



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**BIOSÍNTESIS DE COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)
MEDIANTE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE CULTIVO DE LA CEPAS MODIFICADA
OPNA DE *Azotobacter vinelandii*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANGIE JOHANNA TORRES PEDRAZA

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA, IBT UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA, FQ UNAM Y DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ,
IBT UNAM.

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE DE 2020



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.

DEDICATORIA

A los dos motores de mi vida mis dos mamás Margarita y Yovana, gracias por apoyarme en cada etapa de mi vida, por escucharme siempre, por su preocupación. Pero sobre todo por exigirme cada día a ser una mejor persona y profesional.

Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

Esto es para y por ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos F. Peña, por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por su constante guía, dedicación, apoyo y exigencia.

Al Dr, Enrique Galindo Fenantes, por haberme permitido pertenecer a su grupo de investigación y por sus sugerencias durante el proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus comentarios, sugerencias y apoyo durante el desarrollo de este proyecto:

Dr. Carlos F. Peña Malacara

Dr. Daniel G. Segura González

Dra. Amelia Farrés González Sarabia

A la Dra. Celia Flores, gracias por su paciencia, sus consejos y sobre todo por estar en cada momento de este proceso.

Al M. en C. Carlos Ahumada, por su apoyo incondicional, por sus consejos y por su amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio 10, especialmente a los doctores Andrés, Holjes y Tania gracias por todos sus consejos, su tiempo y su apoyo; y a mis amigos Alexis y Daniel por su apoyo y su amistad.

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 tutoría de la Dr. Carlos F. Peña Malacara. Durante el mismo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 925264. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto (IG 200219) y al proyecto 09865 -P- CONACyT-FONCICYT 277600.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1 Generalidades de los polihidroxicanoatos (PHAs)	15
2.1.1 Importancia del peso molecular de los PHAs.....	16
2.1.2 Propiedades termomecánicas de los PHAs	18
2.1.3 Aplicaciones de los PHAs	19
2.2 Biosíntesis de PHAs	20
2.3 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la síntesis de PHAs	22
2.3.1 Efecto del oxígeno disuelto (TOD) y la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) sobre la síntesis de los PHAs.	22
2.3.2 Efecto del precursor y su concentración sobre la síntesis de los PHAs.	24
2.4 <i>Azotobacter vinelandii</i> productora de PHAs.....	25
2.4.1 Cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i>	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	29
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS	32
7.1 Cepa.....	32
7.2 Preservación de la cepa.....	32
7.3 Medio de cultivo	32
7.4 Preparación del inóculo	33
7.4.1 Pre- inóculo	33
7.5 Cultivos en matraces agitados	33

7.6 Cultivos en Biorreactor.....	34
8. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	35
8.1 Determinación de biomasa por peso seco.....	35
8.2 Determinación de proteína.....	35
8.3 Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos en el caldo de cultivo.....	36
8.4 Cuantificación de PHAs.....	37
8.5 Peso molecular de los polímeros de PHAs.....	37
8.6 Determinación de la composición de los copolímeros de PHAs.....	38
8.7 Estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno.....	38
8.8 Cálculo de los parámetros cinéticos.....	39
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
9.1 Efecto de los factores de cultivo sobre la composición monomérica de los copolímeros producidos por la cepa OPNA.....	40
9.2 Cultivos en matraces agitados de la cepa OPNA.....	43
9.3 Influencia de la $V_{TO_{m\acute{a}x}}$ sobre la producción y composición del copolímero PHBV.....	54
9.4 Relación del peso molecular y composición monomérica del copolímero PHBV.....	71
10. CONCLUSIONES.....	74
11. PERSPECTIVAS.....	75
12. BIBLIOGRAFÍA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Estructura química general de los PHAs	16
2	Vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de polihidroxicanoatos de cadena corta y cadena media en <i>A. vinelandii</i> y en especies de <i>Pseudomonas</i>	21
3	Modelo de regulación de la expresión de los genes <i>phbBAC</i> y <i>phbR</i> por los sistemas GacS/A-Rsm y Pts ^{Ntr} en <i>A. vinelandii</i> . Obtenida de Peña <i>et al.</i> , (2004).	27
4	Diagrama del diseño experimental.	30
5	Curva estándar de proteína empleada para la cuantificación de proteína.	36
6	Efecto de la adición del ácido valérico (precursor) en el crecimiento bacteriano. a) y b) Cinéticas de crecimiento con base en biomasa, c) proteína y d) concentración de sacarosa en g L ⁻¹ en cultivos en matraces agitados en medio Burk-sacarosa de las cepa OPNA sin adición (•) y con adición del precursor (▪) de <i>A. vinelandii</i> .	44
7	Porcentaje de PHAs obtenido en cultivos en matraces agitados en medio Burk-sacarosa de las cepas OPNA control (•) y OPNA con adición del precursor (▪) de <i>A. vinelandii</i> .	47
8	Cinética de consumo de ácido valérico (▪) y sacarosa (g L ⁻¹) (▪) en cultivos en matraces agitados de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> .	48
9	Esquema del consumo del ácido valérico (40 mM) a las 60 horas de cultivo en matraces agitados de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> .	49
10	Distribución de pesos moleculares de los PHAs producidos en el cultivo control (a) y con adición del precursor (b).	52
11	Perfiles de TOD (a), VTO (b) y control de pH (c), en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> bajo diferentes VTO _{máx} , y con la adición de ácido valérico (10 mM).	55
12	Efecto de la VTO _{máx} sobre el crecimiento bacteriano (a) cinéticas de crecimiento celular en peso seco, cinética con base en log de biomasa (b), proteína (c), y consumo de sacarosa (d) en cultivos en lote de la cepa OPNA	56

	de <i>A. vinelandii</i> , en dos condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$: $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (▪) y a $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (•), con la adición de ácido valérico (10 mM).	
13	Cinéticas de acumulación (a) y concentración (b) de PHAs, en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> bajo dos condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$: $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (▪) y a $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (•), y con la adición de ácido valérico (10 mM).	57
14	Cinética de consumo de ácido valérico en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> bajo dos condiciones de $VTO_{m\acute{a}x}$.	60
15	Evolución de la composición monomérica de los copolímeros producidos en los cultivos a alta transferencia (a) y baja transferencia de oxígeno (b) en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> .	61
16	Distribución de pesos moleculares de los PHAs producidos a alta (a) y baja transferencia de $VTO_{m\acute{a}x}$ (b), en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> , con la adición de ácido valérico (10 mM).	64
17	Efecto de la concentración de ácido valérico sobre crecimiento bacteriano (a) cinética de crecimiento en base a biomasa (•) y log de biomasa (▪), (b) proteína, (c) producción (•) y concentración de PHAs (▪), (d) consumo de sacarosa (•) y ácido valérico (▪), en cultivos en lote a alta transferencia de oxígeno de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> , con la adición de ácido valérico (40 mM).	65
18	Evolución de la composición monomérica de los copolímeros producidos en los cultivos a alta transferencia en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> , con la adición de ácido valérico (40 mM).	66
19	Distribución de pesos moleculares de los PHAs producidos a alta transferencia, en cultivos en lote de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> , con la adición de ácido valérico (40 mM).	69

INDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Comparación de diferentes proporciones monoméricas de copolímeros de PHA.	18
2	Composición del medio Burk- sacarosa	32
3	Factores y niveles utilizados en el diseño experimental 2 ³ .	34
4	Valores de la variable de respuesta del diseño factorial 2 ³ para cada una de las combinaciones evaluadas por triplicado. Donde A: concentración del precursor, B: tiempo de adición y C: Volumen de llenado.	40
5	Parámetros obtenidos a partir de los cultivos realizados en matraces de la condición control y con adición del precursor de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> en medio Burk-sacarosa.	50
6	Composición en % mol del copolímero PHBV usando ácido valérico como precursor (Concentración final de 40 mM) en matraces agitados de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> .	51
7	Parámetros obtenidos a partir de los cultivos realizados en biorreactor en diferentes condiciones de VTO de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> .	63
8	Comparación de parámetros obtenidos a partir de los cultivos realizados en biorreactor en condiciones de alta de transferencia de oxígeno de la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> . Empleando 10 y 40 mM de ácido valérico.	68
9	Propiedades termomecánicas de P(3HB) y P(3HB)-co-3HV producidos en cultivos en matraces agitados de <i>A. chroococcum</i> 23, con la adición de 60 mM de ácido valérico (Savenkova <i>et al.</i> , 2000).	70
10	Pesos moleculares promedio y porcentaje mol de 3HV de tiempo final de cultivo, de las diferentes estrategias de cultivo, VTOs y concentración del precursor empleadas en estudio, con la cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i> .	71

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado
3HBME	Metil éster 3-hidroxiбутirato
3HVME	Metil éster 3-hidroxiуalerato
Da	Dalton
Fru	Fructosa
Glc	Glucosa
HV / 3HV	3-Hidroxiуalerato
IP	Índice de polidispersión
MCL	Monómeros de cadena media
MOPS	3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico
PMP	Peso molecular promedio
% mol	Porcentaje mol
PHAs	Polihidroxiалcanoatos
P (3HB)	Poli-3-hidroxiбутirato
P(3HB-co-4HB)	3-Polihidroxiбутirato-co-4-hidroxiбутirato
P (3HB-co- 3HV) / PHBHV	3-Polihidroxiбутirato-co-3-hidroxiуalerato
P(3HHx-xo-3HHx)	3-Polihidroxiбутirato-co-3-hidroxihexanoato
P(3HHx-xo-3HO)	3-Polihidroxiбутirato-co-3-octanoato
PMP	Peso molecular promedio
Sac	Sacarosa
SCL	Monómeros de cadena corta
SCL-co-MCL	Copolímeros de cadena corta-cadena media
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos son poliésteres de hidroxiácidos, sintetizados y acumulados por un amplio rango de bacterias, como material de reserva de carbono y energía. Se caracterizan por ser biodegradables, biocompatibles y por presentar propiedades termomecánicas similares a los derivados del petróleo. En la actualidad, el aumento en la demanda de biopolímeros con propiedades termomecánicas específicas y la falta de materiales que cumplan con los requisitos, conllevaron a un incremento en el interés, sobre la producción de copolímeros como una solución. Los copolímeros son materiales más versátiles, ya que, presentan diversas propiedades termomecánicas. Se ha reportado previamente que *Azotobacter vinelandii* tiene la capacidad de producir copolímeros de PHBV; sin embargo, no se ha evaluado la producción de copolímeros de PHBV en cepas sobre productoras de P(3HB) como la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Por lo cual el objetivo de este proyecto fue estudiar la biosíntesis de copolímeros de cadena corta de polihidroxicanoatos, empleando la cepa OPNA. El trabajo se dividió en dos partes, en la primera parte se realizó un diseño factorial 2^3 para establecer las condiciones de cultivo (tiempo de adición, concentración del precursor y $VTO_{máx}$) que permitieran obtener el mayor porcentaje de 3HV. Posteriormente, se caracterizó el crecimiento y la producción de copolímeros en cultivos en matraces empleando las condiciones de cultivo definidas en el diseño factorial. Con el fin de evaluar el efecto de la $VTO_{máx}$ sobre la composición de los copolímeros de PHBV. La segunda etapa consistió en cultivar la cepa en biorreactores de 3 L en condiciones de microaerofilia modificando la $VTO_{máx}$ a través de cambios en la agitación 300 ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y 700 rpm ($20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Los cultivos se realizaron por duplicado a $29 \text{ }^\circ\text{C}$ y manteniendo controlado el pH a 7.2.

Se observó que, a nivel de matraz la cepa OPNA con adición del precursor presenta menor crecimiento, acumulación y producción de polímeros, comparado con lo obtenido en la condición control. Sin embargo, la adición del precursor no tiene un efecto sobre el peso molecular promedio y distribución de pesos de los polímeros producidos en las condiciones evaluadas. Por otra parte, se evidenció la capacidad de la cepa OPNA de *A. vinelandii* de producir un copolímero de cadenas cortas PHBV, a partir de la adición de ácido valérico como precursor (40 mM). Este copolímero presenta una composición con una fracción de P(3HB) de $61.4 \pm 2.9 \%$ y una fracción de 3HV de $39.1 \pm 2.9 \%$ a las 48 horas de cultivo. Hasta donde sabemos, este es el porcentaje más alto de 3HV reportado para cepas de *A. vinelandii*.

En los cultivos en biorreactor se evidenció que, la adición del ácido valérico (10 mM) no tiene un efecto sobre el crecimiento, ni sobre la acumulación de PHAs. Además, se obtuvo una acumulación del $85.0 \pm 3.0 \%$ de PHAs a una $VTO_{máx}$ de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Sin embargo, el máximo porcentaje mol de 3HV ($8.3 \pm 0.0 \%$) se obtuvo en una condición más alta de $VTO_{máx}$ ($20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Lo anterior sugiere que la $VTO_{máx}$ tiene un efecto positivo sobre el contenido de 3HV presente en el copolímero. Adicionalmente se realizaron cultivos con 40 mM de ácido valérico a una $VTO_{máx}$ de $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, donde se observó que una mayor concentración de ácido afecta el crecimiento, producción y acumulación de PHAs. Sin embargo, incrementa el contenido de 3HV a $21.0 \pm 0.5 \%$ en el copolímero de PHBV. Finalmente, no se evidenció que el porcentaje mol de 3HV, tuviera una relación con el PMP de los copolímeros producidos en matraces agitados y en biorreactores por la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are linear intracellular polyesters, which accumulate in insoluble granules in the cytoplasm of bacteria, which serve as carbon and energy storage material. Currently, there is a growing demand for biopolymers with specific thermomechanical properties, however, there is a lack of material with these requirements, which increases interests on copolymers production as an alternative. Copolymers are versatile materials, with different thermomechanical properties. It was previously reported that *Azotobacter vinelandii* strains are able to produce PHBV copolymers. However, the ability to produce copolymers by P(3HB) overproducer mutant strain of *A. vinelandii* named OPNA it has not been studied. The main objective of the present study was to evaluate the changes in the composition of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) by an OPNA mutant strain of *A. vinelandii* cultured under different conditions. The experimental strategy was divided in two stages: during the first approach, the effect of culture conditions (OTR, concentration, and addition time of valeric acid) on the biosynthesis of PHBV produced by *A. vinelandii* were tested in a factorial design 2^3 in 500 mL shaken flasks cultures. In addition, at this stage the cell growth, production, and accumulation of PHBV were evaluated. On the second stage, the effect of OTR_{max} on the composition of PHBV copolymers was evaluated. Experiments were carried out in batch cultures, changing the OTR_{max} by the manipulation of the agitation rate at 300 ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, low OTR_{max}) and 700 rpm ($20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, high OTR_{max}). Cultures were performed in duplicate at $29 \text{ }^\circ\text{C}$. The pH was controlled at 7.2.

In shaken flasks, the valeric acid addition significantly affected the specific growth rate, biomass and PHAs production. It was demonstrated that the strain OPNA of *A. vinelandii* is able to synthesize PHBV copolymers, when valeric acid was added to growth medium in a final concentration of 40 mM. The highest content of 3HV ($39.1 \pm 2.9 \%$) was obtained at 48 h of cultivation. To our knowledge, this molar fraction of 3HV ($39.1 \pm 2.9 \%$) in the PHBV copolymer obtained in our study, it is the highest reported until now, by *Azotobacter* species cultured in shaken flasks cultures.

