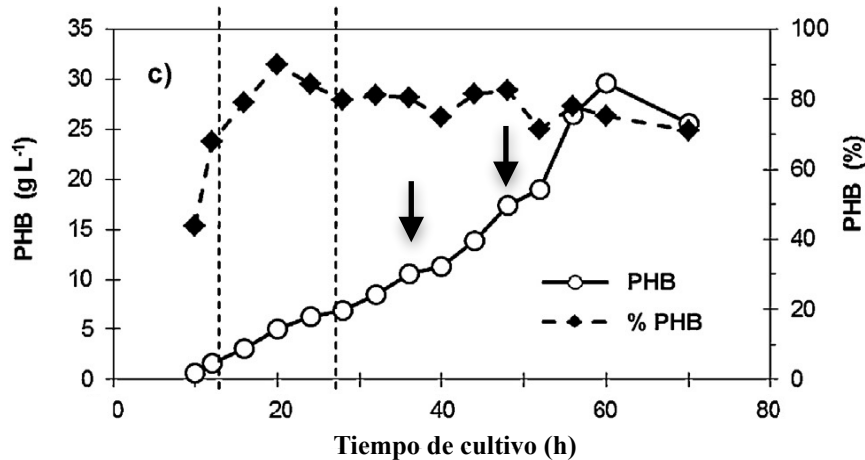


Figura 2.6. Cinética de acumulación (%) y concentración de PHB (g/L) de García *et al.* (2014). Las líneas discontinuas marcan las tres etapas del cultivo alimentado (lote, alimentación exponencial y alimentación intermitente) y las flechas indican el momento del pulso.

La implementación de las tres etapas de cultivo con diferentes regímenes de alimentación hace el proceso complejo de manipular, costoso en tiempo y en materias primas, a

pesar de la concentración alta de PHB que se logró obtener (27 g/L) (García *et al.*, 2014). De este modo, lo que se busca en un proceso de producción es la eficiencia y la simplicidad con los máximos rendimientos posibles y se puede lograr con estrategias de ingeniería de cultivos alimentados para este caso. Con base en el trabajo de García *et al.* (2014), se puede observar en la figura 2.6 que la alimentación intermitente (pulsos) proporcionó una producción neta de PHB (13 g/L) mucho mayor que la alimentación exponencial (5 g/L). Por ello, se propone descartar el modelo de alimentación exponencial y diseñar modelos de alimentación más simples como el régimen intermitente.

Mediante este tipo de sistemas de fermentación se pretende mejorar la producción de PHB, utilizando menos componentes en el medio de cultivo y en el proceso con la cepa modificada *A. vinelandii* OPNA, sobreproductora de PHB. Esta cepa tiene la ventaja de consumir menor cantidad de oxígeno por célula que la cepa parental *A. vinelandii* OP y sintetiza PHB sin necesidad de la limitación nutricional que muchas cepas requieren para este fin. Este trabajo se enfoca en establecer una estrategia de producción que permita el crecimiento celular y la síntesis de PHB suprimiendo la cantidad de oxígeno y la cantidad de componentes en el medio de cultivo.

3

HIPOTESIS

El cultivo en lote alimentado intermitente de la cepa mutante OPNA de *Azotobacter vinelandii* en medio sacarosa - extracto de levadura, bajo condiciones de aireación no enriquecidas con oxígeno, permitirán obtener una producción volumétrica mayor a 27 g/L de PHB de alto peso molecular (> 1000 kDa).

4

OBJETIVOS

4.1. General

Diseñar una estrategia de fermentación para la producción de PHB de alto peso molecular con altos rendimientos en cultivo lote-alimentado intermitente utilizando la cepa mutante *Azotobacter vinelandii* OPNA.

4.2. Específicos

- Seleccionar una relación carbono/nitrógeno de un medio de cultivo libre de peptona que favorezca el crecimiento y la producción de PHB de la cepa mutante *A. vinelandii* OPNA.

- Identificar las mejores condiciones de agitación para incrementar la síntesis de PHB de alto peso molecular, sin detrimento del crecimiento celular, en cultivos aireados con la cepa mutante *A. vinelandii* OPNA.

- Evaluar el régimen de alimentación intermitente en cultivos con la cepa mutante de *A. vinelandii* OPNA bajo condiciones establecidas anteriormente para la producción de PHB de alto peso molecular.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1. Esquema general de la estrategia experimental.

Este proyecto se propuso realizarse en dos etapas. En la figura 5.1 se muestra el esquema general de la estrategia experimental. Se utilizará una cepa modificada genéticamente de *A. vinelandii* (OPNA) capaz de sobreproducir PHB. En la etapa 1 (matraces) se seleccionó el medio de cultivo compuesto de sacarosa y extracto de levadura variando las relaciones C/N de manera que promueva el crecimiento celular y la producción de PHB. En la etapa 2 (tanque agitado) se determinarán las condiciones de agitación de manera que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se mantenga arriba del valor crítico y que no se vea limitado el crecimiento. A su vez, se diseñará un sistema de fermentación con alimentación intermitente que promueva los altos rendimientos de PHB (27 g/L) sin afectar el peso molecular (>1000 kDa).

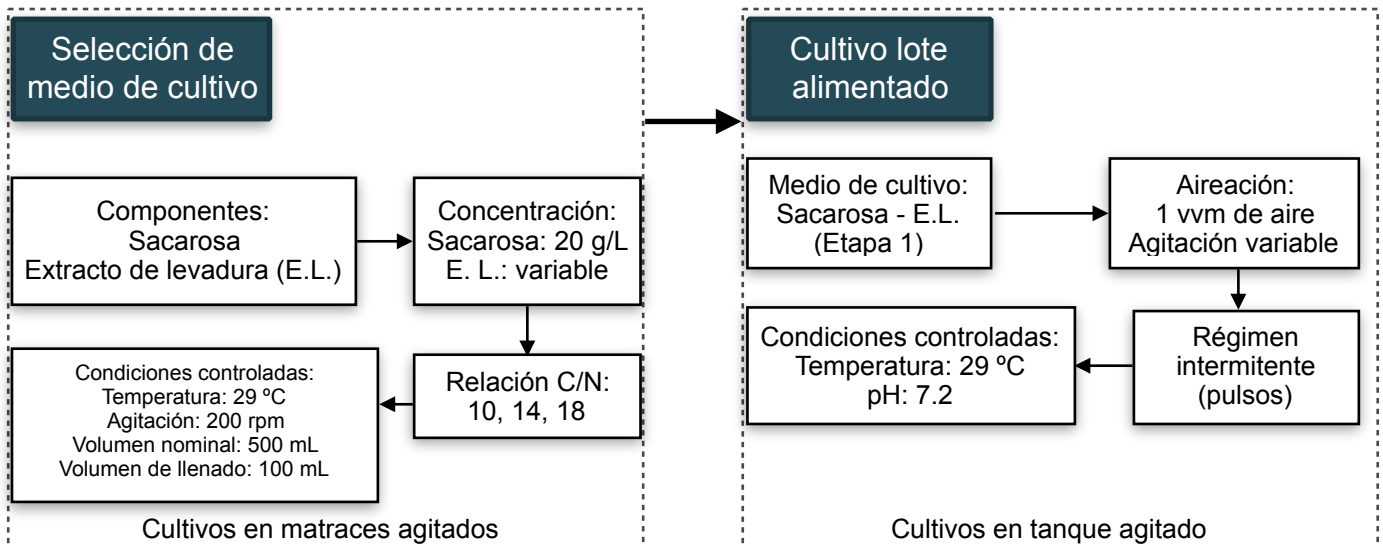


Figura 5.1. Esquema general de la estrategia experimental

5.2. Materiales y métodos.

5.2.1. Cepa.

La cepa empleada en este estudio fue proporcionada por el laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín (IBt-UNAM): *A. vinelandii* OPNA, mutante derivada de la cepa OP que tiene inactivados los sistemas de regulación PTS^{Ntr} y RsmA/RsmZY que actúan negativamente en la síntesis de PHB (Noguez *et al.*, 2006; Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

5.2.2. Preservación de las cepas.

En las dos etapas de este trabajo la cepa OPNA se mantuvo a 4 °C en cajas Petri con medio PY (ver cuadro 5.1) solidificado con agar (18 g/L). La preservación de las cepas se hicieron mediante resiembras mensuales.

5.2.3. Medios de cultivo.

En la primera parte del trabajo se utilizaron cuatro medios de cultivo, tres fueron medios de sacarosa y extracto de levadura con diferente relación C/N así como el medio PY (Segura *et al.*, 2003). La composición de los medios de cultivo se muestra en el cuadro 5.1. El pH de los cuatro medios se ajustó a 7.2.

Cuadro 5.1. Composición de los medios de cultivo evaluados.

C/N (mol/mol)	Sacarosa (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	Peptona (g/L)
10	20	14	-
14	20	10	-
18	20	7	-
PY (Control)	20	3	5

5.2.4. Cultivos en tanque agitado de 3 L.

Los cultivos en tanque agitado se realizaron en un equipo Applikon (Schiedam, Netherlands) de 3.0 L de volumen nominal, con un volumen de trabajo de 2 L, equipado con 2 impulsores tipo turbina Rushton ($D_i/D_T = 0.35$ cm) y un difusor de aire con 7 orificios (Figura 5.2). El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH (Ingold) y se mantuvo constante en 7.2 mediante la adición automática de NaOH 2 N y HCl 2 N. El control de espuma se realizó de forma auto-

mática con la adición de antiespumante silicosa al 10 % (p/v). La TOD se determinó mediante un electrodo polarográfico de oxígeno y la señal fue transmitida a un amplificador y adquirida por una PC Lenovo. El flujo total de aire fue de 2 L/min y se establecieron dos velocidades de agitación: 500 rpm en la parte lote y 700 rpm en la parte de alimentación. Los cultivos se realizaron a 29 °C y pH 7.2.