On the other hand, in the batch cultures were grown under oxygen limited conditions and different OTRs, varying the agitation rate. Valeric acid was added to growth medium in a final concentration of 10 mM. The highest PHBV accumulation ($85.0 \pm 3.0 \%$) was achieved at low OTR_{max} ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), whereas, the maximum content of 3HV ($8.3 \pm 0.0 \text{ mol}\%$) was obtained at higher OTR_{max} ($20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Our results reveal that increasing the OTR rises the molar fraction of 3HV in the PHBV copolymer. Therefore, the manipulation of OTR could be a feasible strategy to produce PHBV copolymers with different monomeric compositions at industrial level. Additionally, batch cultures with a high valeric acid concentration (40 mM) were performed at OTR_{max} ($20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), it was found that this concentration of precursor has a negative effect on cell growth, and PHBV accumulation in the OPNA strain. However, this precursor concentration has a positive influence on the 3HV content in the copolymer ($21.0 \pm 0.5 \%$), in comparison to the molar fraction of 3HV ($8.3 \pm 0.0 \%$) obtained at lower concentration (10 mM). Finally, it was showed that there are no significant changes in the mean molecular mass (MMM) under the conditions evaluated. For that reason, it is important to point out that molar fraction of 3HV had not a relationship with the MMM of the copolymers produced by the OPNA strain of *A. vinelandii*.

1. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres de hidroxiácidos, sintetizados y acumulados en inclusiones intracelulares por un amplio rango de bacterias y; son utilizados como material de reserva de carbono y energía (Reddy *et al.*, 2003; Anjum *et al.*, 2016). De igual forma, los PHAs son polímeros biodegradables y biocompatibles que presentan características térmicas y mecánicas similares a los plásticos derivados del petróleo, por lo cual se han empleado a nivel industrial en diversos campos como en la medicina, la agricultura y como una alternativa para sustituir a los plásticos convencionales (Philip *et al.*, 2007; Anjum *et al.*, 2016). Los PHAs son sintetizados a partir de unidades monoméricas de hidroxiácil formando cadenas lineales. Pueden encontrarse como homopolímeros o como copolímeros (Loo & Sudesh, 2007).

En los últimos años, se ha incrementado el interés por la producción de copolímeros, los cuales presentan diferentes propiedades físicas. Esto se debe, al tipo y proporción de unidades de hidroxialcanoatos adicionadas a la cadena lineal de PHA (Noda *et al.*, 2005; Noda *et al.*, 2010). Además, las diferentes propiedades termomecánicas de los polímeros de PHA están determinadas por el peso molecular, el cual a su vez depende de las condiciones de cultivo tales como: la aireación, la concentración y el tipo de fuente de carbono y por otros factores como el tipo de fermentación y el tipo de PHA sintasa presente en el microorganismo empleado (Doi & Steinbüchel, 2002; Khanna & Srivastava, 2005; Peña *et al.*, 2014).

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de la polimerización de PHAs empleando cepas de *A. vinelandii*. Se ha encontrado, que al emplear estrategias de fermentación mixtas (lote y lote alimentado) y en condiciones de limitación de oxígeno disuelto se acumulan altas concentraciones de P(3HB) con un peso molecular alto (Peña *et al.*, 2014; García *et al.*, 2019). Se sabe que las cepas de *A. vinelandii* son capaces de producir copolímeros de cadena corta como el P(3HB)-co-3HV, cuando se encuentran bajo condiciones de cultivo específicas, como en cultivos suplementados con ácidos orgánicos (Steinbüchel *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta lo anterior, a partir de la adición de precursores en los cultivos se pueden producir copolímeros con diferentes composiciones monoméricas que presenten diversas propiedades termomecánicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los polihidroxicanoatos (PHAs)

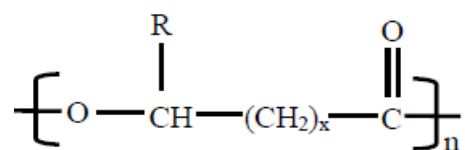
Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres lineales, producidos por un amplio rango de microorganismos. Más de 90 géneros y 300 especies bacterianas han sido descritas como productoras, entre estas destacan *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas spp* y *A. vinelandii*. Asimismo, se han reportado algunas arqueas productoras como *Haloferax sulfurifontis*, *Natronobacterium* y *Natronococcus* (Philip *et al.*, 2007; Muhammadi *et al.*, 2015).

Las bacterias productoras se pueden dividir en dos grupos. Aquellas que requieren de una limitación nutricional (fósforo, nitrógeno u oxígeno) para acumular el biopolímero, tal es el caso de *Ralstonia eutropha* y *P. oleovorans*; mientras que, existen bacterias capaces de acumular PHAs sin limitación nutricional como *A. vinelandii* y cepas recombinantes de *Escherichia coli* (Muhammadi *et al.*, 2015). En ambos casos, una vez que la fuente de carbono es asimilada, se convierte en hidroxicanoatos que posteriormente se polimerizan y acumulan en forma de gránulos insolubles en el citoplasma, que sirven como material de reserva de carbono y energía (Steinbüchel *et al.*, 1992; Madison & Huisman, 1999; Philip *et al.*, 2007).

Los PHAs se caracterizan por ser biodegradables y biocompatibles, lo que les permite tener un amplio rango de aplicaciones (Raza *et al.*, 2018). Asimismo, presentan propiedades termomecánicas similares a los plásticos derivados del petróleo, por lo cual son considerados como sustitutos de estos plásticos convencionales (Anderson & Dawes, 1990; Raza *et al.*, 2018).

Los monómeros de PHAs presentan una estructura general, que se muestra en la figura 1. Donde R hace referencia a la longitud de la cadena lateral, x hace referencia al tamaño del grupo alquilo. Tanto R como x determinan el tipo de unidad monomérica de PHA (Loo & Sudesh 2007). En estos polímeros el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero adyacente (Muhammadi *et al.*, 2015). Los PHAs son polímeros diversos, esto se debe a que poseen diferentes longitudes del

grupo alquilo, diferentes proporciones de los distintos monómeros y la presencia de monómeros con grupos sustituyentes (García, 2014).



R	x	Tipo de monómero	Nombre del monómero
H	1	SCL	3-hidroxiopropionato (3HP)
CH ₃	1	SCL	3-hidroxi butirato (3HB)
C ₂ H ₅	1	SCL	3-hidroxi valerato (3HV)
C ₃ H ₇	1	MCL	3-hidroxi hexanoato (3HHx)
C ₅ H ₁₁	1	MCL	3-hidroxi octanoato (3HO)
C ₇ H ₁₅	1	MCL	3-hidroxi decanoato (3HD)

Figura 1. Estructura química general de los PHAs (Loo & Sudesh 2007). SCL (monómeros de cadena corta) y MCL (monómeros de cadena media)

Los PHAs se pueden clasificar de diferentes formas. Como monómeros de cadena corta (SCL por sus siglas en inglés) (contiene 3 a 5 átomos de carbono), cadena media (contiene 6 a 14 átomos de carbono) (MCL por sus siglas en inglés) y cadena larga (contiene más de 14 átomos de carbono) (LCL por su siglas en inglés), dependiendo del número de átomos de carbono presentes, o por el tipo de monómeros que lo componen en homopolímeros (presentan solo un tipo de monómeros) y copolímeros (cuando presenta dos o más tipos de monómeros) (Steinbüchel *et al.*, 1992; Loo & Sudesh 2007). Estos últimos, se pueden dividir en copolímeros de cadenas cortas como el P(3HB-co-3HV), cadenas medias como el P(3HHx-co-3HO) o de ambos tipos de cadenas como el P(3HB-co-3HHx) (Akaraonye *et al.*, 2010).

2.1.1 Importancia del peso molecular de los PHAs.

Se ha reportado que, el peso molecular determina el comportamiento mecánico del polímero e influye en parámetros como el punto de fusión y la cristalinidad (Iwata, 2005; Khanna & Srivastava, 2005). Los altos pesos moleculares contribuyen a presentar una mayor resistencia y módulo de elasticidad; en el homopolímero P(3HB), pesos

moleculares en un rango entre $3-11 \times 10^6$ Da permiten obtener materiales más flexibles, con mejor elongación a la ruptura y sin afectar su biodegradabilidad; mientras que, en pesos moleculares por debajo de 3×10^2 Da generan materiales muy frágiles y con degradaciones térmicas tempranas (Aoyagi *et al.*, 2003; Iwata, 2005; Hong *et al.*, 2013).

Es importante señalar que, el peso molecular se ve influenciado por los parámetros de cultivo tales como: la composición del medio, la aireación, la condición de oxígeno, la concentración y el tipo de fuente de carbono, el pH y la temperatura (Doi & Steinbüchel 2002; Khanna & Srivastava 2005; Peña *et al.*, 2014). Estudios previos con cepas de *A. vinelandii*, han demostrado que el peso molecular de P(3HB) se encuentra asociado a la fase de cultivo (crecimiento de la población bacteriana) y a la actividad de las sintasas (enzima polimerizante) y depolimerasas (enzima despolimerizante) (Millán *et al.*, 2016). En cultivos en biorreactor de la cepa OP, el máximo peso molecular (4,800 kDa) se obtiene durante la fase exponencial, lo que concuerda con la mayor actividad de la sintasa; mientras que, en la fase estacionaria disminuye el peso molecular a 3,600 kDa, debido al aumento en la actividad de la depolimerasa. Es importante resaltar que, en este estudio, se emplearon dos valores de tensión de oxígeno disuelto (1-15%); sin embargo, el peso molecular no se vio afectado por la condición de oxígeno (Millán *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha reportado que en cultivos en matraces agitados (500 mL) de la cepa OPN de *A. vinelandii*, la aeración influye sobre el peso molecular promedio de los polímeros de PHB, siendo en una condición de baja aireación (200 mL de volumen de llenado) donde se obtiene el máximo peso molecular ($3,670 \pm 270$ kDa), mientras que, en una condición de mayor aireación (100 mL de volumen de llenado) el peso molecular disminuye a $2,600 \pm 170$ kDa (Peña *et al.*, 2014). Por su parte, polímeros de P(3HB) de alto peso molecular (6,500 kDa) se han obtenido en cultivos en biorreactor de la cepa OPNA de *A. vinelandii* cuando se emplea un medio complejo en una relación Carbono/Nitrógeno= 18, sin control de la tensión de oxígeno disuelto (Castillo *et al.*, 2017).

En el caso de los copolímeros de PHAs, se ha observado que el peso molecular se ve afectado por la composición monomérica (Myshkina *et al.*, 2010; Tappel *et al.*, 2014; Bonartsev *et al.*, 2017). Previamente, Tappel *et al.*, (2014) observaron que en cultivos en biorreactor de la cepa mutante LS5218-STQKABGK de *Escherichia coli*, el peso molecular promedio del P(3HB) es significativamente mayor (652.6 ± 9.0 kDa), comparado con el peso molecular promedio de los copolímeros de P(3HB)-co-MCLs (3-hidroxi octanoato y 3-hidroxidodecanoato) cuando se tiene una composición de 5 (211.2

± 34.5 kDa) y 7% (163.8 ± 29.5) de MCLs. Asimismo, Bonartsev *et al.*, (2017) reportaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa 7B de *A. chroococcum*, el peso molecular promedio del P(3HB) es de 1,630 kDa, mientras que, que en el copolímero P(3HB)-co-3HV con un porcentaje mol de 3HV de 9.08%, el peso molecular promedio disminuyó a 820 kDa.

2.1.2 Propiedades termomecánicas de los PHAs

Las propiedades termomecánicas de los PHAs son diversas. En general los monómeros de SCL-PHA son materiales rígidos, muy frágiles y presentan poca resistencia a la tracción; mientras que, los monómeros de MCL-PHA son amorfos, muy elásticos, con bajo punto de fusión y gran elongación a la ruptura (Loo & Sudesh, 2007).

El P(3HB) es uno de los polímeros mejor caracterizado de la familia de los PHAs; está constituido por monómeros de cadena corta (3-hidroxi butirato) y presenta propiedades mecánicas similares a plásticos convencionales como el polipropileno de baja densidad (Loo & Sudesh, 2007). Sin embargo, se ha reportado que tiende a ser un material quebradizo, frágil, rígido, parcialmente cristalino y con un alto punto de fusión, lo que limita no solo la capacidad de procesarlo, sino también su rango de aplicaciones (Noda *et al.*, 2005; Myshkina *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013; Anjum *et al.*, 2016).

Tabla 1. Comparación de PHAs con diferentes proporciones monoméricas. Modificado de Loo & Sudesh, 2007; Anjum *et al.*, 2016.

Polímero	Contenido del polímero	Temperatura de cristalización (°C)	Temperatura de fusión (°C)	Elongación a la ruptura (%)
P(3HB-co-4HB)	3 mol % 4HB	n. a	166	45
P(3HB-co-4HB)	16 mol % 4HB	-7	130	444
P(3HB-co-4HB)	90 mol % 4HB	-42	50	1080
P(3HB-co-3HHx)	10 mol % 3HHx	-1	127	400
P(3HB-co-3HHx)	15 mol % 3HHx	-	115	760
P(3HB-co-3HHx)	17 mol % 3HHx	-	120	850

Previamente, se ha reportado que la incorporación de otras unidades de hidroxiácidos permite mejorar las propiedades físicas del P(3HB) (Sudesh & Doi, 2005). Tal es el caso del copolímero de cadenas cortas P(3HB)-co-(3HV), el cual presenta mejores propiedades mecánicas que al P(3HB), lo que lo hace un material menos quebradizo y

rígido, además de ser similar a plásticos convencionales tales como polipropileno, poliestireno, y polietileno de alta densidad (Muhammadi *et al.*, 2015).

En los copolímeros las diferentes propiedades dependen del porcentaje mol (% mol) de los monómeros que lo componen (Matsusaki *et al.*, 2000). Algunos autores han reportado estudios sobre la relación que existe entre la modulación de la composición monomérica y su efecto en las propiedades termomecánicas, donde se ha demostrado que la relación no siempre es lineal, ya que, en algunos casos al aumentar el % mol, no se mejoran las propiedades (Tabla 1). Sin embargo, ciertas propiedades mecánicas como la elongación a la ruptura y la flexibilidad presentan una relación lineal con el porcentaje mol de los monómeros (Chang *et al.*, 2014). Mendonça *et al.*, (2017) observaron que al incrementar el % mol del 3HHx en el copolímero de P(3HB)-co-3HHx aumentaba la elongación a la ruptura (máximo esfuerzo que resiste un material antes de su rotura por estiramiento), lo que permitía obtener un material más suave y flexible.

Uno de los copolímeros de cadenas cortas más estudiados es el P(3HB)-co-3HV, el cual presenta una temperatura de fusión (cambio de fase sólida a una fase amorfa) menor a la del P(3HB). Asimismo, se ha reportado que el incremento en la fracción molar del hidroxivalerato disminuye el módulo de Young (la resistencia de un material a la deformación elástica), lo que permite que sea un material más extensible (Loo & Sudesh 2007; Myshkina *et al.*, 2010). Por otra parte, el P(3HB)-co-3HV presenta un amplio rango de propiedades termomecánicas dependiendo del porcentaje de 3HV presente, entre ellas presenta temperaturas de fusión de 145 °C (20 mol% 3HV) a 170 °C (3 mol% 3HV), módulo de Young de 1.2 GPa (20 mol% 3HV) a 2.9 GPa (3 mol% 3HV) y resistencia a la tracción (máximo esfuerzo que resiste un material antes de una deformación permanente) de 32 MPa (20 mol% 3HV) a 38 MPa (3 mol% 3HV) (Myshkina *et al.*, 2010).

2.1.3 Aplicaciones de los PHAs

En la actualidad, los PHAs tienen varios campos de aplicación. Son sustitutos de plásticos convencionales, debido a que son termoplásticos biodegradables, son insolubles en agua, presentan un alto grado de polimerización, no son tóxicos y presentan propiedades termomecánicas similares a los derivados de petróleo (Muhammadi *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2016). Al ser biodegradables, se pueden degradar hasta dióxido de carbono y agua

en condiciones aeróbicas, mientras que en condiciones anaeróbicas se degradan completamente a metano y dióxido de carbono. Estos procesos son mediados por mecanismos enzimáticos en microorganismos presentes en diferentes hábitats como en el suelo, el mar y en aguas residuales (Khanna & Srivastava, 2005).

Asimismo, son biocompatibles, es decir, no generan ningún compuesto tóxico durante su degradación por lo cual, se han empleado en el área médica y farmacéutica, específicamente en ingeniería de tejidos (placas óseas y suturas quirúrgicas), en el diseño de matrices para la proliferación celular y en la liberación controlada de fármacos y hormonas (Anjum *et al.*, 2016; Raza *et al.*, 2018). Sin embargo, los homopolímeros como el P(3HB) presentan alta resistencia a la hidrólisis y bajas tasas de degradación, limitando su uso en este campo. Esto ha permitido que copolímeros como el P(3HB)-co-3HV se empleen en esta área (Philip *et al.*, 2007; Anjum *et al.*, 2016; Raza *et al.*, 2018). En el campo agrícola, se utilizan en la encapsulación de semillas, encapsulación y liberación controlada de fertilizantes y como materiales de infraestructura de invernaderos (Verlinden *et al.*, 2007).

2.2 Biosíntesis de PHAs

La fuente de carbono es asimilada por la bacteria, convertida en precursores, los cuales son polimerizados en polihidroxicanoatos. La síntesis de PHAs es dependiente de las vías metabólicas presentes en la célula, que se encargan de metabolizar la fuente de carbono suministrada (por ejemplo, la adición de ácidos orgánicos activa la vía de β -oxidación; mientras que, la glucosa es metabolizada por la vía de Entner Doudoroff (ED)), y de la especificidad de la PHA sintasa por el precursor que se genere (Sudesh & Doi, 2005; Loo & Sudesh, 2007). Las vías metabólicas para la producción de polihidroxicanoatos se resumen en la figura 2.

La síntesis de SCL-PHA involucra tres reacciones enzimáticas, iniciando con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA (provenientes del catabolismo de carbohidratos o ácidos grasos) para formar acetoacetil-CoA, mediante la acción de una β -cetotiolasa (*phbA*). Luego se da la reducción de acetoacetil-CoA mediada por la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (*phbB*), para generar (R)-3-hidroxiacetil-CoA, el cual es el monómero para la polimerización por la PHA sintasa (*phbC*) de tipo I. Los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* que codifican para las enzimas

biosintéticas, se encuentran en el operón *phbBAC* (Segura *et al.*, 2003). Las cepas de *Cupriavidus necator* y *A. vinelandii* producen homopolímeros como poli-3-hidroxi-butirato P(3HB) a partir de esta vía (Jackson & Dawes, 1976; Madison & Huisman, 1999).

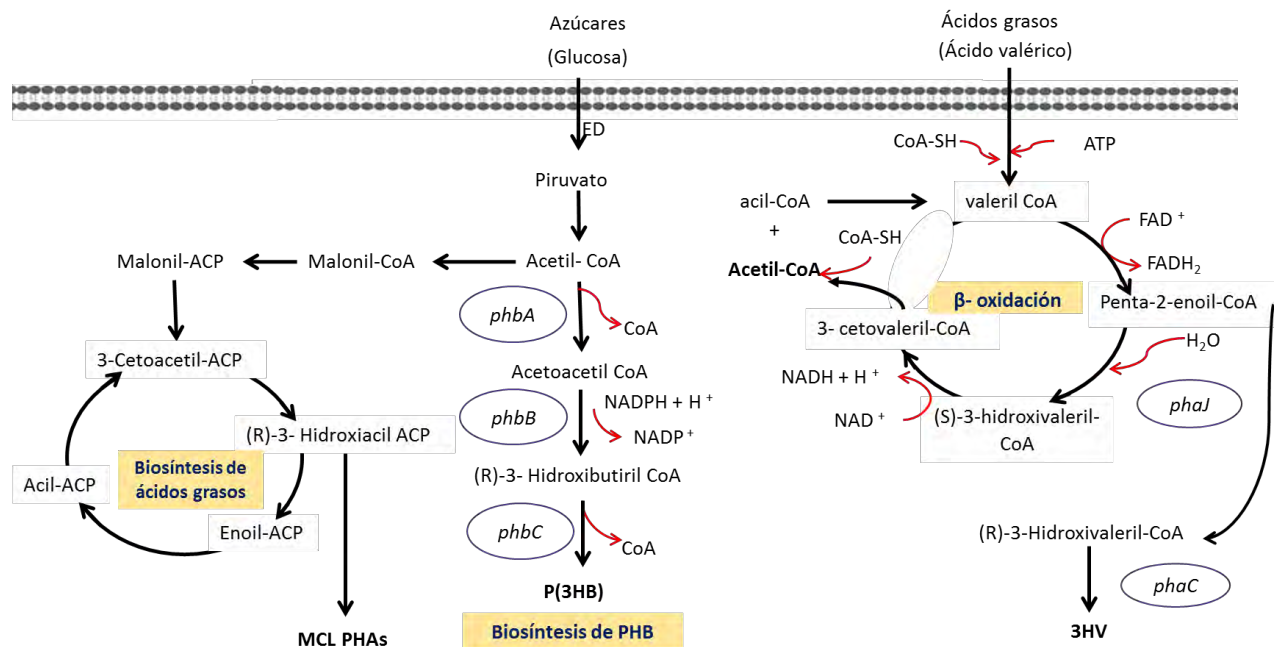


Figura 2. Vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de polihidroxicanoatos de cadena corta y cadena media en *A. vinelandii* y en especies de *Pseudomonas*.

Cuando se emplean ácidos grasos como fuente de carbono, estos pueden ser utilizados como sustratos para la síntesis de PHAs por la vía de β -oxidación (Blunt *et al.*, 2018). En especies de *Pseudomonas*, el catabolismo de los ácidos grasos genera el intermediario enoil-CoA, el cual es convertido mediante la adición de una molécula de agua al doble enlace del enoil por la enzima esteroespecífica trans-enoil-CoA hidratasa (*PhaJ*) en (R)-3-hidroxiacil-CoA, precursor para la síntesis de MCL-PHA por la PHA sintasa de tipo II (Prieto *et al.*, 2016). Las cepas de *A. vinelandii* producen copolímeros de cadena corta, como el P(3HB)-co-P3HV a partir de esta vía, cuando se adiciona ácido valérico como precursor (Steinbüchel *et al.*, 1992) (Fig. 2).

Cuando se emplean otras fuentes de carbono como carbohidratos, glicerol, acetato y ácidos grasos volátiles, estos pueden ser oxidados a acetil-CoA y canalizarse hacia la síntesis de MCL-PHAs a partir de la vía de biosíntesis de *novo* de ácidos grasos (Prieto *et al.*, 2016; Blunt *et al.*, 2018). En esta vía se obtiene el (R)-3-hidroxiacil-ACP, el cual

es convertido en el sustrato de la sintasa por la acción de una 3-hidroxiacil-ACP tioesterasa (*PhaG*), encargada de separar a la proteína acarreadora de acilos (ACP) del (R)-3-hidroxiacil, este es activado por la ligación de un CoA (proveniente de una molécula de acetil-CoA) mediado por la (R)-3- hidroxiacilo-CoA ligasa, que se encuentra codificada en especies de *Pseudomonas* (Hokamura *et al.*, 2015) (Fig. 2). En contraste, *A. vinelandii* no presenta los genes que codifican estas enzimas, por ende, no puede sintetizar PHAs por esta vía.

2.3 Efecto de las condiciones de cultivo sobre la síntesis de PHAs

2.3.1 Efecto del oxígeno disuelto (TOD) y la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) sobre la síntesis de los PHAs.

La tensión de oxígeno disuelto (% TOD) es un parámetro que influye sobre el crecimiento celular y la síntesis del polímero. Se ha reportado que, en cepas de *A. vinelandii* la síntesis de P(3HB) se ve favorecida en valores cercanos a 1 %, mientras que, valores cercanos a 10 % favorecen el crecimiento celular (García *et al.*, 2014). Asimismo, se ha reportado que, la TOD crítica es de 4 % de saturación, valores < 4 % se denominan condiciones de limitación de oxígeno, donde se favorece la síntesis del homopolímero (Lozano *et al.*, 2011).

En limitación de oxígeno, hay un incremento en los niveles intracelulares de NADPH y NADH, vinculados con la represión de enzimas de la vía de los ácidos tricarbónicos como la citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa y en la degradación de P(3HB) como la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, por lo cual el acetil-CoA no entra en la vía de los ácidos tricarbónicos, disminuyendo así el flujo de carbono a través de esta vía, y una disminución en la degradación de P(3HB). Mientras tanto, la actividad de las enzimas β -cetotiolasa y acetoacetil-CoA reductasa aumenta, favoreciendo el flujo de acetil-CoA a la vía de biosíntesis de P(3HB) (Senior *et al.*, 1972; Anderson & Dawes, 1990). Bajo esta condición de limitación se dificulta el monitoreo de la TOD, por lo cual, se ha empleado la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), como parámetro para monitorear la disponibilidad de oxígeno durante el cultivo.

Por otra parte, se ha evidenciado que el oxígeno tiene un efecto sobre la producción y el peso molecular de los polímeros de PHAs (Blunt *et al.*, 2018). Peña *et al.*, (2014) observaron que, al emplear la cepa mutante OPN de *A. vinelandii*, (la cual presenta una

mutación en el sistema Pts, específicamente en el gen *ptsN*, que codifica la enzima IIA^{Ntr}; lo que incrementa la acumulación de P(3HB) (Noguez *et al.*, 2008) en cultivos en condiciones de baja transferencia de oxígeno ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), se obtiene P(3HB) de alto peso molecular ($3,670 \pm 270 \text{ kDa}$); mientras que, en una condición de mayor transferencia de oxígeno ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) el peso molecular es menor ($2,600 \pm 170 \text{ kDa}$). Asimismo, Myshkina *et al.*, (2008) reportaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa 7B de *A. chroococcum*, bajo una condición de aerofilia (agitación 200 rpm) se obtiene P(3HB) de un peso molecular de 1,480 kDa, pero en condiciones de microaerofilia (sin agitación) el peso molecular incrementa a 1,820 kDa; sin embargo, los autores no presentan desviaciones estándar o indican si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en las condiciones de cultivo evaluadas.

El oxígeno también tiene un efecto sobre la modulación de los copolímeros de PHAs (Blunt *et al.*, 2018). En modelos bacterianos como *Comamonas acidovorans* se ha reportado que, la VTO tiene un efecto negativo sobre la composición monomérica de los PHAs, ya que, al ser cultivada en matraces agitados y al aumentar el volumen de llenado de 50 a 300 mL, es decir disminuir la VTO, se incrementa el porcentaje mol de 4HB (de 18 a 50 %) en el copolímero de P(3HB)-co-4HB (Lee *et al.*, 2004). Asimismo, Cavalheiro *et al.*, (2012) reportaron que en cultivos en biorreactor suplementando los cultivo de *Cupriavidus necator* con oxígeno puro. Al disminuir la tensión de oxígeno disuelto de 20 a 2 %, se incrementa el porcentaje de 4HB de 11.4 % a 12.3 % en los copolímeros de P(3HB-co-4HB); sin embargo, es importante señalar que estos autores no indican si existen diferencias significativas entre los porcentajes de 4HB obtenidos, ni el número de experimentos realizados para obtener estos porcentajes.

En contraste con lo anteriormente mencionado, se ha evidenciado que en cultivos en biorreactor de la cepa OP de *A. vinelandii*, condiciones de $VTO_{\text{máx}}$ de $17.2 \pm 1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ permiten incrementar el porcentaje mol de 3HV ($34.95 \pm 6.6 \%$) en el copolímero de PHBV, comparado con una condición de $VTO_{\text{máx}}$ baja ($4.3 \pm 0.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) donde se obtiene una fracción mol de 3HV de $18.58 \pm 6.4 \%$. Lo que sugiere que la $VTO_{\text{máx}}$ tiene un efecto positivo sobre el contenido de 3HV incorporado en el copolímero de PHBV producido por esta cepa (Urtuvia *et al.*, 2020).

2.3.2 Efecto del precursor y su concentración sobre la síntesis de los PHAs.

Los PHAs son producidos a partir de un amplio rango de sustratos (aceites, azúcares, grasas, residuos agrícolas y subproductos industriales). En el caso de los copolímeros, su composición monomérica es dependiente de la fuente de carbono que se emplee (Loo & Sudesh, 2007; Anjum *et al.*, 2016). Estas a su vez se encuentran relacionadas estructuralmente con el monómero que se va a producir (Loo & Sudesh 2007).

En modelos bacterianos productores de PHBV como *Alcaligenes eutrophus* y *R. eutropha*, se ha reportado que, los ácidos grasos de cadena impar (ácido propiónico, valérico, heptanoico y nonanoico), el n-pentanol, y aminoácidos como valina, isoleucina y metionina son precursores para la síntesis de hidroxivaleril-CoA (Chung *et al.*, 1997; Loo & Sudesh 2007; Brigham *et al.*, 2012). En el caso de especies de *Azotobacter* diversos autores han demostrado que el tipo, concentración y tiempo de adición del precursor afectan el crecimiento celular, la producción y la composición monomérica de los copolímeros de PHAs (Page *et al.*, 1992; Pozo *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2008; Myshkina *et al.*, 2010; Bonartsev *et al.*, 2017)

En lo que se refiere al tipo y concentración del precursor, Page *et al.*, (1992) reportaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa UWD de *A. vinelandii*, la adición de valerato (en una concentración final de 10 mM), permite producir el máximo porcentaje de 3HV (16 %) en el copolímero de PHBV; mientras que, la adición de heptanoato (10 mM) generó un 5.3 % de 3HV. Precursores como 4-pentenoato, 1,4-butanediol y propionato no produjeron monómeros de 3HV. Asimismo, estos autores observaron que, en cultivos lote de la cepa UWD, al incrementar la concentración de valerato de 10 a 40 mM, incrementa el contenido de 3HV de 17 a 24 %; sin embargo, en concentraciones mayores (50 -100 mM) no se observa un incremento en la fracción molar de 3HV. Sin importar la concentración de valerato que se adiciona al medio de cultivo, se observa una disminución en el porcentaje de acumulación y la producción de biomasa. Un Comportamiento similar fue reportado por Pozo *et al.*, (2002), quienes observaron en cultivos en matraces agitados de la cepa H23 de *A. chroococcum* una disminución significativa en la producción de biomasa (6.21 ± 0.17 a 3.70 ± 0.21 gL⁻¹) y PHAs (5.21 ± 0.20 a 3.70 ± 0.30 gL⁻¹), cuando se incrementaba la concentración de valerato de 10 hasta 100 mM; mientras que, el porcentaje de 3HV incrementó de 12 a 25 % cuando la

concentración del precursor incremento a 50 mM. Sin embargo, en concentraciones mayores (>50 mM) no se observa un incremento en el contenido de 3HV.