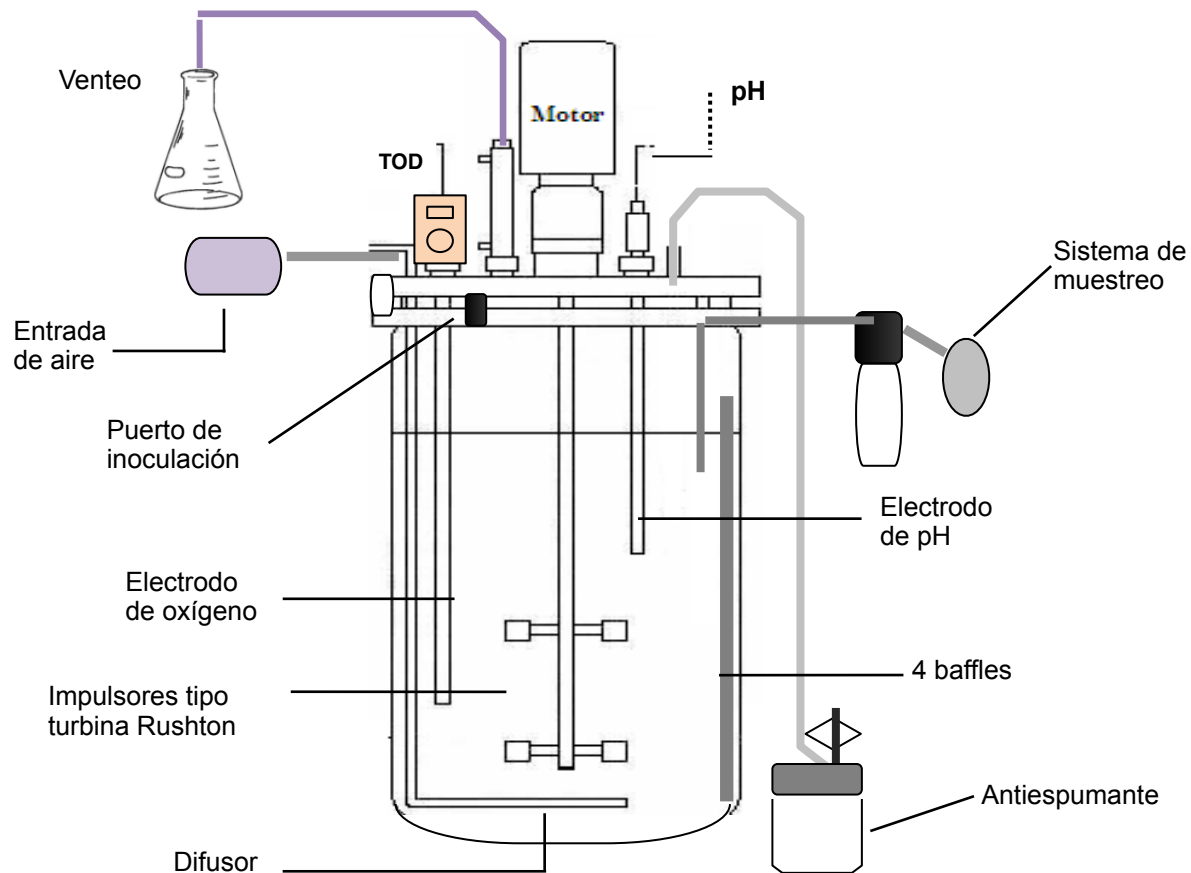


Figura 5.2. Descripción del tanque agitado Applikon (García, 2013).

5.3. Desarrollo de cultivos.

5.3.1. Pre-inóculo

El pre-inóculo se desarrolló en cajas Petri con medio sólido PY, las cajas se sembraron con la cepa *A. vinelandii* OPNA y fueron incubadas por 48 h a 29 °C.

5.3.2. Preparación del inóculo para los cultivos en matraz.

El inóculo para el matraz fue preparado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio PY. Los matraces se inocularon con dos asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-

inóculo) y se incubaron a 29 °C y 200 rpm durante 24 h. Posteriormente, se tomaron 10 mL para inocular los matraces a una relación 1/10.

5.3.3. Preparación del inóculo para los cultivos en biorreactor.

El inóculo para el biorreactor fue preparado en matraces de 500 mL con 100 mL de medio sacarosa - extracto de levadura C/N 14. Los matraces se inocularon con 2 asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo) y se incubaron a 29 °C y 200 rpm durante 18 h. Bajo estas condiciones y mediante una dilución 1/50 de la muestra, se obtuvo una densidad óptica (D.O.) de 0.20 ± 0.02 a 540 nm.

5.3.4. Análisis estadístico.

Los cultivos en matraces y en tanque agitado se llevaron a cabo por triplicado. Para los resultados, el valor promedio se calculó con al menos tres cultivos independientes y la desviación estándar entre las réplicas se presenta como barras de error.

5.4. Determinaciones analíticas.

5.4.1. Cuantificación de biomasa.

- Biomasa por densidad óptica.

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se hizo una dilución 1/50 con agua destilada. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E). Los valores se usaron como manera rápida e inmediata de determinar el crecimiento bacteriano en el medio (García, 2013).

- Biomasa por peso seco.

La determinación de biomasa se llevó a cabo mediante el método gravimétrico de peso seco. Se tomaron 1 mL de caldo de cultivo y se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga (Eppendorf modelo 5804). Se separó el sobrenadante y el paquete celular fue secado en tubos Eppendorf previamente tarados, por 24 h a 70 °C en una estufa (Felisa). Posteriormente, se colocaron en un desecador durante 1.5 horas hasta llegar a una temperatura ambiente. Finalmente, se pesaron en una balanza analítica y se obtuvo (por diferencia de peso) la cantidad de biomasa, expresada en g/L de medio de cultivo (García, 2013).

5.4.2. Cuantificación de proteína total en biomasa.

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

Soluciones: A: Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1 N; B: Tartrato de Na y K 2%; C: CuSO₄ 1 %.

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

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

Se tomó 1 mL de la muestra del caldo de cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm (Eppendorf modelo 5804) durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y en el pellet precipitado se hicieron diluciones dependiendo de la cantidad de muestra. Posteriormente, se adicionó 1 mL de la solución reactiva, se agitó y se dejó reposar 10 minutos. Después, se adicionó 100 µL del reactivo de Folin, se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm (Eppendorf modelo 5804) durante 2 minutos para eliminar restos celulares. Finalmente, se determinó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Adicionalmente, se corrió una curva patrón utilizando albúmina bovina (Sigma), con las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.2 mg/mL (figura. 5.3).

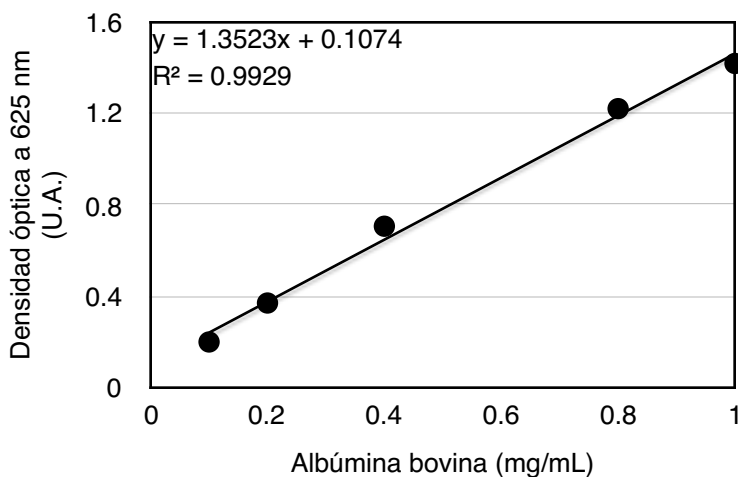


Figura 5.3. Curva patrón de albúmina bovina (BSA) para la cuantificación de proteína total con el método de Lowry.

5.4.3. Cuantificación de sacarosa.

El método de β -fructofuranosidasa-DNS se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando la enzima invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción

del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica medida a 540 nm es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959; Peña *et al.*, 2013).

Solución de DNS: Se preparó pesando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de DNS, se mezclaron en 1 L de agua destilada, con adición lenta del DNS para evitar su precipitación.

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

Solución enzimática: Se preparó mezclando 2.5 mg de la enzima β -fructofuranosidasa (Sigma-Aldrich) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.35 M, pH 4.6).

Se tomó una alícuota de 1 mL del caldo de fermentación y se hizo una dilución 1/20 con agua destilada. 0.9 mL de muestra se colocaron en tubos de ensaye de vidrio y se mezcló con 0.1 mL de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se adicionó 1 mL de la solución de DNS a cada muestra. Los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 5 minutos, e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Los valores se interpolaron en la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL (figura 5.4).

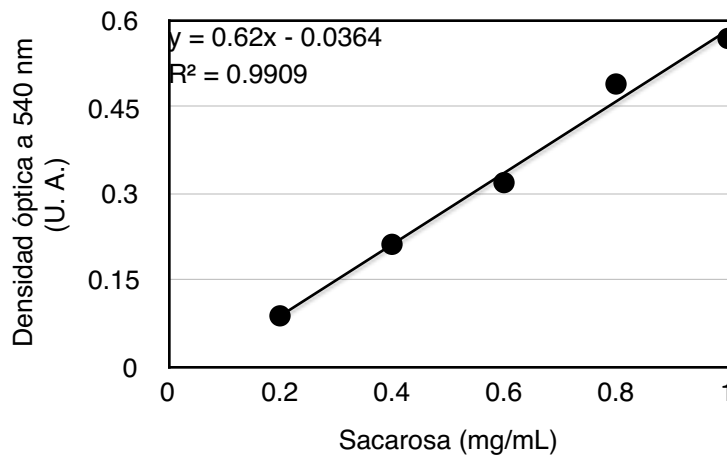


Figura 5.4. Curva patrón de sacarosa para la cuantificación de sacarosa por el método β -fructofuranosidasa-DNS.

5.4.4. Cuantificación de PHB.

La cuantificación de PHB se realizó mediante la conversión a ácido crónico por tratamiento con H_2SO_4 concentrado. Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC 535, Biotek, Neufahrn, Germany) utilizando una columna Aminex HPX-87H (Biorad, Hercules, CA, USA). Se utilizó como fase móvil H_2SO_4 0.014 N a un flujo de 0.65 mL/min, una temperatura de análisis de 50 °C y un tiempo de corrida de . Se utilizó un detector de arreglo de diodos (Waters 2996).