Además de la concentración del precursor, otra variable de cultivo que se ha reportado que tiene un efecto en la composición monomérica es el tiempo de adición. Previamente, Page *et al.*, (1992) observaron que en cultivos en biorreactor de la cepa UWD, al adicionar el valerato (concentración final de 10 mM) en la zona más activa de biosíntesis de PHA (12 horas de cultivo) su velocidad de incorporación era de 3.1 mol% HV h⁻¹, obteniendo un 16 % de 3HV; mientras que, al adicionar el precursor después de la zona activa de biosíntesis de PHA, la velocidad de incorporación disminuía (1.5 mol% HV h⁻¹), al igual que el porcentaje mol de 3HV (12 %). Asimismo, Bonarsetv *et al.*, (2017) reportaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa 7B de *A. chroococcum* al adicionar valerato (20 mM) al inicio de cultivo, se obtiene una fracción molar de 3HV de 9.1 %; mientras que, al adicionar la misma concentración de valerato a las 12 horas de cultivo, incrementa la fracción molar de 3HV a 21.2 %.

2.4 *Azotobacter vinelandii* productora de PHAs

A. vinelandii es una bacteria Gram negativa, que habita en suelos y aguas frescas. Es móvil por flagelos peritricos y tiene la capacidad de fijar nitrógeno. Sus células son pleomórficas variando desde bacilos hasta células en forma de cocos (Espín, 2002). *A. vinelandii* produce dos polímeros: el alginato que es un polisacárido extracelular y el P(3HB). Se ha reportado que el porcentaje de acumulación de P(3HB) es de 80 % del peso seco de la célula (Galindo *et al.*, 2007; García *et al.*, 2014).

Previamente, se ha observado que *A. vinelandii* tiene la capacidad de producir copolímeros de cadena corta como el PHBV, a partir de la adición de precursores como ácidos grasos, alcoholes y alcanos (Page *et al.*, 1992). Esto se debe a la presencia del gen *PhaJ* que codifica para una enoil-CoA hidratasa R específica, que tiene la capacidad de adicionar una molécula de agua al doble enlace del enoil-CoA generando el R-3-hidroxiacil. Lo anterior permite la desviación de intermediarios provenientes de la vía de β -oxidación para la producción de monómeros de cadena corta (Setubal *et al.*, 2009; Kawashima *et al.*, 2012) (Fig 2).

Estudios previos con cepas de *A. vinelandii* han evidenciado el efecto del oxígeno, de la concentración y del tiempo de adición del precursor en la producción de copolímeros de PHBV. Page *et al.* (1992) reportaron que en cultivos en biorreactor de la cepa UWD, al incrementar la concentración del precursor (ácido valérico) de 10 a 40 mM, incrementa el porcentaje mol de 3HV de 17 al 40 % en el copolímero. Asimismo, en el mismo estudio se evidenció que al adicionar el ácido valérico en la fase de mayor producción de P(3HB) se obtiene 16 % mol de 3HV en la composición; mientras que, cuando el precursor se adiciona al inicio del cultivo, se obtiene 8.5 % mol de 3HV.

2.4.1 Cepa OPNA de *A. vinelandii*

La regulación de la síntesis de P(3HB) es un proceso complejo, ya que, sucede a diferentes niveles (Fig 3). Se ha establecido que sistemas de regulación como el Sistema de Dos Componentes GacS/GacA y el sistema PTS^{Ntr} controlan la expresión del operón *phbBAC*, constituyendo reguladores centrales en la síntesis de P(3HB) (Noguez *et al.*, 2008; Hernández-Eligio *et al.*, 2011).

Con el fin de optimizar la producción de este polímero se han diseñado cepas mutantes de *A. vinelandii*. Tal es el caso de la cepa OPNA, la cual es derivada de la cepa OP (mutante espontánea no productora de alginato). En la cepa OPNA se inactivaron los genes que codifican para las proteínas IIA^{Ntr} y RsmA que regulan negativamente la síntesis de PHB. La proteína IIA^{Ntr} (codificada por el gen *ptsP*) forma parte del sistema de fosfotransferasa relacionada con el nitrógeno. En su estado no fosforilado inhibe la expresión del operón de P(3HB) y la acumulación de este polímero (Noguez *et al.*, 2008). RsmA, es una proteína pequeña, del sistema de regulación global GacS/A-Rsm, Rsm controla expresión del operón *phbBAC* y *phbR*, mediante la unión a los RNAs mensajeros inhibiendo así su traducción (Hernández-Eligio *et al.*, 2011).

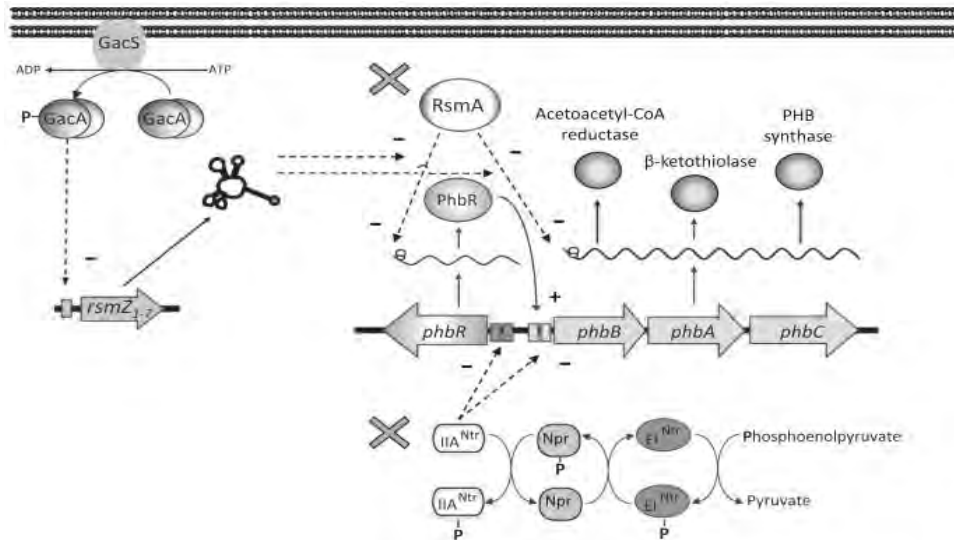


Figura 3. Modelo de regulación de la expresión de los genes *phbBAC* y *phbR* por los sistemas GacS/A-Rsm y Pts^{Ntr} en *A. vinelandii*. Obtenida de Peña *et al.*, (2004).

Se ha evaluado el efecto de las mutaciones presentes en esta cepa sobre la producción y acumulación de PHB. Ramírez (2011) evaluó en matraces agitados la producción de polímeros por cepas mutantes (OP, OPA, OPN y OPNA) de *A. vinelandii*, reportando que la cepa OPNA presentaba la mayor concentración de P(3HB) ($9.3 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$) y la mayor productividad ($0.46 \text{ gPHB/g sacarosa}$) comparada con las demás cepas mutantes. Indicando así que las mutaciones presentes en esta cepa tenían un efecto positivo sobre la síntesis del polímero.

Asimismo, se han realizado cultivos en biorreactor de esta cepa, donde se ha determinado que tiene la capacidad de sintetizar polímeros de alto peso molecular (6,500 kDa) y obtener concentraciones máximas de P(3HB) (27 g L^{-1}) cuando se emplean diferentes estrategias de fermentación (García, 2014; Castillo *et al.*, 2017; García *et al.*, 2019). Sin embargo, no se ha evaluado su capacidad de producir copolímeros de cadena corta mediante la adición de precursores.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, se ha incrementado el interés en la producción de copolímeros de PHAs, los cuales presentan diversas propiedades termomecánicas, estas a su vez se encuentran determinadas por los cambios en la composición monomérica de los copolímeros. Se sabe que los parámetros de cultivo influyen sobre la composición monomérica, adquiriendo relevancia a la hora de generar composiciones definidas y propiedades termomecánicas específicas. Por lo anterior, en el presente trabajo se propone estudiar, el efecto de las condiciones de cultivo (velocidad de transferencia de oxígeno, concentración y tiempo de adición de ácido valérico) sobre la respuesta metabólica y la composición monomérica de los copolímeros de PHBV producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

4. HIPÓTESIS

En cultivos de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, la fracción molar del 3HV del copolímero P(3HB)-co-3HV se incrementará debido a un aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno y en la concentración del ácido valérico; mientras que, el tiempo de adición del ácido valérico no tendrá un efecto.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la biosíntesis de copolímeros de cadena corta de polihidroxialcanoatos, empleando la cepa OPNA de *A. vinelandii*, bajo diferentes condiciones de cultivo (velocidad de transferencia de oxígeno, concentración y tiempo de adición del ácido valérico).

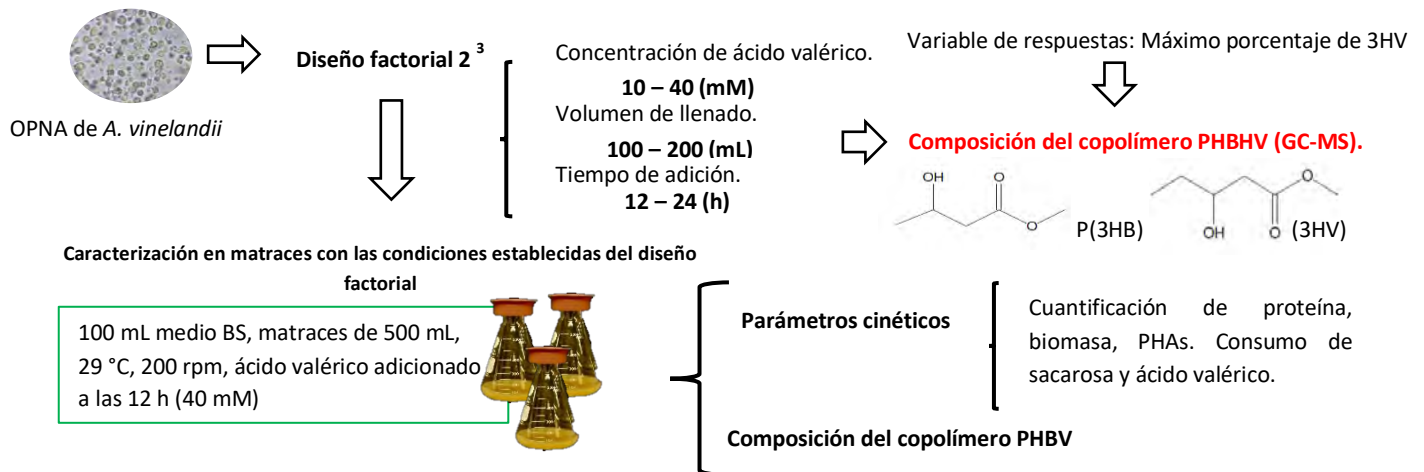
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de las condiciones de cultivo (velocidad de transferencia de oxígeno, concentración y tiempo de adición del ácido valérico) sobre el crecimiento, producción y composición del copolímero PHBV de la cepa OPNA de *A. vinelandii* en matraces agitados.
- Determinar el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el crecimiento, la producción y la composición del copolímero de PHBV de la cepa OPNA de *A. vinelandii* en cultivos en lote en biorreactores de 3L.
- Analizar el peso molecular de los diferentes copolímeros de PHAs generados y determinar su relación con la composición monomérica.

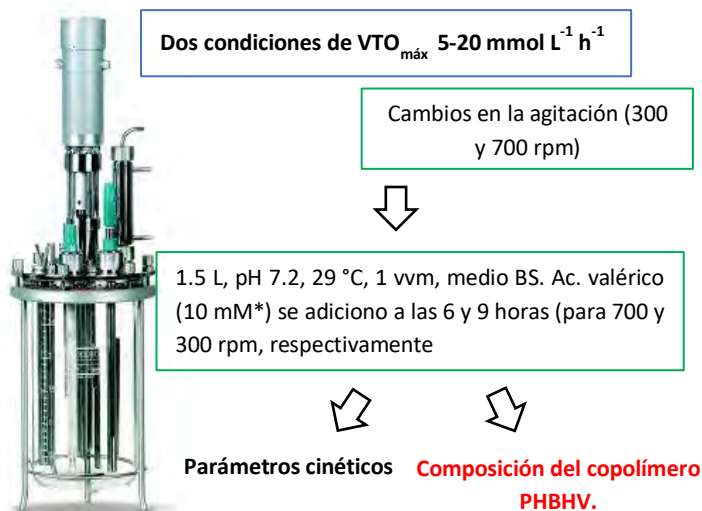
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 4 se presenta un diagrama de la estrategia experimental llevada a cabo durante el desarrollo de este proyecto.

1. Selección de condiciones de cultivo y caracterización en matraces



2. Evaluación del efecto de la $VTO_{m\acute{a}x}$ en cultivos en lote



3. Relación del peso molecular y la composición monomérica.

Evolución del peso molecular con respecto a la composición monomérica de los copolímeros de PHBV.

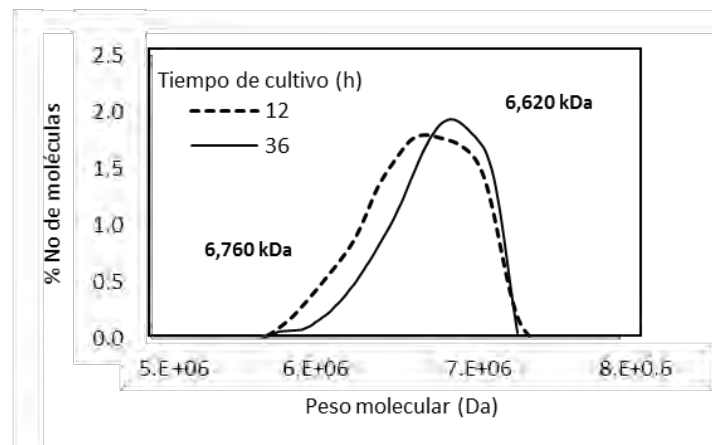


Figura 4. Estrategia experimental propuesta.