Se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm (Eppendorf modelo 5804) durante 10 minutos, se decantó la muestra, se dejó secar y posteriormente se le adicionó 1 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla se incubó a 90 °C y 700 rpm durante 1 h en un Thermomixer R. Posteriormente, se dejaron las muestras enfriar y se realizaron diluciones con H_2SO_4 dependiendo de la cantidad de muestra. Se inyectaron 20 μL de cada muestra al HPLC. Los valores de las áreas obtenidas a 220 nm se interpolaron en la curva patrón, la cual se elaboró con PHB comercial (Sigma-Aldrich) disuelto en H_2SO_4 concentrado a una concentración de 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 mg/mL (figura 5.5) (García, 2013).

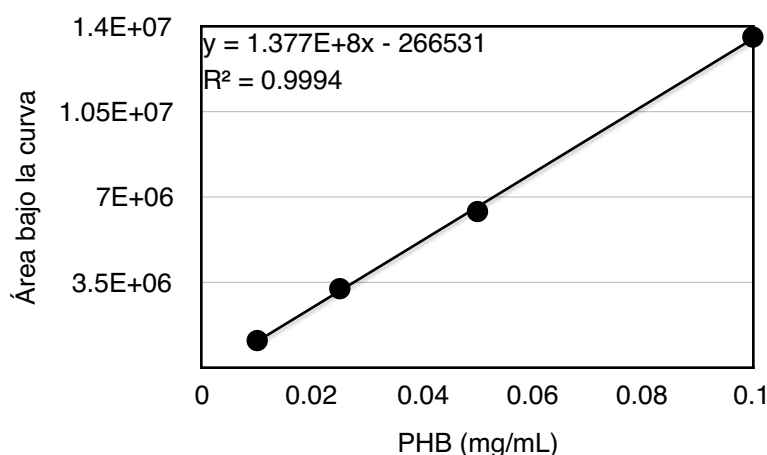


Figura 5.5. Curva patrón de PHB para la cuantificación de PHB por el método de ácido crónico.

5.4.5. Determinación de peso molecular de PHB

La determinación del peso molecular de PHB se llevó a cabo por cromatografía de permeación en gel (GPC) usando dos columnas Styragel HMW (HR5E, Waters) con cloroformo puro como fase móvil y detector de índice de refracción (Empower). Las condiciones de medición fueron: flujo de 0.7 mL/min, temperatura de 30 °C, volumen de inyección de 50 μL y tiempo de corrida de 45 min (Peña *et al.*, 2013).

La extracción de PHB se realizó de la siguiente manera:

1. Del caldo de cultivo se tomó 250-500 μL , dependiendo de la cantidad de biomasa presente (se requiere 4-6 g/L aproximadamente), se centrifugó a 11000 rpm (Eppendorf modelo 5804) por 15 min. Se separó el sobrenadante y se conservó el pellet.
2. El pellet se lavó con agua milliQ y se centrifugó a 11000 rpm (Eppendorf modelo 5804) por 10 min (dos veces). Se separó el sobrenadante y se conservó el pellet.
3. Se agregó acetona al pellet y se mantuvo por 10 min (resuspender). Se centrifugó a 11000 rpm por 10 min. Se separó el sobrenadante y se conservó el pellet.
4. Se agregó cloroformo al pellet y se mantuvo durante toda la noche.
5. Se separó la parte soluble y se le añadió 1 mL de etanol frío. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Se separó el sobrenadante y se secó el pellet (a 60 °C por 2 horas).
6. Al pellet seco se le agregó cloroformo, se resuspendió y la mezcla se filtró para su análisis.

Se utilizaron estándares de polietileno con diferentes pesos moleculares para tener una curva patrón:

Cuadro 5.2. Estándares de polietileno de diferente peso molecular para la determinación del peso molecular del PHB.

Estándar	Peso molecular (Da)	Cantidad pesada (mg)
A	2.94×10^3	0.7
	5.51×10^4	0.8
	6.66×10^5	0.4
	3.99×10^6	0.7
B	6.18×10^3	0.9
	1.33×10^5	0.8
	1.28×10^6	0.7
	5.19×10^6	0.5
C	1.65×10^4	0.8
	2.88×10^5	0.6
	2.35×10^6	0.5

5.5. Expresiones matemáticas.

5.5.1. Ecuaciones generales para los cultivos microbianos.

Velocidad específica de crecimiento.

$$\frac{dX}{dt}$$

Ec. 5.5.1

Al integrar la ecuación y expresarla en función de μ :

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t} \quad \text{Ec. 5.5.2}$$

Considerando μ (h^{-1}) como la pendiente de la recta al graficar $\ln(x)$ versus t , en donde x representa a la biomasa (g/L) y t el tiempo (h).

Velocidad específica de consumo de sacarosa.

$$q_s = - \frac{dS}{dt} \frac{1}{x} \quad \text{Ec. 5.5.3}$$

Considerando dS/dt (g/Lh) como la pendiente de la recta al graficar la concentración de sacarosa (S ; g/L) versus t (t); siendo x (g/L) la biomasa promedio en ese periodo de tiempo.

Rendimiento de biomasa.

$$Y_{x/s} = \frac{dx}{dS} \quad \text{Ec. 5.5.4}$$

Considerando dx/dS como la pendiente de la recta al graficar la concentración de biomasa (g/L) versus concentración de sacarosa (g/L).

5.5.2. Ecuaciones generales para los cultivos alimentados en tanque agitado.

En los cultivos en biorreactor, las velocidades de transferencia de oxígeno y de consumo específico de oxígeno se calcularon tomando las siguientes consideraciones:

- el flujo de aire fue constante,
- la concentración molar del oxígeno al equilibrio en el flujo de entrada.

A partir de estas consideraciones:

Velocidad de transferencia de oxígeno (VTO; mmol/Lh).

$$VTO = k_L a (C_L^* - C_L) \quad \text{Ec. 5.5.5}$$

En donde: $k_L a$ es el coeficiente de transferencia de oxígeno por unidad de área, el cual se calculó empleando el método dinámico dando como resultado un valor 43 h^{-1} medido a 500 rpm y $29 \text{ }^\circ\text{C}$; C_L (mmol/L) es la concentración de oxígeno, presente en el reactor, equivalente a la concentración molar de oxígeno para las condiciones de TOD.

Balances generales de biomasa y sacarosa:

$$\frac{d(VC_X)}{dt} = F_0 C_{X0} - F_1 C_{X1} + r_X V \quad \text{Ec. 5.5.7}$$

$$\frac{d(VS_1)}{dt} = F_0 S_0 - F_1 S_1 + r_S V \quad \text{Ec. 5.5.8}$$

Donde F_0 y F_1 son los flujos volumétricos (L/h) de entrada y salida, C_{X0} y C_{X1} son las concentraciones de biomasa (g/L); y S_0 y S_1 son las concentraciones de sustrato (g/L) de entrada y salida, respectivamente. $d(VC_X)/dt$ es la acumulación (g/h) de biomasa, $d(VS_1)/dt$ es la acumulación de sustrato (g/L) y V el volumen de trabajo (L).

Para los cultivos alimentados, los flujos de salida son cero, el volumen cambia y arreglando los balances quedan:

$$\frac{VdC_X}{dt} + \frac{C_X dV}{dt} = F_0 C_{X0} + r_X V \quad \text{Ec. 5.5.9}$$

$$\frac{VdS_1}{dt} + \frac{S_1 dV}{dt} = F_0 S_0 + r_S V \quad \text{Ec. 5.5.10}$$

Donde r_X y r_S , son las velocidades de crecimiento y de consumo de sustrato, definidas como:

$$r_X = \mu C_X \quad \text{Ec. 5.5.11}$$

$$r_S = \frac{-r_X}{Y_{X/S}} \quad \text{Ec. 5.5.12}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cultivos en matraces

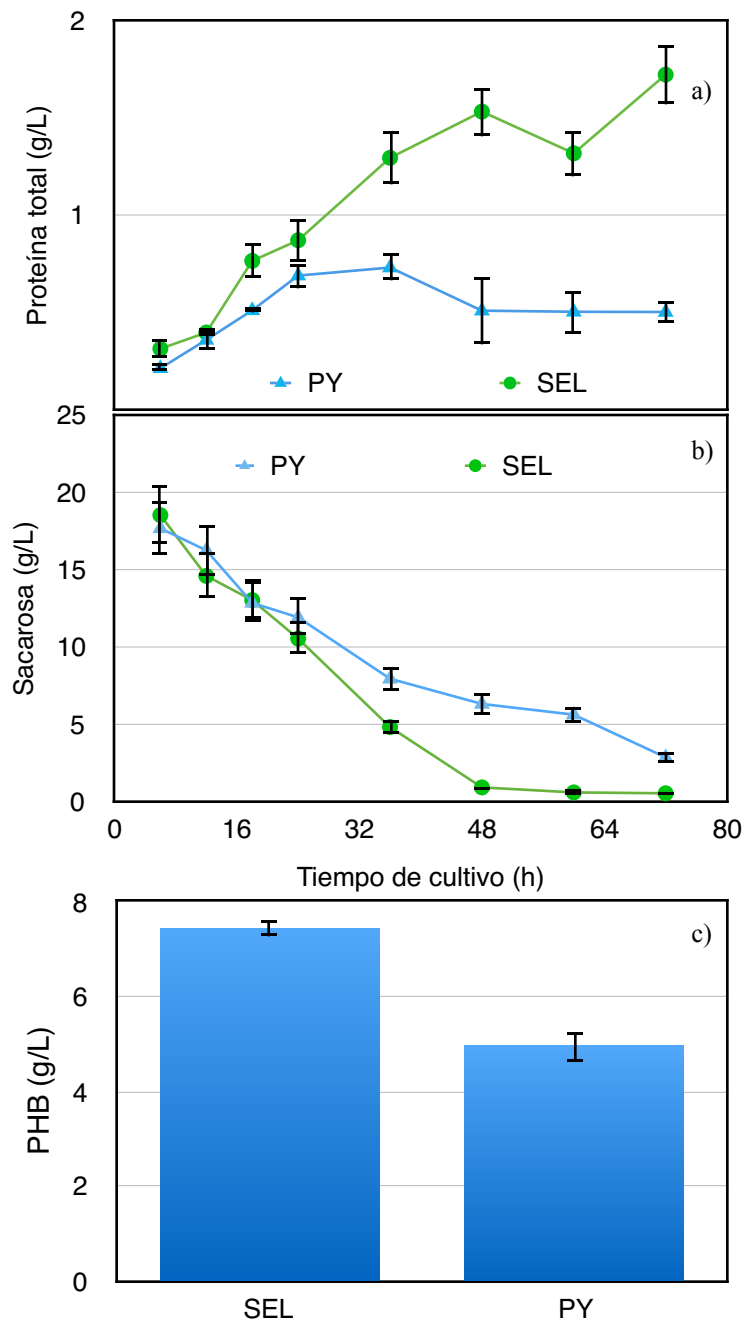
6.1.1. Medios de cultivo con la relación C/N 14.

En esta primera etapa, se evaluaron tres medios de cultivo utilizando sacarosa y extracto de levadura (SEL) y modificando las relaciones carbono-nitrógeno (C/N). En trabajos previos con *A. vinelandii* se usó un medio de cultivo complejo denominado PY, basado en fuentes nitrogenadas enriquecidas (peptona y extracto de levadura) que favorecen la acumulación de PHB (Page y Cornish, 1993; García *et al.* 2014). Sin embargo, se ha encontrado que la peptona afecta negativamente el crecimiento celular, por lo que se decidió comparar un medio de cultivo libre de peptona con la misma relación C/N, únicamente con sacarosa y extracto de levadura. Los resultados de las cinéticas se muestran en la figura 6.1.

Se puede observar en la figura 6.1a que el crecimiento se favorece con el medio sacarosa y extracto de levadura con respecto al medio PY, con velocidades específicas de crecimiento de 0.060 ± 0.002 y $0.041 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (cuadro 6.1). Como consecuencia de lo anterior, se obtuvo una mayor cantidad de proteína máxima (como medida indirecta de crecimiento) en el medio libre de peptona (2.18 vs 0.93 g/L). Este comportamiento fue observado previamente por García (2013), en los cultivos alimentados con peptona utilizando la cepa *A. vinelandii* OPNA y por Page y Cornish (1993), utilizando diferentes cepas de *Azotobacter*. Page y Cornish (1993), sugieren que la concentración de glicina aportada por fuentes nitrogenadas como la peptona y el extracto de levadura, en combinación con otros aminoácidos, podría causar pleomorfismo en las células de *A. vinelandii*, por lo que la membrana celular se debilita y en consecuencia, detiene su crecimiento. En vista de lo anterior, se identificó en las hojas técnicas del fabricante, que la peptona y el extracto de levadura utilizados en este trabajo aportan 15.9 % y 3 % de glicina total, respectivamente; por tanto, la diferencia en el crecimiento en los medios con y sin peptona podría confirmarse por el efecto de la concentración de este aminoácido.

En la figura 6.1b se presenta el consumo de sacarosa para ambos medios evaluados. En el caso del medio sacarosa - extracto de levadura (SEL) se consumió el 100 % de la sacarosa inicial a las 36 horas con un rendimiento de $0.062 \pm 0.010 \text{ g}_{\text{prot}}/\text{g}_{\text{S}}$ (con base en proteína total). En contraparte, el consumo de sacarosa en el medio con peptona fue del 75 % de la cantidad inicial. Las velocidades específicas de consumo de sacarosa fueron de 0.557 ± 0.136 y $0.729 \pm 0.042 \text{ g}_{\text{S}}/\text{g}_{\text{prot}} \text{ h}$, respectivamente para los medios SEL y PY.

Figura 6.1. Cinética de crecimiento en proteína total (a); de consumo de sacarosa (b) y de concentración de PHB a las 48 horas (c), de los cultivos en matraces con la cepa *A. vinelandii* OPNA en medios de cultivo con C/N 14.



Como se observa en la figura 6.1c, la concentración de PHB en el medio SEL fue 50 % mayor al obtenido en el medio PY. Este resultado es consecuencia de la mayor concentración de biomasa máxima alcanzada en los cultivos sin peptona (SEL). Además, la acumulación de PHB fue de 73.00 ± 1.30 y 84.00 ± 4.42 % en peso seco, respectivamente para los medios SEL y PY. En trabajos previos (Chen y Cornish, 1993), se ha reportado que el uso de peptona en el medio de cultivo favorece la acumulación de PHB en cepas de *A. vinelandii*, efecto que coincide con los porcentajes de acumulación obtenidos con la cepa OPNA.

De los resultados anteriores se puede concluir que, la peptona es un componente que puede inhibir el crecimiento de *A. vinelandii* pero que favorece la acumulación de PHB. Además, dado que el PHB es sintetizado de manera intracelular, se requiere de una concentración celular

elevada independientemente del porcentaje de acumulación para obtener una producción volumétrica de PHB mayor. Por lo tanto, el medio de cultivo libre de peptona (SEL) es una alternativa para cumplir los objetivos de este trabajo.

6.1.2. Medios de cultivo con diferente relación C/N.

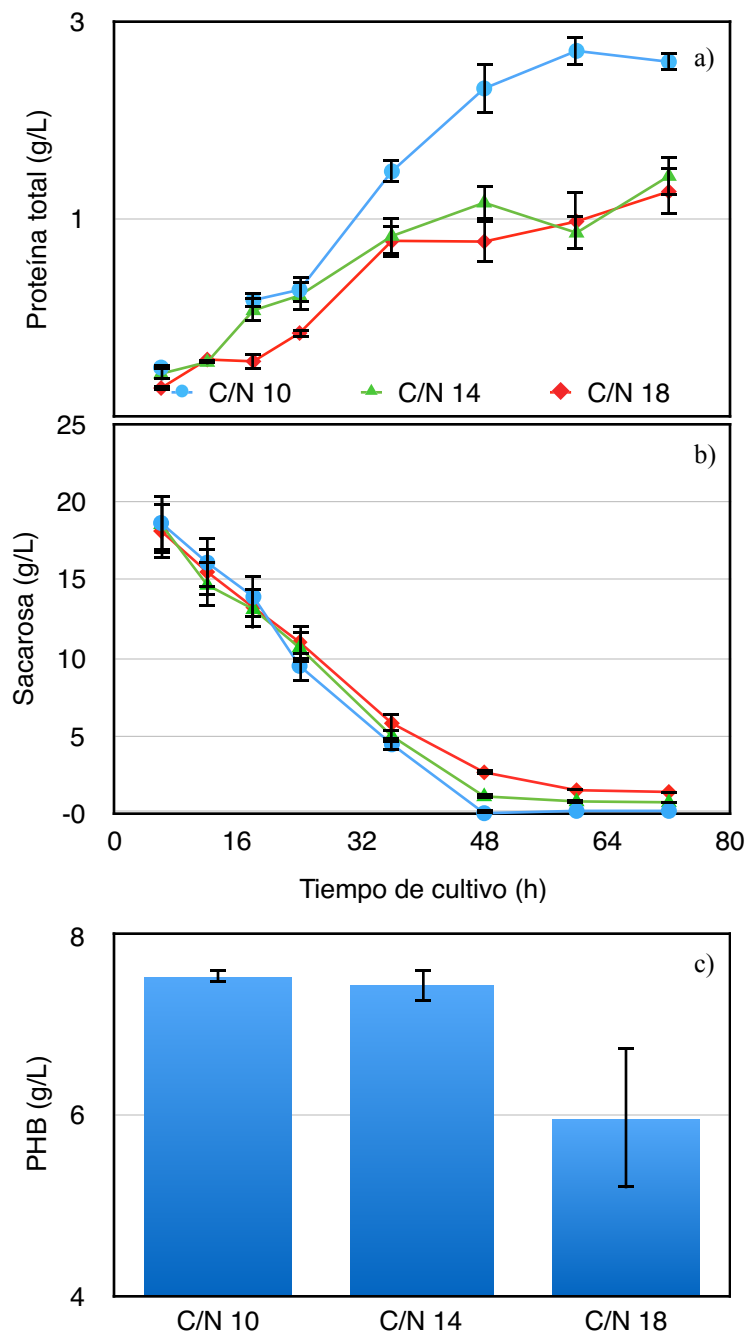
Cuadro 6.1. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con C/N 14. *Cantidades medidas a las 48 horas.

Parámetro	C/N 14	PY
μ (h ⁻¹)	0.060 ± 0.002	0.041 ± 0.004
$Y_{X/S}$ (g _{prot} /g _S)	0.062 ± 0.010	0.046 ± 0.002
q_s (g _S /g _{proth} h)	0.557 ± 0.136	0.729 ± 0.042
X_{max} (g/L)*	10.25 ± 0.07	5.93 ± 0.12
[PHB] (g/L)*	7.44 ± 0.18	4.95 ± 0.30
% PHB	73.00 ± 1.30	84.00 ± 4.42

Posteriormente, se estudió el efecto de la relación C/N del medio SEL sobre el crecimiento y producción de PHB. La figura 6.2 muestra los perfiles de crecimiento y consumo de sacarosa y la concentración de PHB que se obtiene en los medios con relaciones C/N diferentes (10, 14 y 18). Como se observa en la figura 6.2a, al incrementar la concentración de nitrógeno en el medio y por tanto disminuir la relación C/N se ve afectado positivamente el crecimiento, alcanzando una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.050 ± 0.002 h⁻¹ y una concentración máxima de proteína de 3.45 ± 0.07 g/L con la relación C/N 10. Mientras que, cuando se usa una relación C/N 18 la μ fue de 0.060 ± 0.001 h⁻¹ y la concentración máxima de proteína fue 1.81 ± 0.17 g/L.