Durante la primera fase, se realizó un estudio exploratorio para determinar las condiciones de cultivo, que permitieran obtener la mayor fracción molar de 3HV en los copolímeros producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Para ello se realizó un diseño factorial 2^3 donde se evaluaron tres factores a dos niveles: velocidad de transferencia de oxígeno (a

través de cambios en el volumen de llenado), concentración y tiempo de adición del ácido valérico. Previamente, se ha reportado que estos factores tienen un efecto sobre la composición monomérica de copolímeros de PHAs producidos por especies de *Azotobacter* (Page *et al.*, 1992; Pozo *et al.*, 2002; Bonarsetv *et al.*, 2017; Urtuvia *et al.*, 2020).

Para el caso de los niveles, estos fueron definidos en base a lo reportado en la literatura. En cuanto a la concentración de ácido valérico se evaluaron 10 y 40 mM, ya que, se ha observado que en concentraciones mayores del precursor no hay un incremento en la fracción molar de 3HV (Page *et al.*, 1992; Pozo *et al.*, 2002). En el caso del tiempo de adición del precursor, se evaluó 12 y 24 horas (correspondientes a la fase activa y la fase tardía de biosíntesis de P(3HB), respectivamente), en las cuales se han observado cambios en el máximo porcentaje de 3HV (Page *et al.*, 1992). Por último, se modificó el volumen de llenado, para tener dos condiciones de velocidad de transferencia máxima ($VTO_{\text{máx}}$) $5.87 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (100 mL) y $2.91 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (200 ml), ya que, se han observado cambios significativos en la composición monomérica de los copolímeros producidos bajo diferentes $VTO_{\text{máx}}$ (Lee *et al.*, 2004; Urtuvia *et al.*, 2020). Posteriormente, a partir de las condiciones definidas en el diseño factorial, se caracterizó el crecimiento y la producción de copolímeros en cultivos en matraces de la cepa OPNA.

Con el fin de establecer el efecto del oxígeno sobre el crecimiento, la producción y la composición del copolímero PHBV producido por la cepa OPNA de *A. vinelandii*; en la segunda fase del proceso se realizaron cultivos en lote en biorreactores de 3 L. Se evaluaron dos condiciones de $VTO_{\text{máx}}$: $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (que corresponde a una $VTO_{\text{máx}}$ similar a la observada en los cultivos en matraces agitados) y $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (que se estableció a partir de lo reportado por Urtuvia *et al.* (2020) quienes observaron que, en una $VTO_{\text{máx}}$ de $17.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se obtiene el máximo porcentaje de 3HV), para ello se modificó la velocidad de agitación a 300 y 700 rpm, respectivamente. Es importante resaltar que la concentración de ácido valérico empleada en los cultivos en biorreactor disminuyó de 40 a 10 mM debido al efecto negativo de este en el crecimiento y producción de PHAs (observado en matraces agitados).

Finalmente, en la tercera fase se determinó si existía una relación entre el peso molecular y la composición monomérica de los copolímeros producidos durante las fases 1 y 2 del proyecto.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepa

La cepa que se empleó en el estudio fue proporcionada por el laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín (IBT)

- *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 P(3HB) (Hernández- Eligio *et al.*, 2011).

7.2 Preservación de la cepa

La cepa se preserva en medio Burk-sacarosa líquido y glicerol al 80 % a -20 °C.

7.3 Medio de cultivo

Se utilizó el medio Burk-sacarosa para la reactivación de la cepa en caja de Petri y para realizar las cinéticas de crecimiento. Cabe resaltar que, en las cinéticas en matraces se reemplazó la fuente orgánica de nitrógeno (extracto de levadura) por una fuente inorgánica (sulfato de amonio) empleando 1.4 g L⁻¹, además con el propósito de mantener constante el pH, se incrementó la concentración de MOPS a 31 g L⁻¹ (Tabla. 2).

En los cultivos en biorreactor se empleó como fuente de nitrógeno el extracto de levadura, y se realizó el control de pH mediante la adición automática de NaOH, por lo cual se omitió el uso de MOPS.

Tabla 2. Composición del medio Burk-sacarosa

Reactivo	Concentración en g L ⁻¹
Sacarosa	20
Extracto de levadura	6.5
MOPS	31
K ₂ HPO ₄	0.66
KH ₂ PO ₄	0.16
CaSO ₄	0.05
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.2
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.0029
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.027

7.4 Preparación del inóculo

7.4.1 Pre- inóculo

Se reactivaron cajas de la cepa OPNA de *A. vinelandii* a 29 °C durante 48 a 60 horas en medio Burk-sacarosa suplementado con kanamicina y espectinomycinina.

7.5 Cultivos en matraces agitados

La cepa OPNA se cultivó en matraces agitados de 500 ml con 100 ml de medio de Burk a 200 rpm y 29 °C durante 20-24 horas. El inóculo se utilizó cuando alcanzó una densidad óptica entre 0.16 - 0.18 determinada a 540 nm (correspondiente a una biomasa en peso seco entre 0.08 a 0.1 g L⁻¹) (García, 2014; Millán, 2017). Se realizó un diseño factorial 2³ para evaluar la influencia de las condiciones de cultivo sobre la composición monomérica de los copolímeros producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii* en cultivos en matraces agitados de 500 mL. Los tres factores: la VTO, concentración y tiempo de adición de ácido valérico, se eligieron basado en lo reportado previamente en la literatura para la producción de copolímeros por bacterias (Page *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2004). se probaron en un valor bajo y alto representado por los niveles (+1) y (-1), respectivamente (Tabla 3).

La VTO_{máx} se modificó mediante cambios en el volumen de llenado (100 y 200 mL) y se calculó a partir de la ecuación 1, siendo de 8 y 2.9 mmol L⁻¹ h⁻¹ para 100 y 200 mL, respectivamente. El ácido valérico no se neutralizó antes de ser agregado y se probaron dos concentraciones finales (10 y 40 mM) y dos tiempos de adición, las 12 y 24 h (que corresponde a la fase durante y después de la biosíntesis activa de PHB, respectivamente). La variable de respuesta fue el máximo porcentaje de 3HV presente en el copolímero a las 48 h de cultivo. Se realizaron un total de ocho experimentos, todos ellos por triplicado. El análisis estadístico para el diseño factorial (análisis de varianza (ANOVA), se realizó en el software Statgraphics versión 18.1.12. El valor de p se estableció en 0.05.

Tabla 3. Factores y niveles utilizados en el diseño experimental 2³. Para el factor volumen de llenado se calculó la VTO_{máx} siendo de 5.8 y 2.9 mmol L⁻¹ h⁻¹ para 100 y 200 mL, respectivamente.

Factores	Niveles	
	(-)	(+)
Concentración de ácido valérico (mM)	10	40
Volumen de llenado (mL)	100	200
Tiempo de adición del ácido valérico (h)	12	24

Una vez seleccionada la combinación en la que se obtenía el mayor porcentaje de 3HV, se caracterizó el comportamiento cinético de la cepa en matraces agitados de 500 mL. Cada 12 h se sacrificó un matraz a para realizar mediciones analíticas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.6 Cultivos en Biorreactor

El inóculo se preparó en matraces de 500 mL, conteniendo 100 mL de medio Burk-sacarosa. Los matraces fueron inoculados con dos asadas de las células previamente crecidas y se incubaron a 29 °C a 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente, el inóculo se utilizó cuando alcanzó una densidad óptica entre 0.16 – 0.18 determinada a 540 nm (correspondiente a una biomasa en peso seco entre 0.08 a 0.1 g L⁻¹) (García, 2014; Millán, 2017).

Los cultivos en lote se realizaron en un biorreactor de Applikon de 3 L, con un volumen de trabajo de 1.5 L, equipado con dos turbinas Rushton (D_i/D_t: 0.35 cm) de seis paletas planas y un difusor de aire de 7 orificios. El pH se controló a 7.2 mediante la adición automática de NaOH (5N). La espuma se controló mediante la adición manual de antiespumante (silicona) al 10 % p/v. La tensión de oxígeno disuelto se determinó mediante un electrodo polarográfico de oxígeno y no fue controlada. Los cultivos se realizaron por duplicado a 29 °C empleado una velocidad de agitación constante de 300 y 700 rpm.

8. MÉTODOS ANALÍTICOS

8.1 Determinación de biomasa por peso seco

Se determinó la concentración de biomasa mediante el método gravimétrico de peso seco. Se tomaron 5 mL de caldo de cultivo, se centrifugaron $9,660 \times g$ durante 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, recuperando la pastilla celular en tubos Eppendorf previamente tarados. Los tubos se secaron en horno durante 24 horas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, luego se colocaron en un desecador durante 1.5 horas. Finalmente, se pesaron y por diferencia de peso se obtuvo la cantidad de biomasa, expresada en g L^{-1} (García, 2014).

8.2 Determinación de proteína

La concentración de proteína total en la biomasa se determinó mediante el método colorimétrico de Lowry, usando albumina bovina como estándar. La adición del reactivo de Folin, incrementa la aparición de color azul, cuya densidad óptica es medida a 625 nm, es proporcional a la concentración de proteína presente (Lowry *et al.*, 1951).

Soluciones: **A)** Na_2CO_3 2 % en NaOH 0.1 N; **B)** Tartrato de Na y K 2 %; **C)** CuSO_4 1 %

Solución reactiva: Se preparó mezclando 1 mL de solución B, 1 mL de solución C y 98 mL de solución A.

El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1 mL de la muestra de caldo de cultivo y se centrifugó a $9,660 \times g$ durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en agua (aplicando una dilución conforme a la cantidad de muestra). Después, se tomaron 200 μL de la muestra y se adicionó 1 mL de la solución reactiva. Se agitó en vortex y se dejó reposar durante 10 minutos. Luego, se adicionaron 100 μL del reactivo de Folin y se agitó en vortex, se dejó reposar en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 2 minutos, con el fin de evitar interferencias de sólidos disueltos de los polímeros en la medición. Se determinó la absorbancia a 625 nm contra un blanco (mezcla de reactivos y agua destilada). Se realizó una curva patrón (Fig. 4) utilizando albúmina bovina, en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g L^{-1}

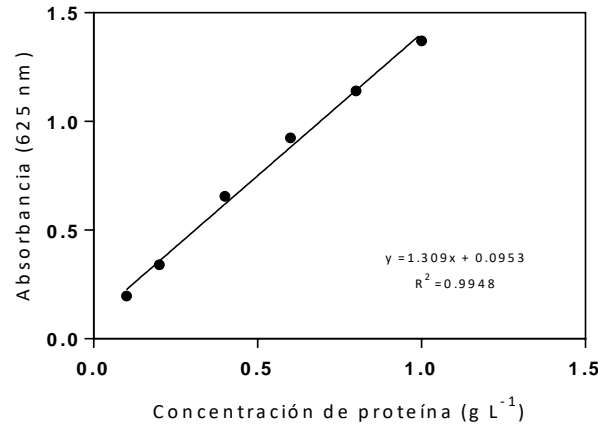


Figura 5. Curva estándar de proteína empleada para la cuantificación de proteína

Finalmente, para realizar la cuantificación, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína (g L}^{-1}\text{)} = \left(\frac{\text{Absorbancia} - 0.0953}{1.309} \right) * \text{Dilución}$$

8.3 Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos en el caldo de cultivo

La determinación de sacarosa se realizó mediante la cuantificación de los productos de hidrólisis (glucosa y fructosa), para ello se construyó una curva patrón (1-20 mg mL⁻¹) de sacarosa hidrolizada con la enzima β -fructofuranosidasa (Sigma-Aldrich). El ácido valérico se determinó mediante HPLC. Las muestras se analizaron empleando la columna Aminex HPX- 87H (Biorad), los detectores IR/PDA y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil, a un flujo de 0.65 mL min⁻¹ y 50 °C. Se construyó una curva patrón de ácido valérico (0.4 – 4 g L⁻¹), con el fin de extrapolar los valores obtenidos.

Se tomó 1 mL del caldo de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 9,660 x g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Por otra parte, se preparó una solución enzimática pesando 2.5 mg de la enzima β -fructofuranosidasa y disolviéndolos en 1 mL de Buffer citratos (0.35 M, pH 4.6). Se mezcló 900 μ L del sobrenadante recuperado con 100 μ L de la solución enzimática y luego se inyectaron 40 μ L de la muestra al HPLC.

8.4 Cuantificación de PHAs

La cuantificación de P(3HB) se llevó a cabo mediante la conversión a ácido crotonico (producto de la hidrólisis de PHAs) por la adición de H₂SO₄ concentrado. Las muestras se analizaron por HPLC con un detector de UV (220 nm) y una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Biorad). La elución se realizó con H₂SO₄ (5 mM) a un flujo de 0.65 mL min⁻¹ y 50 °C (García, 2014). Se construyó una curva patrón con P(3HB) comercial, con el fin de extrapolar los valores obtenidos.

Se tomaron entre 3 a 5 mg de biomasa seca y se adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se incubó a 90 °C durante 1 hora. Posteriormente, se dejaron enfriar para realizar una dilución 1/50 con agua Mili Q y se inyectaron 20 µL de la muestra al HPLC. El área bajo la curva en el cromatograma permite cuantificar la concentración de P(3HB) (Castillo *et al.*, 2013). A partir, de la siguiente ecuación obtenida de soluciones de P(3HB) comercial a concentraciones conocidas entre 0.01 -0.1 mg mL⁻¹

$$\text{PHAs (\%)} = \left(\frac{\frac{\text{Area bajo la curva} + 103172,04}{149332232,67}}{\text{Biomasa utilizada}} \times \text{Dilución} \right) \times 100$$

8.5 Peso molecular de los polímeros de PHAs

La distribución de pesos moleculares de los PHAs se estimó mediante cromatografía de permeación en gel, usando una columna Shodex GPC K-806M, la cual permite analizar muestras con pesos moleculares en rango entre 1,000 a 20,000 kDa, conectada en un sistema de HPLC (Peña *et al.*, 2014; Millán, 2017). La fase móvil es cloroformo a 30 °C a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La curva de calibración se construyó usando estándares de poliestireno de masa molecular de 2.9 x10³ – 1.0 x 10⁷ Da. Las muestras de los polímeros se filtraron empleando membranas de 0.45 µm tamaño de poro, para remover impurezas celulares, antes de ser inyectadas con un volumen de 50 µL en el HPLC (Millán *et al.*, 2016).

8.6 Determinación de la composición de los copolímeros de PHAs

Para determinar la composición monomérica de los copolímeros, las muestras se derivatizaron siguiendo el protocolo propuesto por Juengert *et al.*, (2018) con el fin de convertir los monómeros en metil-ésteres. Para lo cual, se tomaron aproximadamente 10 mg de biomasa seca y se sometieron a un proceso de metanólisis ácida, que consiste en: Adicionar 1 mL de ácido sulfúrico al 15 %, agitar en vortex durante 3 segundos, luego se incubó durante 2 h y 30 minutos a 100 °C. Una vez transcurrido el tiempo se dejan enfriar durante 5 minutos, luego se agrega 1 mL de cloroformo con 0.2 % de metil benzoato (como estándar interno). Se agitan en vortex por 30 segundos, luego de que se generen dos fases, se toma muestra de la fase orgánica para inyectar 1 µL. en el cromatógrafo de gases. El cromatógrafo se encuentra equipado con una columna capilar HP-5MS (Agilent Technologies 30m x 0.25mm x 0.25µm) y acoplado a masas (Agilent Technologies, U.S.A). Se utilizaron curvas de calibración de los estándares del metil 3-hidroxibutirato y del metilvalerato.

8.7 Estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno

En los cultivos en matraces agitados, la velocidad máxima de transferencia de oxígeno ($VTO_{m\acute{a}x}$) se calculó a partir de la correlación para determinar la máxima transferencia de oxígeno en matraces agitados propuesta por Maier y Büchs (2001), con las constantes de proporcionalidad propuestas en el trabajo de Gómez (2015).

$$VTO_{m\acute{a}x} = \frac{1}{6} (n^{0.84} V_L^{-0.84} d_0^{0.27} d^{-1.25} - 5) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde n es la frecuencia de agitación (min), V_L es el volumen de llenado (mL), d_0 es el diámetro de agitación (cm) y d es el diámetro máximo del matraz (cm), esto es únicamente válido en diámetros de agitación hasta de 2.50 cm.

Para los cultivos en biorreactor, la medición del O_2 y el CO_2 se realizó a la salida del reactor utilizando analizadores de gases (BlueSens, BCP- O_2 regular y BCP- CO_2 regular). La VTO se estimó a partir del análisis en línea del nivel de oxígeno gaseoso a la salida del biorreactor, utilizando la ecuación propuesta por Zeng *et al.*, (1994):

$$VTO = \frac{V_G}{V_L V_N} (X_{in} - X_{out}) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde V_G es el flujo de gas a la entrada ($L h^{-1}$), V_L el volumen de trabajo (L), V_N el volumen molar ($L mol^{-1}$), X_{in} y X_{out} la fracción mol de oxígeno en la entrada y salida respectivamente.

8.8 Cálculo de los parámetros cinéticos

La cinética de crecimiento de *A. vinelandii* fue descrita a partir del ajuste del modelo logístico, reportado por Klimek & Ollis (1980) para fermentaciones de exopolisacáridos microbianos. Fue calculada basada en biomasa y proteína.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

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

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{m\acute{a}x}}\right)(1 - e^{\mu t})} \quad (\text{Ec. 4})$$

Linealizando la ecuación y graficando contra tiempo se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ) representada por la pendiente del gráfico (García, 2014).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1

CULTIVOS EN MATRACES AGITADOS

9.1 Efecto de los factores de cultivo sobre la composición monomérica de los copolímeros producidos por la cepa OPNA.

Se evaluó el efecto de tres factores de cultivo (concentración del precursor, la VTO mediante el volumen de llenado y el tiempo de adición) sobre la composición monomérica de los copolímeros producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii* en matraces agitados. En la tabla 4 se observan las composiciones en porcentaje mol de los copolímeros obtenidos a las 48 horas de cultivo. El máximo porcentaje mol de 3HV (28 ± 2.3) se obtuvo en la corrida número 3, al adicionar el precursor en una concentración final de 40 mM, a las 12 horas de cultivo y empleando un volumen de llenado de 100 mL (es decir una condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ de $5.8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Tabla 4. Valores de la variable de respuesta del diseño factorial 2^3 para cada una de las combinaciones evaluadas por triplicado. Donde A: concentración del precursor, B: tiempo de adición y C: volumen de llenado hacen referencia a los factores evaluados. La $VTO_{m\acute{a}c}$ se calculó para 100 ml ($5.87 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y para 200 ml ($2.91 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Corridas n°	Variables			Respuesta	
	A	B	C	% PHB	% 3HV
1	10	12	100	88.3 ± 0.6	11.7 ± 0.6
2	10	24	100	83.2 ± 1.2	16.8 ± 1.2
3	40	12	100	72.0 ± 2.3	28.0 ± 2.3
4	40	24	100	79.0 ± 2.0	22.6 ± 2.1
5	10	12	200	88.7 ± 1.1	11.3 ± 1.1
6	10	24	200	92.9 ± 4.3	7.1 ± 4.3
7	40	12	200	95.5 ± 1.0	1.1 ± 0.4
8	40	24	200	98.6 ± 0.2	1.4 ± 0.2

Previamente se ha reportado que, la adición de ácido valérico a las 12 horas de cultivo (concentración final de 40 mM) permite obtener un copolímero de P(3HB-co-3HV) con 24 % mol de 3HV a las 22 horas de cultivo en matraces agitados empleando la cepa de *A. vinelandii* UWD (Page *et al.*, 1992). Asimismo, Myshkina *et al.* (2010) observaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa 7B de *A. chroococcum*, la adición del ácido valérico a las 10 horas de cultivo (concentración final de 20 mM) permitió obtener un

copolímero de P(3HB-co-3HV) con 22.6 % mol de 3HV a las 48 horas de cultivo. Igualmente, Urtuvia *et al.* (2020) reportaron que, en cultivos en matraces de la cepa OP de *A. vinelandii*, la adición de ácido valérico (10 mM) permite obtener un copolímero de PHBV con un porcentaje mol de 27.36 ± 2.78 % a las 46 horas después de la adición. Lo anterior indica que, el porcentaje de 3HV (28.0 ± 2.3) obtenido en nuestro estudio, se encuentra dentro del rango de porcentajes de 3HV reportado para estudios en matraces agitados empleando cepas de especies de *Azotobacter*.

Para determinar el efecto de cada factor (volumen de llenado, tiempo de edición y concentración del ácido valérico) sobre el porcentaje mol de 3HV, se realizó un análisis pareado con un nivel de significancia de 0.05. En cuanto al tiempo de adición del ácido valérico, no se observó un efecto significativo sobre el porcentaje mol de 3HV, bajo las condiciones evaluadas. Esto es contrario a lo que se observaron previamente Bonarsetv *et al.* (2017), quienes reportaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa 7B de *A. chroococcum* el tiempo de adición del valerato (20 mM) tiene un efecto sobre la fracción molar de 3HV. Obteniéndose una mayor fracción cuando se adiciona el precursor a las 12 horas cultivo (21.2 %) en comparación a lo obtenido, si se adiciona al inicio del cultivo (9.1 %).

Con respecto a la concentración del ácido valérico, se observa que en las corridas en las que se empleó 100 mL de volumen de llenado, un incremento en la concentración del precursor (de 10 a 40 mM), incrementó significativamente el contenido de 3HV (corridas 1 y 3; 2 y 4) independientemente del tiempo de adición; mientras que, en las corridas donde se empleó un volumen de llenado de 200 mL, el incremento en la concentración del precursor afecta de manera significativa negativa el contenido máximo de 3HV (corridas 5 y 7; 6 y 8). Esto posiblemente se encuentre relacionado con: 1) el incremento en el volumen de llenado disminuye de la velocidad de transferencia máxima ($VTO_{m\acute{a}x}$), lo que genera cambios en la disponibilidad de oxígeno en los matraces y, por lo tanto, cambios en el metabolismo (Büchs, 2001). Adicionalmente, se ha observado que en cultivos en matraces agitados de la cepa OP de *A. vinelandii*, una disminución de la $VTO_{m\acute{a}x}$ afecta negativamente la velocidad de crecimiento y la producción de P(3HB) (Peña *et al.*, 2014); y 2) independientemente de la concentración del ácido valérico, este tiene un efecto negativo sobre crecimiento y producción de PHAs (Page *et al.*, 1992); por

lo cual, es posible que la respuesta observada se deba a un efecto combinado de la disminución de la $VTO_{\text{máx}}$ y el incremento en la concentración del precursor.

En cuanto al efecto del volumen de llenado se observa que, en las corridas donde se tiene 200 mL, el porcentaje mol de 3HV es significativamente menor (excepto en la corrida 5), comparado con lo obtenido a 100 mL. Como se mencionó anteriormente, los cambios en el volumen de llenado de los matraces agitados influyen sobre la $VTO_{\text{máx}}$, y, por ende, en la disponibilidad de oxígeno en el líquido (Peña *et al.*, 2014). En este trabajo, los valores de $VTO_{\text{máx}}$ calculados fueron de $5.87 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $2.91 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para 100 y 200 ml, respectivamente. Teniendo en cuenta los resultados, lo anterior sugiere que a mayores $VTO_{\text{máx}}$, hay una mayor fracción molar de 3HV.

Para el análisis estadístico del diseño factorial se realizó una ANOVA considerando una significancia de 0.05. Es importante señalar que el volumen de llenado es el único factor que tiene un efecto significativo sobre la modulación de la composición monomérica (Ec. 5). Lo cual nos indica que la $VTO_{\text{máx}}$ tienen un efecto sobre la composición monomérica del copolímero de PHBV.

$$\% \text{ 3HV} = 12.5083 + 0.775 * \text{Concentración precursor} - 7.26667 * \text{Volumen de llenado} - 0.508333 * \text{Tiempo de adición. Ec. (5)}$$

Previamente, se ha evidenciado en otros modelos bacterianos que el incremento en la VTO tiene un efecto negativo sobre la composición monomérica de los PHAs producidos. Tal es el caso de *Comamonas acidovorans* que, al ser cultivada en matraces agitados, se reportó que, al aumentar el volumen de llenado de 50 a 300 mL, incrementa el porcentaje mol de 4HB del 18 al 50 % en el copolímero de PHB-co4HB (Lee *et al.*, 2004).

En el caso de *A. vinelandii*, la influencia de la VTO sobre la composición monomérica parece depender de la cepa y las condiciones de cultivo empleadas. Ryu *et al.*, (2008) no observaron un efecto de la $VTO_{\text{máx}}$ sobre la composición monomérica de PHBV producido por la cepa UWD en cultivo en matraces agitados. Este estudio se realizó en dos volúmenes de llenado (50 y 100 mL en matraces agitados de 250 ml), en ambas condiciones el contenido de 3HV fue de 4.1 ± 0.4 y de $4.3 \pm 0.8\%$, respectivamente. Por el contrario, Urtuvia *et al.*, (2020) se ha reportado que, en cultivos en biorreactor de la

cepa OP de *A. vinelandii* al aumentar la VTO ($4.3 \pm 0.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $17.2 \pm 1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) incrementando la velocidad de agitación (de 300 a 600 rpm), el porcentaje mol de 3HV aumenta de 18.58 ± 6.4 a $34.95 \pm 6.6 \%$ en el copolímero de PHBV (Urtuvia *et al.*, 2020). Esto concuerda con lo obtenido en nuestros resultados, ya que, al incrementar la VTO incrementa el porcentaje mol de 3HV en todas las condiciones evaluadas.

Este fenómeno podría deberse a que la β -oxidación es un proceso oxidativo que requiere energía y FAD y NAD^+ como aceptores de electrones (Blunt *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que las relaciones $[\text{acetil-CoA}] / [\text{CoA}]$ y $[\text{NADH}] / [\text{NAD}]$ controlan la oxidación de los ácidos grasos (Ren *et al.*, 2009), dado que, a bajas concentraciones de oxígeno, se incrementa la relación $[\text{NADH}] / [\text{NAD}]$, debido a una disminución del flujo de la cadena respiratoria. La disponibilidad de $[\text{NAD}]$ disminuye, afectando la vía de β -oxidación (Senior *et al.*, 1972; Jackson & Dawes, 1976; Ren *et al.*, 2009). Asimismo, bajo esta condición de bajo oxígeno, hay una disminución en la relación $[\text{ATP}] / [\text{ADP}]$, lo que afecta la disponibilidad de energía para la oxidación de los ácidos grasos; mientras que, en una concentración más alta de oxígeno, la relación de $[\text{NADH}] / [\text{NAD}]$ disminuye, aumentando la relación $[\text{ATP}] / [\text{ADP}]$, lo cual estimula la vía de β -oxidación de los ácidos grasos (Ren *et al.*, 2009; García *et al.*, 2018).

9.2 Cultivos en matraces agitados de la cepa OPNA

Considerando que la máxima fracción molar de 3HV se obtuvo al adicionar 40 mM de ácido valérico agregado a las 12 horas de cultivo y a 100 mL de volumen de llenado (es decir, una $\text{VTO}_{\text{máx}}$ calculada de $5.87 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (corrida 3, Tabla 4). Se evaluó el efecto de estas condiciones de cultivo sobre el crecimiento celular, la producción y acumulación de PHBV. Para ello se realizaron cinéticas en matraces agitados de 500 mL con 100 mL de medio Burk-sacarosa a $29 \text{ }^\circ\text{C}$ y a 200 rpm de la cepa OPNA con y sin la adición del precursor (ácido valérico). Para los análisis estadísticos se utilizó una prueba t pareada con un nivel de significancia de $p \text{ valor} \leq 0.05$, todos los análisis se realizaron en el programa Minitab 17. Se estimó, la velocidad específica de crecimiento a partir de los datos de proteína, ya que, ha sido reportado que el método gravimétrico no permite diferenciar entre los cambios en la población celular y la acumulación de PHAs (García, 2014).

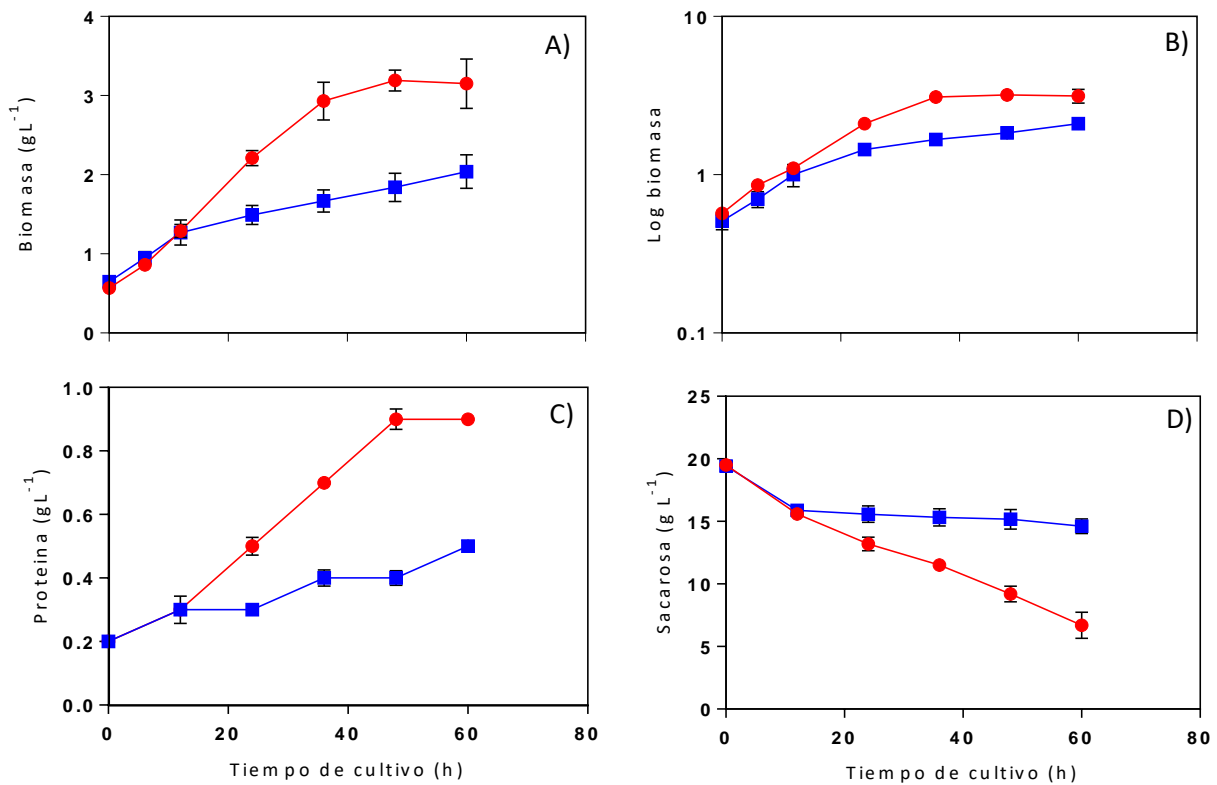


Figura 6. Efecto de la adición del ácido valérico (precursor) en el crecimiento bacteriano. a) y b) Cinéticas de crecimiento con base en biomasa, c) proteína y d) concentración de sacarosa en g L⁻¹ en cultivos en matraces agitados en medio Burk-sacarosa de las cepa OPNA sin adición (●) y con adición del precursor (■) de *A. vinelandii*. La adición del precursor en una concentración de 40 mM se llevó a cabo a las 12 horas de cultivo.