En el cuadro 6.2 se muestran las concentraciones máximas alcanzadas a las 48 horas de biomasa en peso seco y de PHB y el porcentaje de acumulación. Es importante señalar que la concentración de biomasa que se alcanza con las diferentes relaciones C/N son superiores a las concentraciones alcanzadas en otros trabajos en cultivos en matraz con medio PY. Por ejemplo, en el trabajo de García (2013), se alcanzó entre de 3 y 5 g/L de biomasa en peso seco en cultivos en matraces agitados con diferentes medios de cultivo.

Figura 6.2. Cinética de crecimiento en proteína total (a), de consumo de sacarosa (b) y de concentración de PHB (c), de los cultivos en matraces con la cepa de *A. vinelandii* OPNA en medios de cultivo con diferente C/N.



Hay reportes en la literatura que indican que el extracto de levadura es una de las mejores fuentes de nitrógeno que favorecen la generación de biomasa para *A. vinelandii* (Zapata-Velez y Trujillo-Roldán, 2010) y coincide con el comportamiento explicado en los cultivos con extracto de levadura en este trabajo.

El mayor crecimiento se ve reflejado también en el consumo de sacarosa, la cual se agota a las 48 h de cultivo para todas las relaciones, como puede observarse en la figura 6.2b. Los

Cuadro 6.2. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con diferente relación carbono/nitrógeno (C/N). *Cantidades medidas a las 48 horas.

Parámetro	C/N 10	C/N 14	C/N 18
μ (h ⁻¹)	0.050 ± 0.002	0.060 ± 0.002	0.060 ± 0.001
$Y_{X/S}$ (g _{prot} /g _S)	0.083 ± 0.008	0.062 ± 0.010	0.072 ± 0.005
q_S (g _S /g _{prot} h)	0.402 ± 0.041	0.557 ± 0.136	0.465 ± 0.033
X_{max} (g/L)*	10.90 ± 0.17	10.25 ± 0.07	9.30 ± 1.50
[PHB] (g/L)*	7.54 ± 0.06	7.44 ± 0.18	5.96 ± 1.00
% PHB	69.00 ± 0.70	73.00 ± 1.30	75.00 ± 1.30

rendimientos y las velocidades específicas de consumo de sacarosa fueron estadísticamente iguales entre sí (cuadro 6.2) y mayores a las obtenidas en el medio PY. En la figura 6.2c, se observa que la concentración de PHB es mayor en los cultivos con relaciones C/N 10 y 14. Esto se debe a la mayor concentración de biomasa en peso seco obtenida y lo contrario ocurrió con el medio C/N 18, en el cual se obtuvo una concentración significativamente menor. En este último cultivo no se alcanzó menor cantidad de biomasa en peso seco pero si se obtuvo menor concentración de PHB. De igual forma, el porcentaje de acumulación de PHB en el cultivo con relación C/N 10 fue más bajo y diferente con respecto a los cultivos C/N 14 y 18 (cuadro 6.2). Es interesante notar en estos resultados la relación inversa que existe entre la concentración de extracto de levadura y el porcentaje de acumulación de PHB. Mientras más extracto de levadura (menor C/N) menor es el porcentaje de acumulación de PHB. Esto sugiere que si se favorece el crecimiento celular, se sacrifica la síntesis de PHB y puede ser debido a que la presencia de micronutrientes y macronutrientes en exceso proporcionados por el extracto de levadura.

En síntesis, se puede decir que el extracto de levadura es un componente que favorece el crecimiento y, a pesar de no favorecer la acumulación de PHB, se obtiene una producción volumétrica más alta que la obtenida en trabajos previos en cultivos de *A. vinelandii* en medio PY. Así, el mejor medio es el de la relación C/N 14 porque la biomasa en peso seco es mayor que la C/N 18 y la acumulación de PHB es mayor que la C/N 10. Además, se utiliza menor cantidad de extracto de levadura con respecto al medio con C/N 10.

6.2. Cultivos en tanque agitado.

En esta etapa, se realizaron los cultivos en biorreactores dejando constante la velocidad de agitación en cada etapa para medir la tensión de oxígeno disuelto. Debido a que la TOD crítica determinada para la cepa *A. vinelandii* OPNA por García *et al.* (2014) es de 4 %, se decidió con fundamento en los datos reportados por este autor que la velocidad de agitación se mantendría constante. Con base en lo anterior, se decidió comenzar la etapa lote con una velocidad de agitación de 500 rpm y en la etapa de alimentación aumentarla a 700 rpm debido a que se incrementa la demanda de oxígeno.

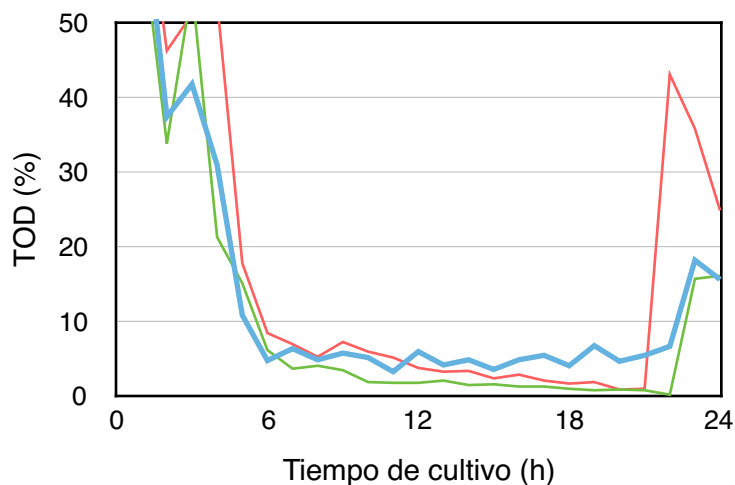
Dada la menor tasa de respiración reportada para la cepa *A. vinelandii* OPNA respecto a las cepas productoras de alginato y PHB fue posible medir la TOD suministrando aire, sin enriquecimiento de oxígeno y manteniendo constante la velocidad de agitación en cada etapa como se mostrará en esta sección. Se presentó un perfil de TOD para cada velocidad de agitación en los cultivos lote-alimentados de manera que se mantenga en el valor crítico o por arriba. Estos experimentos se llevaron a cabo en un tanque agitado (Applikon) de 3 L con un volumen de trabajo de 2 L, a 29 °C, pH 7.2 y flujo de aire de 2 L/min (1 vvm).

El cultivo realizado fue del tipo alimentado con un régimen intermitente de alimentación iniciando con una etapa lote utilizando el medio SEL con la relación C/N 14. El tiempo de alimentación se determinó tomando en consideración el consumo de sacarosa y la fase exponencial de la bacteria. Se llevó a cabo un monitoreo de sacarosa residual y la densidad óptica durante todo el cultivo y se establecieron tres puntos para alimentar el cultivo de manera intermitente. Estos fueron 22, 42 y 58 h. Cabe señalar que la etapa lote de estos cultivos tuvo una duración de 22 h, momento en el cual se hizo el primer pulso de alimentación. En las siguientes secciones se discute cada etapa del cultivo.

6.2.1. Etapa lote.

En la figura 6.3 se muestra el perfil de la TOD durante la etapa lote del cultivo. En ella se observa una caída rápida de la TOD antes de las 8 h de cultivo, indicando una alta actividad respiratoria característica de cepas de *A. vinelandii*. A partir de ese momento, la TOD se estabiliza en un rango de 1 – 3 % a 500 rpm y por tanto, se considera que el cultivo está limitado por oxígeno debido a que la TOD no alcanza la mínima para satisfacer la demanda de oxígeno limitante.

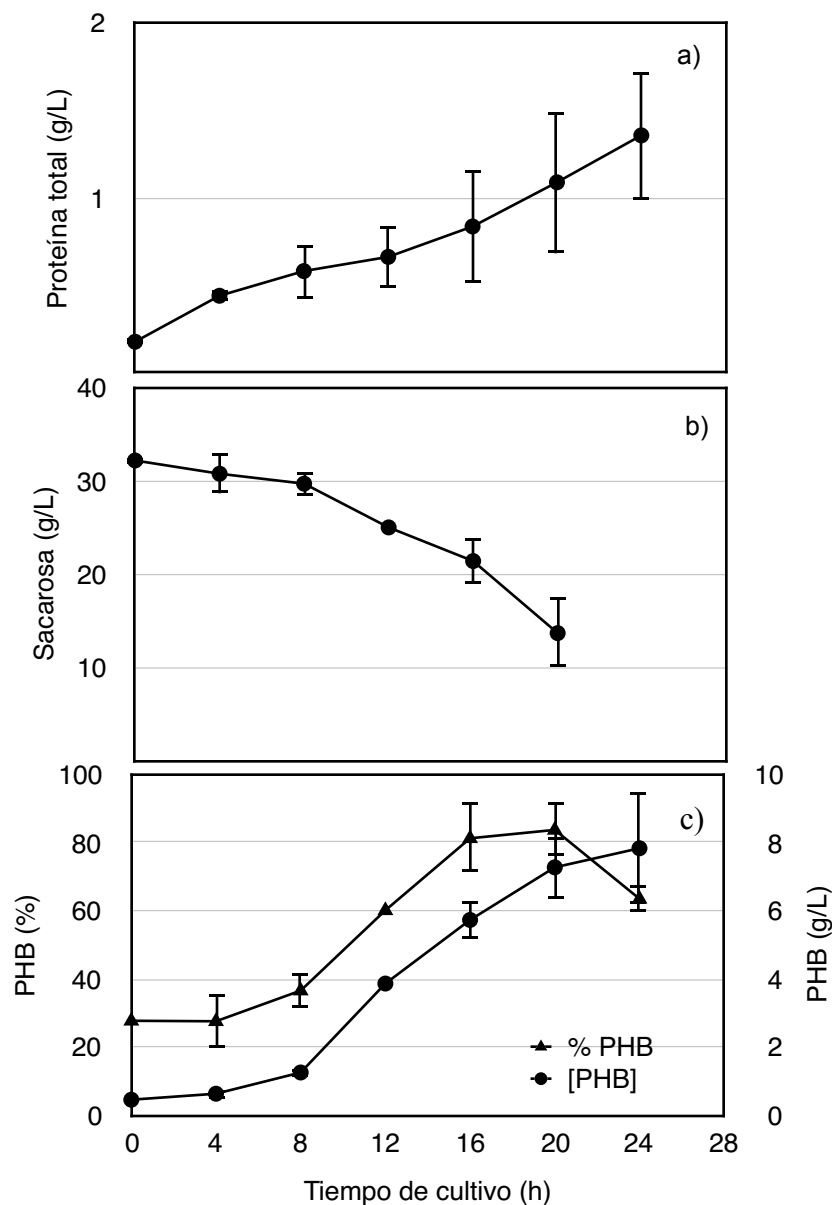
Figura 6.3. Perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) de tres réplicas de la etapa lote del cultivo alimentado de *A. vinelandii* OPNA en el medio sacarosa y extracto de levadura a 500 rpm y 29 °C.