Como se observa en la figura 6a y b, la máxima producción de biomasa (en peso seco) se alcanzó en la condición control (3.20 ± 0.13 g L⁻¹) a las 48 horas de cultivo, donde se presentó un crecimiento con una tendencia exponencial hasta las 36 horas, mientras que, en los cultivos donde se adiciona el ácido valérico, el crecimiento tiene una tendencia similar al control hasta las doce horas; sin embargo, después de la adición del ácido valérico se observa un tendencia lineal. La máxima concentración de biomasa fue de 2.10 ± 0.10 g L⁻¹ obtenida a las 60 horas de cultivo. Por otra parte, se obtuvo una máxima producción de proteína para el control de 0.92 ± 0.01 g L⁻¹; mientras que, para la condición en la que se añade el precursor fue de 0.50 ± 0.02 g L⁻¹ a las 60 horas de cultivo (Fig. 6c). En el caso de los cultivos donde se adicionó el precursor la concentración de proteína fue similar al control hasta las 12 horas; sin embargo, después de este tiempo hubo una reducción en el crecimiento. Es importante resaltar que el crecimiento fue significativamente mayor en los cultivos control (p valor ≤ 0.05). Lo anterior sugiere que,

la adición del ácido valérico tiene un efecto negativo sobre la producción de biomasa y proteína

La velocidad específica de crecimiento (μ) (con respecto a proteína) para los cultivos control fue de $0.047 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$, mientras que para los cultivos en los que se adicionó el precursor se obtuvo una velocidad de $0.043 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$ (previo a la adición del ácido valérico), después de la adición la velocidad disminuyó significativamente hasta $0.009 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$. Estudios previos en cultivos en matraces agitados de la cepa OPNA empleando el medio Burk-sacarosa, reportan una velocidad de crecimiento de 0.076 h^{-1} (García *et al.*, 2014). Esto difiere de lo obtenido en este estudio. Sin embargo, es posible que la diferencias se deban a que en este trabajo se sustituyó la fuente de nitrógeno orgánica (extracto de levadura) por una inorgánica (sulfato de amonio) y se incrementó la concentración de MOPS para mitigar la caída de pH ocasionada por la adición del ácido valérico.

Previamente se ha reportado, que en cepas de *A. vinelandii* productoras de alginato, al emplearse extracto de levadura como fuente de nitrógeno, se incrementa la producción de biomasa y del polisacárido, comparada cuando se adiciona sulfato de amonio (Tinoco, 1993). Asimismo, en cepas de *A. vinelandii* no productoras de alginato la adición del extracto levadura incrementa el crecimiento, la producción y acumulación de P(3HB) (Ryu *et al.*, 2008), debido a que la adición de fuentes complejas como el extracto no solo proporciona nitrógeno, también contiene minerales y vitaminas que se emplean como factores para el crecimiento (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2011).

Asimismo, es posible que el incremento en la concentración utilizada de MOPS (0.15 M) pudiera tener un efecto negativo sobre el crecimiento. Tal y como lo reporta Scheidle *et al.* (2011) la velocidad específica de crecimiento disminuye cuando aumenta la concentración de MOPS de 0.1 M a 0.2 M, este fenómeno ha sido atribuido al aumento en la presión osmótica, que se genera cuando se emplea una alta concentración de MOPS.

Adicionalmente, se ha reportado que la adición de precursores para la producción de copolímeros, como el ácido valérico tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento (Page *et al.*, 1992). Esto se puede deber a que su adición al medio de cultivo induce pleomorfismo en cepas de *Azotobacter* spp, dando lugar a la forma bacilar de las células; las cuales se

ha reportado que son osmóticamente frágiles (Vela & Rosenthal, 1972; Bonartsev *et al.*, 2017). Debido a que, en este trabajo se empleó una alta concentración de MOPS que puede ser perjudicial para la célula, es posible que la inhibición del crecimiento sea un efecto combinado del cambio morfológico y de la alta presión osmótica; aunado al cambio de la fuente de nitrógeno. Lo anterior explicaría por qué disminuye la velocidad de crecimiento y la producción de proteína cuando se adiciona el ácido valérico (Fig. 6a).

Sin embargo, otra posible explicación de por qué la adición del ácido valérico afecta el crecimiento, es que, como se ha reportado con otros ácidos (acético o propiónico), estos pueden ingresar en su forma disociada por transporte antiporter y en su forma no disociada por difusión simple a través de la membrana celular. En su forma no disociada el ácido funciona como un desacoplador de protones, lo que genera una disipación de la fuerza protón-motriz afectando la síntesis de ATP y a su vez el crecimiento bacteriano (Visser & Postma, 1973; Baronofsky *et al.*, 1984; Chung *et al.*, 1997). Además, se ha reportado que el pH juega un papel relevante en la disociación de los ácidos (Chung *et al.*, 1997). En nuestros cultivos se adicionó MOPS y Buffer de fosfatos para controlar el pH a 7.2; sin embargo, hacia el final del cultivo el pH disminuyó a 5.6. Teniendo en cuenta que a medida que disminuye el pH incrementa la concentración de formas no disociadas del ácido, es posible que la mayoría del ácido ingresará a la célula por difusión simple afectando la síntesis de ATP y por ende el crecimiento bacteriano. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para elucidar el mecanismo por el cual, el ácido valérico inhibe el crecimiento bacteriano.

Por otra parte, se cuantificó la concentración de sacarosa a través del tiempo de cultivo (Fig. 6d). En ninguno de los casos la fuente de carbono se agotó. Sin embargo, la velocidad específica de consumo del sustrato fue significativamente menor en los cultivos donde se adicionó el ácido valérico. En el caso del control, la velocidad de consumo específica fue de $0.23 \pm 0.02 \text{ g g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que, en los cultivos donde se adicionó el precursor la velocidad de consumo específica fue $0.06 \pm 0.02 \text{ g g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Calculada después de la adición del precursor). Es evidente que, en nuestros cultivos, la adición del precursor afecta la velocidad de consumo de la sacarosa.

Es importante resaltar que *A. vinelandii* prefiere usar ácidos orgánicos en vez de carbohidratos para crecer (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2018), por lo cual, un menor

consumo podría atribuirse a una represión catabólica debido a la presencia de otra fuente de carbono. En contraste, Page & Manchak (1995) observaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa UWD de *A. vinelandii*, la adición del ácido valérico no inhibió significativamente el consumo de glucosa. Sin embargo, en nuestro estudio la velocidad de consumo específico del ácido fue mayor ($0.16 \pm 0.03 \text{ g g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) al compararla con la velocidad de consumo específico de sacarosa ($0.06 \pm 0.02 \text{ g g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), lo que podría indicar una preferencia de consumo del ácido orgánico frente al consumo del carbohidrato.

Por otro lado, se observa que el porcentaje máximo de acumulación de PHAs en el control fue de $38.0 \pm 1.6 \%$, mientras que, para la condición en la que se adiciona el precursor es significativamente menor ($22.0 \pm 2.4 \%$) (Fig. 7). Este resultado difiere de lo previamente reportado por García (2014), quien observó un máximo porcentaje de acumulación de $52.0 \pm 4.7 \%$ a las 36 horas de cultivo. Cabe resaltar que este autor empleó medio de cultivo (Burk- sacarosa) a la misma relación C/N 28 que la empleada en este trabajo, sin embargo, empleó extracto de levadura, como ya se mencionó favorece la producción y acumulación del polímero (Ryu *et al.*, 2008). Asimismo, se ha descrito que para las cepas de *A. vinelandii* productoras de PHB, la producción del biopolímero se encuentra asociada al crecimiento (García *et al.*, 2014). Por lo cual, es posible que la ausencia de extracto de levadura en nuestros experimentos haya tenido un efecto negativo sobre el crecimiento y por ende sobre la producción de los polímeros.

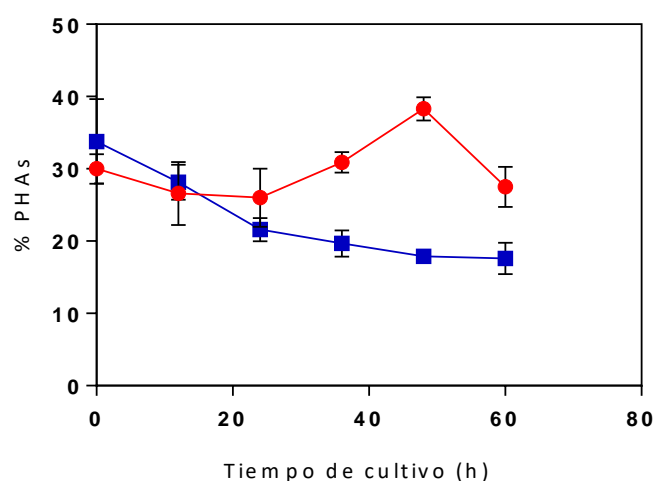


Figura 7. Porcentaje de PHAs obtenido en cultivos en matraces agitados en medio Burk-sacarosa de las cepas OPNA sin adición (●) y con adición del precursor (■) de *A. vinelandii*. La adición del precursor (ácido valérico) en una concentración de 40 mM se llevó a cabo a las 12 horas de cultivo.

En cuanto a la dinámica de acumulación, se observa que en el control incrementa hasta las 48 horas y luego disminuye de $38.0 \pm 1.6 \%$ a $27.0 \pm 2.8 \%$ en las últimas horas del cultivo (Fig. 7). Es posible que se hayan presentado procesos tempranos de degradación, como ha sido reportado previamente por Millán *et al.* (2016). En el caso de los cultivos en los que se adicionó el precursor (12 h) hay una menor acumulación del polímero con respecto al control. Además, se observa que el porcentaje de acumulación va disminuyendo conforme incrementa el tiempo de cultivo. Por su parte Page *et al.*, (1992), quienes evaluaron el efecto de la adición de precursores para la producción de copolímeros de PHBV en *A. vinelandii* UWD, observaron que el porcentaje de PHAs se ve afectado por la concentración de ácido valérico presente en el medio. Indicando que concentraciones entre 40 a 60 mM de este precursor generaban una disminución de hasta el 20 % de acumulación. De igual manera Page & Manchak (1995) observaron que, el metabolismo del ácido valérico interfiere con la cantidad de PHAs que se sintetiza, debido a que la presencia de este precursor inhibe la actividad específica de la enzima β -cetotiolasa; mientras que, la producción de intermediarios como el 3-cetovaleril-CoA, inhiben la actividad específica de la acetoacetyl-CoA reductasa.

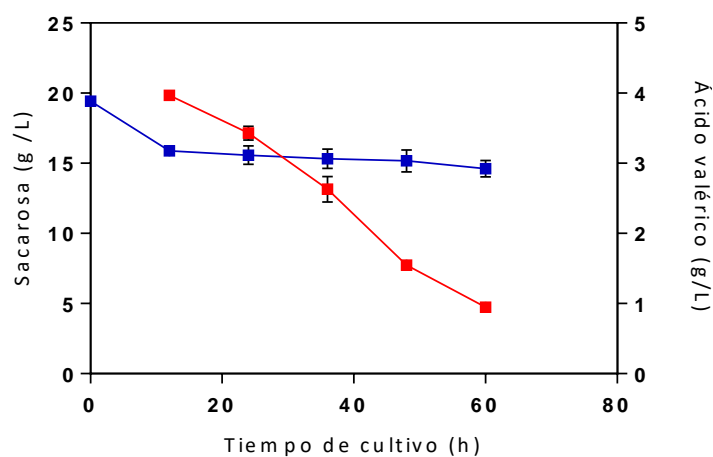


Figura 8. Cinética de consumo de ácido valérico (■) y sacarosa (■) (g L^{-1}) en cultivos en matraces agitados de la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

En la figura 8 se observa la cinética de consumo del ácido valérico y la sacarosa (g L^{-1}) en los cultivos de la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Al final del cultivo la cepa consumió el $91.0 \pm 2.3 \%$ del ácido valérico disponible, con una velocidad de consumo específica de $0.16 \pm 0.03 \text{ g g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 8). A partir, de los datos de consumo del ácido valérico y

producción de los monómeros de 3HV, se realizó un análisis teórico de la distribución de flujo del ácido valérico. Como se observa en la figura 9, al finalizar el cultivo (60 h) el 91 % del ácido valérico fue incorporado a la célula. De este porcentaje el 33 % fue desviado hacia la producción de los monómeros de 3-hidroxivalerato (13 mM); mientras que, el 67 % (23 mM) restante es posible que se haya oxidado completamente a propionil CoA y acetyl CoA (Page *et al.*, 1992)

Es posible que el acetyl-CoA producido ingrese a la vía de biosíntesis de PHB; pero como se mencionó anteriormente, el metabolismo del ácido valérico inhibe las enzimas (β -cetotilasa y acetoacetyl-CoA reductasa) involucradas en esta vía (Page & Manchak, 1995); lo que además se ve reflejado en los bajos porcentajes de acumulación (Fig. 6b). Por lo cual, es posible que la mayoría del acetyl-CoA producido ingrese a metabolismo general mediante la vía de los ácidos tricarbóxicos (Page *et al.*, 1992).