En la figura 6.4 se muestran las cinéticas de crecimiento, de consumo de sacarosa y de producción y acumulación de PHB durante la etapa lote del cultivo donde el oxígeno disuelto es limitante. Se obtuvo 1.2 g/L de proteína total a las 20 h de cultivo, lo cual representa 2.5 veces más de lo obtenido previamente por García *et al.* (2014), en la etapa lote del proceso propuesto. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento en los cultivos desarrollados con medio SEL y bajo las condiciones de oxígeno ya expuestas fue de $0.071 \pm 0.025 \text{ h}^{-1}$, la cual es mucho menor a la reportada (0.15 h^{-1}) por García *et al.* (2014), en cultivos con medio PY y control de oxígeno al 4 %. Las diferencias anteriores podrían ser explicadas con base en las condiciones del control de la TOD (presente estudio). La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) calculada teóricamente con las ecuaciones de balance de oxígeno en cultivos aerobios, fue de 10.5 mmol/Lh y es menor a la reportada (24.5 mmol/Lh) por García *et al.* (2014), para los cultivos con control de la TOD por mezcla de gases. Lo anterior indica que las condiciones del oxígeno disuelto del cultivo de este trabajo no están favoreciendo el crecimiento de la cepa.

En contraste, la velocidad de consumo específico de sacarosa fue mayor en los cultivos aireados que la reportada por García *et al.* (2014), (1.0 vs 0.12 $\text{g}_S/\text{g}_{\text{prot}} \cdot \text{h}$). En el cuadro 6.3 se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de esta etapa. Es importante señalar que al término de la etapa lote, se consumió el 50 % de la sacarosa, a pesar de que se esperaba un mayor consumo según los cálculos teóricos realizados para una TOD no limitante. Lo anterior se puede corroborar con el bajo rendimiento obtenido de proteína total respecto al sustrato (sacarosa) (Cuadro 6.3).

Figura 6.4. Cinética de crecimiento en proteína total (a), consumo de sacarosa (b) y de producción y acumulación de PHB (c), en la etapa lote del cultivo para la cepa *A. vinelandii* OPNA.



Se puede observar en la figura 6.4c, que la producción volumétrica de PHB fue de 7.5 g/L al final de la etapa lote y un rendimiento de PHB ($0.442 \pm 0.106 \text{ g}_P/\text{g}_S$) con respecto a sacarosa de 44 % mayor con respecto al reportado previamente ($0.30 \pm 0.02 \text{ g}_P/\text{g}_S$) por García *et al.* (2014). Este incremento se podría deber al medio de cultivo sin peptona que se utilizó en el presente trabajo. La velocidad específica de producción de PHB muestra una asociación al crecimiento, rasgo que es de esperarse para esta bacteria con tres mutaciones y por tanto, su capacidad para sobre-producir el polímero. A pesar de los incrementos logrados en el lote, se observa que en las primeras horas, la acumulación de PHB es muy baja (< 50%) porque se está favoreciendo la duplicación celular más que la síntesis de PHB. A partir de las 12 h de cultivo se alcanza una acumulación de 80 % de PHB por peso seco celular, lo cual coincide con el periodo en el que el oxígeno se limita (Figura 6.3).

6.2.2. Etapa de alimentación: pulso 1.

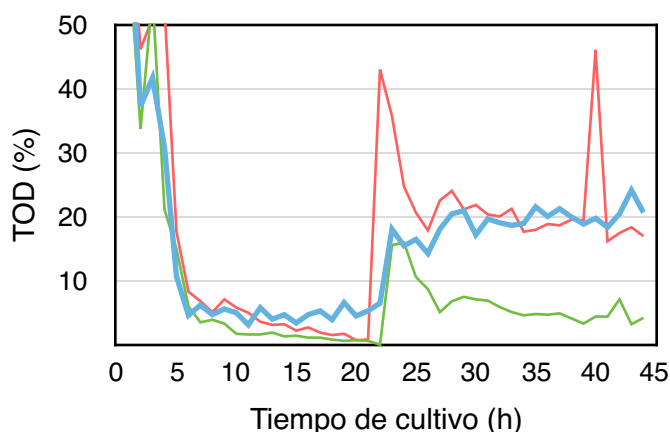
Cuadro 6.3. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la etapa lote del cultivo a 500 rpm.

Parámetro	Etapa lote
μ (h ⁻¹)	0.071 ± 0.025
q_s (g _s /g _{prot} h)	0.704 ± 0.381
q_p (g _p /g _{prot} h)	0.366 ± 0.140
Prod vol (g/Lh)	0.36 ± 0.09
$Y_{X/S}$ (g _{prot} /g _s)	0.081 ± 0.023
$Y_{P/S}$ (g _p /g _s)	0.442 ± 0.106

El primer pulso se realizó a las 22 h de cultivo, cuando la sacarosa residual fue de 12 - 15 g/L. La alimentación consistió en el mismo medio de cultivo: sacarosa y extracto de levadura (SEL) con una relación C/N 14 y una concentración inicial de sacarosa de 30 g/L. En esta parte, la velocidad de agitación se aumentó a 700 rpm para garantizar la velocidad de transferencia de oxígeno necesaria para el crecimiento celular; y el flujo de aire se mantuvo en 2 L/min. Como se observa en la figura 6.5, la tensión de oxígeno disuelto se incrementa a 15 - 20 %, debido al cambio en la agitación y a pesar del aumento en la concentración celular, la TOD se mantuvo estable a lo largo de esta etapa. Bajo esta condición, el cultivo no se encuentra limitada de oxígeno y se esperaría un incremento en el crecimiento pero no en la acumulación de PHB, como se ha indicado en la literatura.

Figura 6.5. Perfil de tensión de oxígeno disuelto (TOD) de tres réplicas de la etapa lote y primer pulso del cultivo alimentado de *A. vinelandii* OPNA en el medio sacarosa y extracto de levadura a 500 rpm y 29 °C.

A pesar del cambio positivo de las condiciones de transferencia de oxígeno, la velocidad



específica de crecimiento fue de 0.052 ± 0.007 h⁻¹, estadísticamente igual a la calculada para la etapa lote. Este valor de velocidad de crecimiento fue mayor que el obtenido por García *et al.*

(2014), en las etapas de alimentación exponencial e intermitente; y se lo atribuyen al medio de cultivo (inicial y de alimentación) que contiene peptona. No obstante, Page y Cornish, (1993) argumentan que los cultivos de *A. vinelandii* con las características de esta cepa mutante se componen de una población heterogénea con células grandes que contienen mucha cantidad de PHB acumulado y células pequeñas con muy poco PHB acumulado que se están duplicando preferentemente. Esto podría explicar porqué la velocidad específica de crecimiento no cambia, ya que se está midiendo aquellas células que se están duplicando.

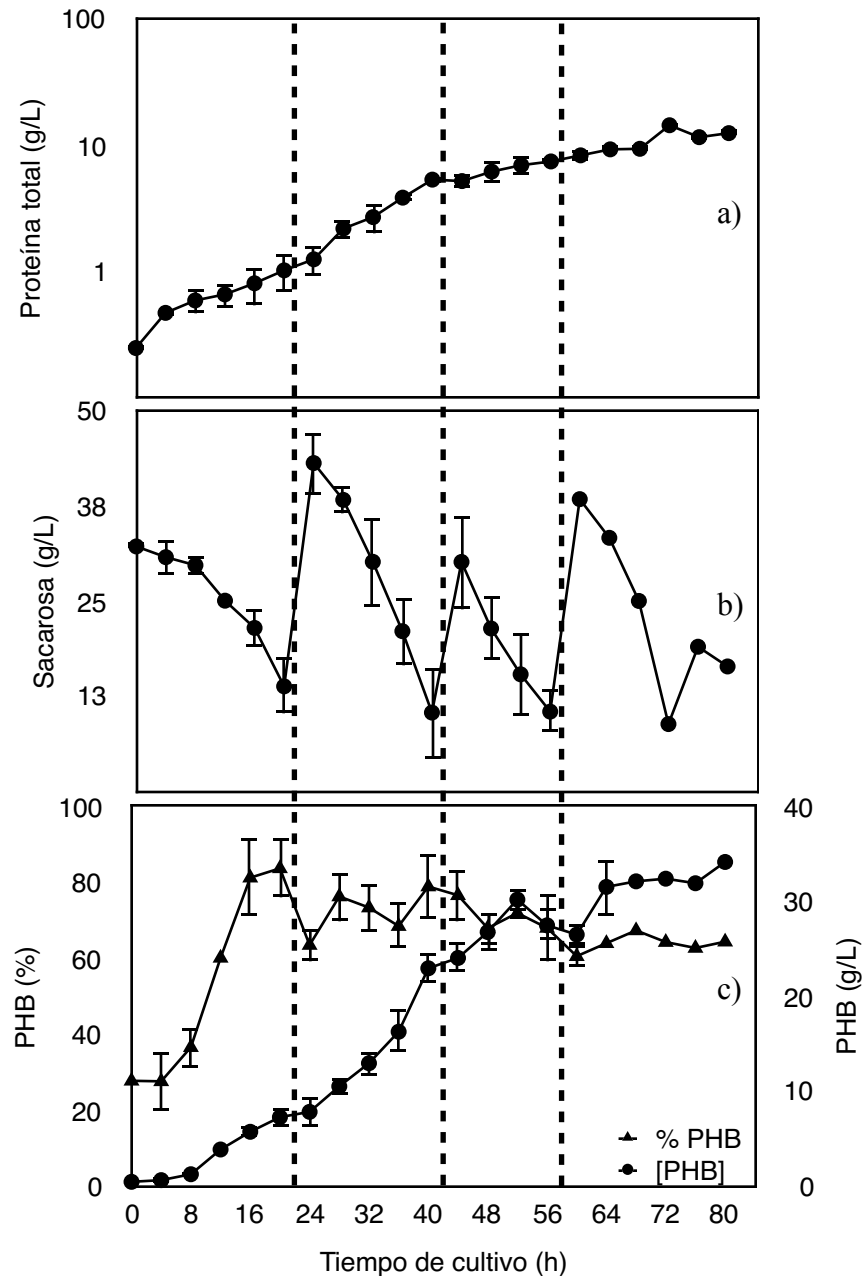
La figura 6.6 muestra las cinéticas de crecimiento en proteína total, de consumo de sacarosa y de producción de PHB de todas las etapas del cultivo. En la segunda etapa (primer pulso), la proteína máxima alcanzada al final fue de 4.6 g/L que es 40 % mayor de lo obtenido en la etapa de alimentación exponencial del trabajo de García *et al.* (2014), en la cual se alimentó el medio PY (sacarosa, extracto de levadura y peptona). A diferencia del trabajo mencionado, el pulso de alimentación en este cultivo fue solo de sacarosa y extracto de levadura con relación C/N 14 y la concentración inicial de sacarosa de 30 g/L. De esta forma, el incremento en la cantidad de proteína en esta segunda etapa se podría explicar por el exceso de sacarosa y extracto de levadura presente en el medio de cultivo y la velocidad de transferencia de oxígeno mayor que favorece el crecimiento. Como se ha mencionado anteriormente, cuando la bacteria no se encuentra limitada de oxígeno, el acetil-CoA resultante del catabolismo de la sacarosa, se dirige preferencialmente hacia el ciclo de ácidos tricarbóxicos, generando poder reductor y produciendo ATP.

El rendimiento de proteína total respecto a la sacarosa se mantuvo estadísticamente igual con respecto a la etapa lote, a pesar de que el consumo de sacarosa fue cerca del 90 %, como se muestra en la figura 6.6b. Esto muestra que el pulso de alimentación aunado con el cambio de la velocidad de agitación no aumenta el crecimiento de la población del cultivo sino al contrario, disminuye. Esto podría explicarse por el crecimiento de las células que están presentes y no por la duplicación de las mismas. Sin embargo, como se mencionó en un párrafo anterior, autores indican que este crecimiento corresponde a cierta parte de la población, la cual está compuesta de células pequeñas que se están duplicando (Page y Cornish, 1993). La sacarosa podría estar dirigiéndose hacia la síntesis de PHB.

La producción volumétrica de PHB (Figura 6.6c) después del primer pulso fue mayor que la etapa lote y se obtuvo una ganancia neta de 13 g/L que representa un 30 % más que lo obtenido por García *et al.* (2014), en su etapa de alimentación exponencial. Estos autores obtuvieron un rendimiento menor (0.32 g_{PHB}/g_S) y puede ser por el diferente régimen de alimentación utilizado. En total se obtuvieron 20.5 g/L de PHB a las 42 h con una productividad volumétrica de 0.81 g/L·h. En estas etapas, se alcanzaron altas concentraciones de biomasa como es de

esperarse de los cultivos alimentados y, a pesar de esto, la bacteria continuó creciendo y produciendo PHB manteniendo una acumulación del 70 - 75 % por peso seco celular. Aunque el crecimiento no es el óptimo para esta cepa, debido principalmente por el elevado porcentaje de acumulación de PHB, se duplica lo suficiente para garantizar altas concentraciones de polímero.

Figura 6.6. Cinética de crecimiento en proteína total (a), consumo de sacarosa (b) y de producción y acumulación de PHB (c), de las cuatro etapas del cultivo lote-alimentado para la cepa *A. vinelandii* OPNA. Las líneas discontinuas indican el momento del pulso de alimentación.



6.2.3. Etapa de alimentación: pulso 2 y 3.

Para el segundo y tercer pulsos (sacarosa y extracto de levadura con relación C/N 14 y concentración inicial de 30 g/L de sacarosa), las condiciones de transferencia de oxígeno se mantuvieron constantes (700 rpm y 2 L/min), al igual que el pH y la temperatura. No obstante se alcanzó una concentración celular más alta, la velocidad específica de crecimiento disminuyó a 0.02 h^{-1} , que es la mitad del valor obtenido en los pulsos previos. Una posible explicación para este fenómeno es que, a pesar del exceso de nutrientes de carbono y nitrógeno, se podrían estar acumulando productos secundarios o residuales del medio de cultivo que pudieran estar afectando las funciones metabólicas de la asimilación de la fuente de carbono y, por ende, la duplicación celular (Ienczak *et al.* 2013). Diaz-Barrera *et al.* (2012) reportaron que *A. vinelandii* tiene índices de eficiencia en el aprovechamiento del sustrato limitante dependiendo de la concentración inicial de sustrato. Por ejemplo, por encima de los 20 g/L de fuente de carbono, el aprovechamiento de la sacarosa llega a ser del 50 % aproximadamente, dando lugar a la generación de otros compuestos como ácidos orgánicos involucrados en el ciclo de ácidos tricarbóxicos, los cuales se estarían excretando al medio de cultivo.

El rendimiento de proteína total con respecto a la sacarosa calculado para el segundo y tercer pulsos de alimentación fue estadísticamente igual que la etapa del primer pulso. Sin embargo, la velocidad específica de consumo de sacarosa fue menor en esta etapa de alimentación que las anteriores (cuadro 6.4). Esto podría explicarse por la acumulación de productos residuales que contenga el extracto de levadura o productos secundarios que se generen durante el cultivo que causen estrés en la bacteria e impidan la asimilación eficaz de sacarosa.

En esta última etapa como en las dos anteriores, el rendimiento de PHB con respecto a

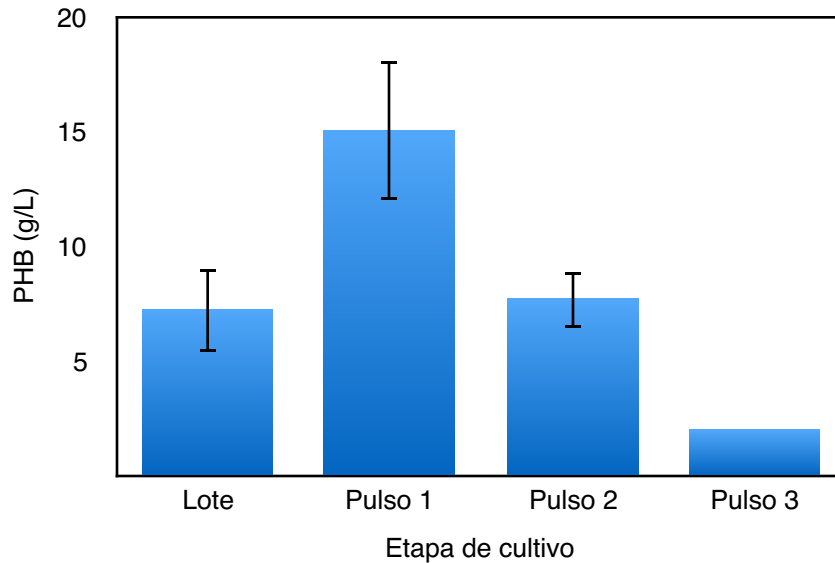
Cuadro 6.4. Parámetros cinéticos y estequiométricos después de la adición de los pulsos. *Este experimento no ameritó réplica.

Parámetro	Pulso 1	Pulso 2	Pulso 3*
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.052 ± 0.007	0.023 ± 0.005	0.02
$q_S \text{ (g}_S\text{/g}_{\text{prot}}\text{h)}$	0.555 ± 0.085	0.473 ± 0.119	0.10
$q_P \text{ (g}_P\text{/g}_{\text{prot}}\text{h)}$	0.228 ± 0.005	0.305 ± 0.106	0.04
Prod vol (g/Lh)	0.808 ± 0.131	0.365 ± 0.085	0.13
$Y_{X/S} \text{ (g}_{\text{prot}}\text{/g}_S\text{)}$	0.092 ± 0.014	0.139 ± 0.041	0.20
$Y_{P/S} \text{ (g}_P\text{/g}_S\text{)}$	0.417 ± 0.054	0.391 ± 0.171	0.13

sacarosa fue la misma y mayor a las obtenidas en el trabajo de García *et al.* (2014). Lo interesante es que se obtiene el mismo rendimiento en cada etapa y podría explicarse por la capacidad de esta cepa de producir PHB de manera constitutiva. Sin embargo, en el presente trabajo se logra una elevada concentración celular y un mayor consumo de sacarosa, tanto para el cre-

cimiento como para la producción de PHB. Después del segundo pulso, se logró producir 13 g/L de PHB neto con una productividad volumétrica de 0.5 g/Lh y en total 33.6 g/L de PHB a las 64 horas, como se muestra en la figura 6.6c.

Figura 6.7. Concentraciones de PHB (g/L) netas producidas en cada etapa del cultivo con *A. vinelandii* OPNA. La etapa lote fue de 22 hrs., el pulso 1 de 20 hrs, el pulso 2 de 18 hrs y el pulso 3 de



20 hrs.

En general, se obtuvo una concentración de 33.6 g/L de PHB, con una productividad volumétrica de 0.69 g/Lh y un porcentaje de acumulación entre el 65 - 75 % de PHB en peso seco celular. A pesar de lograr una cantidad alta de PHB para la cepa de *A. vinelandii* OPNA, en comparación con otras cepas y otros procesos, sigue habiendo retos importantes para el escalamiento de este proceso. El-Sayed *et al.* (2009) estudiaron diferentes estrategias de cultivo para la producción de PHB utilizando las cepas *A. eutrophus* y *A. latus* y concluyeron que el régimen intermitente de alimentación es mejor que otros como el exponencial ya que este último sobre estima el consumo de sacarosa.

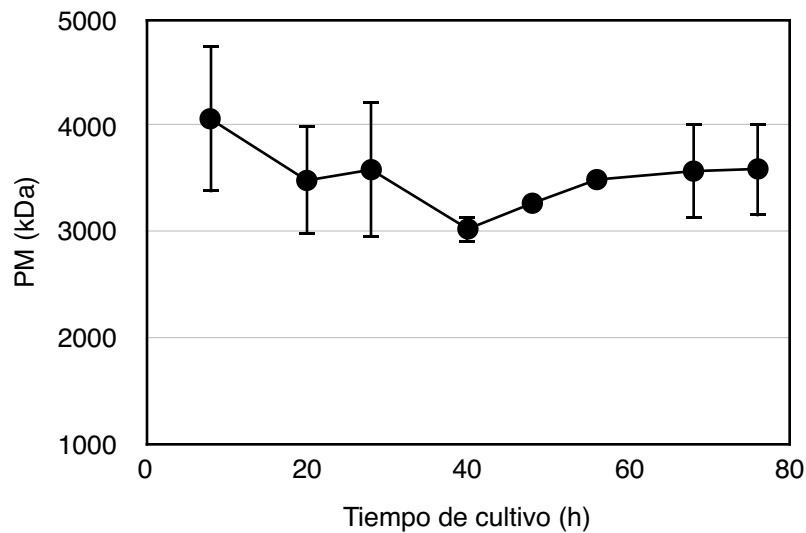
6.2.4. Peso molecular de PHB.

El PHB tiene un amplio rango de pesos moleculares y por tanto, se ha propuesto diferentes clases de productos que se pueden fabricar. El peso molecular alto le proporciona dureza y alto grado de cristalinidad al PHB; sin embargo, se vuelve más quebradizo (Ozdil y Aydin, 2014). Investigaciones recientes han probado el uso de plastificantes para mejorar estas propiedades y que el proceso de fabricación no dañe el material. La obtención de polímeros con pesos moleculares altos permite entrar a una vasta gama de aplicaciones desde la producción

de commodities hasta los mercados de alto valor agregado como los productos de reconstrucción de tejidos y materiales para cirugía.

Se conoce que el género de *Azotobacter vinelandii* sintetiza PHB de alto peso molecular dependiendo de las condiciones de cultivo. En este caso, se determinó el peso molecular del PHB en diferentes momentos del cultivo: en la etapa lote, en las etapas de alimentación, antes y después de los pulsos y cuando entra a la fase estacionaria de crecimiento por agotamiento de la sacarosa. Los resultados se observan en la figura 6.9.

Figura 6.8. Valores de peso molecular de PHB en diferentes momentos del cultivo alimentado de la cepa



A. vinelandii OPNA.

En las cuatro etapas del cultivo el peso molecular se mantuvo en promedio en los 3500 kDa indicando que las condiciones utilizadas de transferencia de oxígeno, de alimentación y de concentración celular no afectan significativamente esta propiedad. Se ha sugerido que para mantener niveles altos de peso molecular en PHB, debe favorecerse la polimerización más que la generación de centros iniciales de la cadena polimérica. Laycock *et al.* (2014), han mencionado que a bajos niveles de expresión de la PHB sintasa se obtiene alto peso molecular. Sin embargo, en *R. eutropha* recombinante se ha encontrado que el control del peso molecular del PHB es independiente de esta enzima. En este trabajo no se hicieron pruebas de expresión genética, pero las modificaciones genéticas de la cepa OPNA podrían influir en la síntesis de PHB de alto peso molecular, más que las condiciones de cultivo como fue observado en el trabajo de Peña *et al.* (2014). Estos autores encontraron que la transferencia de oxígeno afecta inversamente el peso molecular del PHB. Sin embargo, se necesitan más estudios para elucidar los mecanismos involucrados en la determinación del peso molecular del PHB.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo libre de peptona con diferentes relaciones carbono/nitrógeno proporcionó mejores resultados de crecimiento de la cepa *A. vinelandii* OPNA y producción de PHB. La relación C/N 14 con sacarosa y extracto de levadura es suficiente para obtener mayor cantidad de PHB con respecto a las estrategias de cultivo con esta cepa.

El cultivo aireado en la etapa de alimentación con agitación constante proporcionó condiciones de no limitación de oxígeno que favoreció el crecimiento de *A. vinelandii* OPNA y la producción de PHB. Se logró obtener un cultivo de alta densidad celular sin usar oxígeno puro.

Con la estrategia de fermentación desarrollada en este trabajo se logró obtener 33.6 g/L de PHB. El peso molecular promedio de PHB obtenido (en promedio de 3500 kDa) está en el rango de los pesos moleculares de los polímeros considerados de alto peso molecular (> 1000 kDa).

La alimentación intermitente permitió alcanzar una productividad global de 0.69 g/L·h y una acumulación de PHB del 70 % en peso seco celular. Operacionalmente, esta estrategia es simple y adecuada para microorganismos con bajas velocidades de crecimiento como *A. vinelandii*.

En general, se logró obtener cantidades de PHB de alto peso molecular por arriba del promedio alcanzado en trabajos previos con menor cantidad de componentes en los cultivos y con un método simple de cultivo lote-alimentado.

PERSPECTIVAS

Se podría optimizar el medio de cultivo con los componentes esenciales del extracto de levadura y/o sustratos de carbono económicos ya que *A. vinelandii* tiene como ventaja la capacidad de metabolizar varias fuentes de carbono.

Con este tipo de estrategia es posible estudiar el comportamiento de la TOD y su influencia en la producción de polímeros como el PHB. Este estudio proporcionaría las bases para mejorar el método de control de TOD y establecer un perfil de agitación que favorezca la producción de PHB.

Se propone diseñar una estrategia de fermentación con recirculación de biomasa para evitar la acumulación de residuos o productos secundarios debidos a la alimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K. and Peña, C. (2013). Oxygen supply strongly influences fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochem.*, 48, 995-1003.

Chanprateep, S. (2010). Currents trends in biodegradable polyhydroxialcanoates. *J. Biosci. Bioeng.*, 110 (6), 621 - 632.

Chen, G. and Page, W.J. (1997). Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in two-stage fermentation process. *Biotechnol. Tech.*, 11, 347-350.

Dawes, E.A. (1988). Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer. *Biosci. Rep.*, 8 (6), 537 -546.

Díaz-Barrera, A., Soto, E., Altamirano, C. (2012). Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 613-621.

Díaz-Barrera, A., Andler, R., Martínez, I., Peña, C. (2015). Poly-3-hidroxibutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures in different oxygen transfer rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 91, 1063-1071.

El-Sayed, A.A., Hemmat, M.A., Hafez, A.M. and Khodair, T.A. (2009). Batch production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* using bioreactor different culture strategies. *J. Appl. Sci. Res.*, 5, 556-564.

García, A. (2013). Producción de poli- β -hidroxibutirato en cultivos multietapas y en lote alimentado usando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., Peña, C. (2013). High production of poly 3-hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed batch fermentation process. *Biochem. Eng. J.* 82, 117-123.

Grothe, E and Chisti, Y. (2000). Poly(β -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: Behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess Eng.*, 22, 441-449.

Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millán, L.F. and Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol.*, 158, 1953-1963.

Ienczak, J., Schmidell, W. and de Aragao, G. (2013). High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 275-286.

Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V. and Thongchul, N. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 36, 1463-1474.

Keshavarz, T. and Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13, 321-326.

Kessler, B. and Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *J. Biotechnol.*, 86, 97-104.

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B and Thongchul, N. (2009). Inexpensive fedbatch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 240-245.

Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., and Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog. Polym. Sci.*, 38, 536 - 583.

Lowry, O.H., Rosebrugh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 – 275.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination for reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 (3), 426 – 428.

Misra, S., Valappil, S., Roy, I. and Boccaccini, A. (2006). Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromol.*, 7 (8), 2249-2258.

Myshkina, V.L., Nikolaeva, D.A., Makhina, T.K., Bonartsev, A.P. and Bonartseva, G.A. (2008). Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 44, 482-486.

Nóñez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K. and Espín, G. (2008). Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 15, 244-254.

Ozdil, D. and Aydin, H. (2014). Polymers for medical and tissue engineering applications. J. Chem. Technol. Biotechnol., 89, 1793–1810

Page, W.J. and Cornish, A. (1993). Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol., 59, 4236-4244.

Patel, M., Gapes, D.J., Newman, R.H. and Dare, P.H. (2009). Physico-chemical properties of polyhydroxyalkanoate produced by mixed-culture nitrogen-fixing bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 82, 545-555.

Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo-Urbe, A. and Segura, D. (2013). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). Ann. Microbiol., 64, 39-47.

Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., and Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. Microb. Biotechnol., 7(4), 278 - 293.

Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. Biotechnol. Adv., 22, 261-279.

Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Seghal, G. and Selvin, J. (2013). Process optimization and production of polyhydroxybutyrate using palm jaggery as economical carbón source by marine sponge-associated *Bacillus licheniformis* MSBN12. Bioprocess Biosyst. Eng., 36, 1817-1827.

Segura, D., Guzmán, J., and Espín, G. (2003). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. Appl. Microbiol. Biotechnol., 63, 159 - 163.

Segura, D., Nuñez, C. and Espín, G. (2014). *Azotobacter* Cysts. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Setubal, J.C., Dos Santos, P., Goldman, B.S., Ertesvag, H., Espín, G., Rubio, L.M., Valla, S., Almeida, N.F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., He-

Ilner-Burris, K., Hernández, J.A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T.J., Latreille, P., Ligon, L.S., Lu, J., Maerk, M., Miller, N.M., Norton, S., O'Carroll, I.P., Paulsen, I., Raulfs, E.C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S.L., Studholme, D.J., Sun, J., Viana, C.J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D.R., Dixon, R. and Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* 191, 4534-4545.

Zapata-Vélez, A. M. y Trujillo-Roldán, M. A. (2010). The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Ann. Microbiol.*, 60, 661-668.