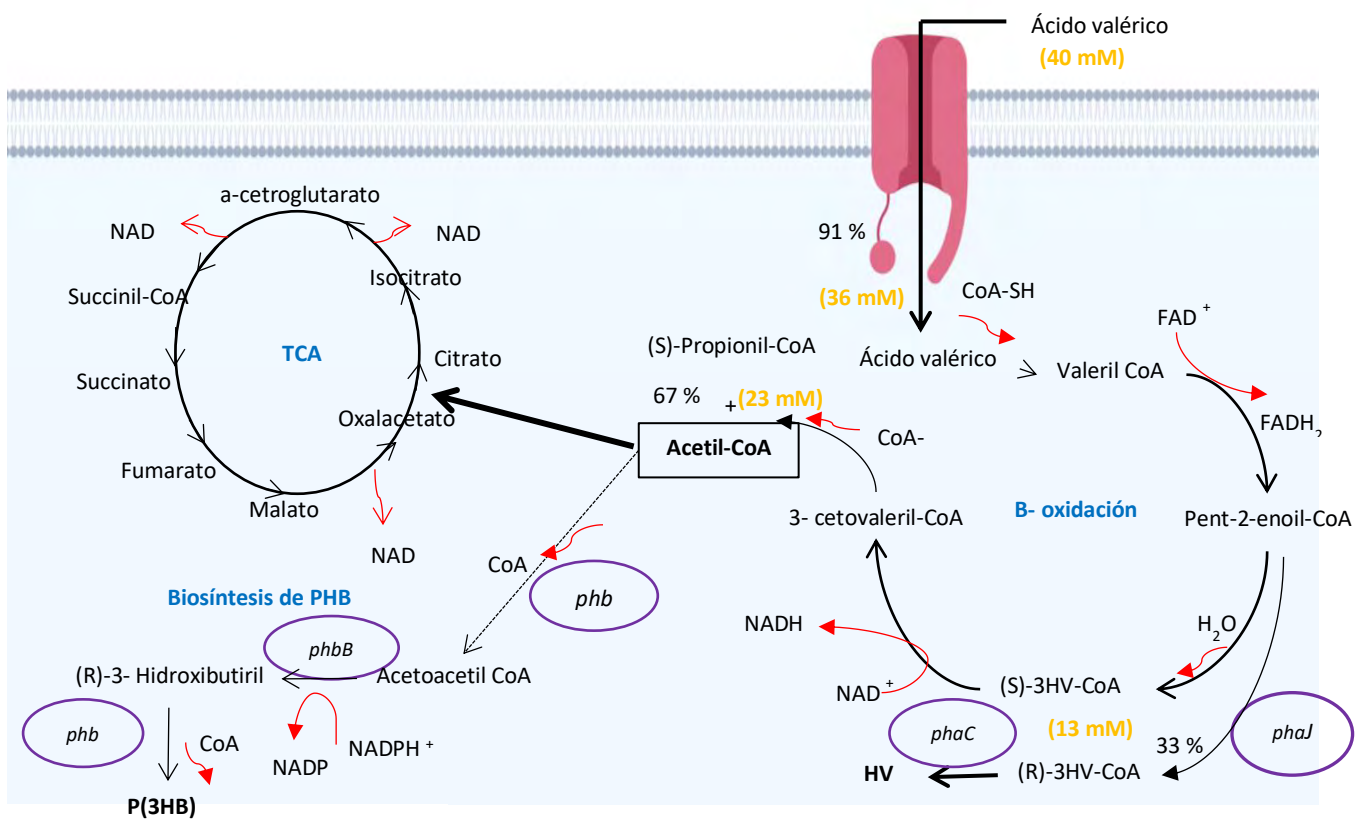


Figura 9. Esquema del consumo del ácido valérico (40 mM) a las 60 horas de cultivo en matraces agitados de la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

En la tabla 5. Se muestra un resumen de los parámetros cinéticos y estequiométricos evaluados durante los cultivos en matraces agitados de la condición control y la condición con adición del precursor de la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Como se observa la adición del ácido valérico genera un menor crecimiento, menor producción y acumulación de PHAs con respecto al control.

Asimismo, el rendimiento de PHAs con base en sustrato $Y(p/s)$ fue significativamente menor ($0.04 \pm 0.00 \text{ g g}^{-1}$) en la condición donde se adiciona el ácido valérico. Este rendimiento $Y(p/s)$ es menor al obtenido por Urtuvia *et al.* (2020), quienes reportaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa OP de *A. vinelandii*, la adición de 15 mM de valerato permite obtener un copolímero de PHBV con un rendimiento máximo $Y(p/s)$ de 0.125 ± 0.017 . La diferencia podría deberse a que Urtuvia *et al.* (2020) realizaron los cultivos en condiciones de fijación de nitrógeno y empleando como precursor el valerato (sal).

Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos máximos obtenidos a partir de los cultivos realizados en matraces de la condición control y con adición del precursor de la cepa OPNA de *A. vinelandii* en medio Burk-sacarosa. En los cultivos en los que se adiciona el precursor, los valores fueron calculados después de la adición del ácido valérico.

Cepa	OPNA (control) ^a	OPNA + precursor ^a
μ (h^{-1}) con respecto a proteína	0.047 ± 0.001	0.009 ± 0.002
μ (h^{-1}) con respecto a biomasa	0.044 ± 0.020	0.016 ± 0.005
q_{sac} ($\text{g}_{\text{sac}}/\text{g}_{\text{prot}} \text{ h}$)	0.23 ± 0.02	0.06 ± 0.02
PHAs (g L^{-1}) máx	1.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1
% PHAs máx.	38.0 ± 1.6	22.0 ± 2.4
Biomasa máx. (g L^{-1})	3.20 ± 0.13	2.10 ± 0.10
Proteína máx. (g L^{-1})	0.92 ± 0.01	0.50 ± 0.02
$Y_{p/s}$ (g g^{-1})	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.00

^aTodos los valores obtenidos para la condición control y la condición en la que se adiciona el precursor presentan diferencias significativas (p valor ≤ 0.05 en un análisis pareado).

Posteriormente, se analizó la composición monomérica de los copolímeros producidos a través del tiempo de cultivo. Como se observa en la tabla 6 la producción de los monómeros de hidroxivalerato se da desde las 24 horas, es decir 12 horas después de la adición del precursor. Se ha sugerido que, en cepas de *A. vinelandii* la incorporación del precursor no es inmediata, ya que, se requiere de la inducción de una permeasa que permita su ingreso a la célula (Page *et al.*, 1992).

Tabla 6. Composición en % mol del copolímero PHBV usando ácido valérico como precursor (Concentración final de 40 mM) en matraces agitados de la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

Tiempo (h)	% Contenido de PHAs	Composición PHA (%mol)	
		PHB	3HV
0	33.8 ± 4.9	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
12	22.1 ± 2.4	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
24	21.6 ± 1.6	81.0 ± 3.0	19.0 ± 3.0
36	19.7 ± 1.8	65.9 ± 3.7	34.1 ± 3.7
48	17.9 ± 0.6	61.4 ± 1.5	38.6 ± 1.5
60	17.6 ± 2.2	60.9 ± 2.9	39.1 ± 2.9

Por otra parte, se observa un incremento en el % mol de 3HV desde las 24 hasta las 60 horas de cultivo, donde se obtiene una composición de 60.9 ± 2.9 % mol de P(3HB) y 39.1 ± 2.9 % mol de 3HV (Tabla. 6). Es importante resaltar que, este porcentaje es significativamente mayor al obtenido bajo las mismas condiciones de cultivos en el diseño factorial (28.0 ± 2.3 %). Previamente, se ha reportado que durante la síntesis de los copolímeros coexisten cadenas de homopolímeros (P(3HB) y 3HV) y copolímeros (PHBV) (Iadevaia & Mantzaris, 2006). Esta heterogeneidad podría representar una limitante a la hora de determinar la composición monomérica de los polímeros producidos; pudiéndose observar diferencias en la composición monomérica de una misma muestra.

Por otra parte, estudios previos en matraces agitados con especies de *Azotobacter* han reportado copolímeros de PHBV con porcentajes mol de 3HV entre 22 y 27 %, empleado ácido valérico o valerato como precursor (Page *et al.*, 1992; Myshkina *et al.*, 2010; Urtuvia *et al.*, 2020). Hasta donde sabemos, el porcentaje mol de 3HV (39 %) obtenido en el copolímero de PHBV en matraces agitados con la cepa OPNA en este estudio, es el porcentaje más alto reportado para *A. vinelandii*. Estos datos indican que la cepa OPNA de *A. vinelandii* tiene la capacidad de producir copolímeros de cadena corta como el PHBV. Sin embargo, este proceso es dependiente de la adición de precursores, ya que, en la condición control no se produjeron copolímeros.

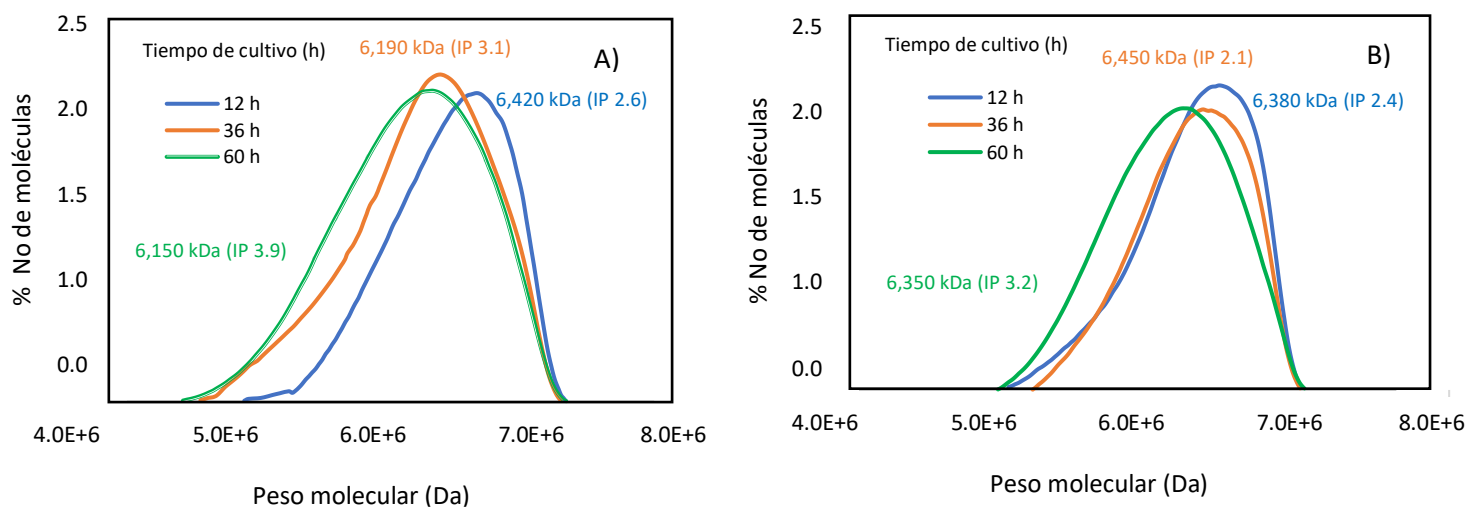


Figura 10. Distribución de pesos moleculares de los PHAs producidos en el cultivo control (a) y con adición del precursor (b). Las líneas azules (---) hacen referencia a las 12 horas, las líneas naranjas (---) a las 36 horas y las líneas verdes (---) a las 60 horas de cultivo.

En la figura 10 se presentan las distribuciones de pesos moleculares de los polímeros de PHAs producidos por la cepa OPNA. En la condición control se observa, una distribución homogénea, con un índice de polidispersión (IP) de 2.6 a las 12 horas de cultivo; mientras que, los IP incrementan conforme incrementa el tiempo de cultivo, lo cual se ve reflejado en una distribución más heterogénea y en una disminución del peso molecular promedio (PMP) (de 6,420 a 6,150 kDa); sin embargo, al realizar un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05, no se observaron diferencias significativas entre PMP obtenidos. En los cultivos en los que se adicionó el ácido valérico (Fig. 10b), se observa una distribución de los pesos moleculares homogénea, el IP se mantiene en valores cercanos 2.3, el PMP no tiene cambios significativos durante el tiempo de cultivo. Lo anterior indica que la adición del ácido valérico no tiene un efecto significativo sobre la distribución del peso molecular, ni sobre el PMP.

Estos resultados contrastan con lo previamente reportado, ya que, algunos autores observaron que en cultivos en matraces agitados de *A. chroococcum* 23 al adicionar una concentración de 60 mM de ácido valérico, el peso molecular promedio del copolímero de P(3HB-co-3HV) (1,740 kDa) era menor al obtenido con el homopolímero P(3HB) (2,713 kDa) (Savenkova *et al.*, 2000). Asimismo, Myshkina *et al.*, (2010) observaron que

la adición de ácido valérico (20 mM) en cultivos de *A. chroococcum* 7B, afectaba el peso molecular promedio del copolímero P(3HB-co-3HV) (1,300 kDa), el cual es más bajo que el peso molecular promedio del homopolímero P(3HB) (1,650 kDa). Es posible que en nuestro caso se requieran tiempos de cultivo más prolongados para determinar si existe un efecto del precursor sobre la dinámica del peso molecular.

Capítulo 2

CULTIVOS EN BIORREACTORES

9.3 Influencia de la $VTO_{m\acute{a}x}$ sobre la producción y composición del copolímero PHBV.

Como se observó anteriormente la velocidad de transferencia de oxígeno ($VTO_{m\acute{a}x}$) es un parámetro que influye sobre la modulación de la composición monomérica de los copolímeros de PHAs. En cultivos en matraces agitados con la cepa OPNA de *A. vinelandii*, una condición de $VTO_{m\acute{a}x}$ de $5.87 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, permite obtener un copolímero con un $39.1 \pm 2.9 \%$ mol de 3HV. Sin embargo, la concentración del precursor (40 mM) afecta el crecimiento celular, la producción y acumulación del copolímero.

Debido a lo anterior, en la segunda etapa del estudio se evaluó el efecto de la $VTO_{m\acute{a}x}$ sobre la producción y composición del copolímero PHBV producido por la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Los cultivos lote se realizaron en biorreactor de 3 L por duplicado en condiciones de microaerofilia, manipulando la velocidad de agitación (a 300 y 700 rpm), con una aireación de 1vvm y controlando el pH a 7.2. Con el fin de disminuir el efecto negativo de este sobre el crecimiento celular y la producción de los copolímeros, el ácido valérico se adicionó en una concentración final de 10 mM. La adición se realizó durante la fase más activa de la biosíntesis de P(3HB), a las seis y nueve horas de cultivo para la condición de 700 y 300 rpm, respectivamente. Cabe resaltar que la velocidad específica de crecimiento fue calculada con los datos de proteína, ya que, previamente se ha reportado que, la producción del polímero afecta la cuantificación de biomasa por peso seco (García, 2014). Para los análisis estadísticos se utilizó una prueba t pareada con un nivel de significancia de p valor ≤ 0.05 , todos los análisis se realizaron en el programa Minitab 17.

Los parámetros monitoreados en línea en los cultivos realizados para la cepa OPNA a diferentes VTOs se observan en la figura 11. Para los cultivos a mayor transferencia (700 rpm), la tensión de oxígeno disuelto disminuyó progresivamente hasta llegar a valores entre 2-4 % después de las 13 horas de cultivo, posteriormente se mantuvo constante hasta las 18 horas de cultivo. Se calculó la $VTO_{m\acute{a}x}$ a partir de los datos obtenidos del analizador de gases (O_2 y CO_2) a la salida. Se obtuvo una $VTO_{m\acute{a}x}$ de $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 11b). Mientras que, en los cultivos realizados a baja transferencia (300 rpm) la TOD (%) disminuyó en las primeras tres horas de cultivo, y se mantuvo en valores cercanos a 0%

durante el resto del cultivo. La $VTO_{\text{máx}}$ en estos cultivos fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 11b). Cabe resaltar que, la $VTO_{\text{máx}}$ permaneció constante durante el crecimiento celular, lo cual indica que los cultivos estaban limitados por oxígeno (Díaz-Barrera *et al.*, 2007). Para ambas condiciones, se mantuvo controlado el pH en valores cercanos a 7.2 (Fig. 11c).

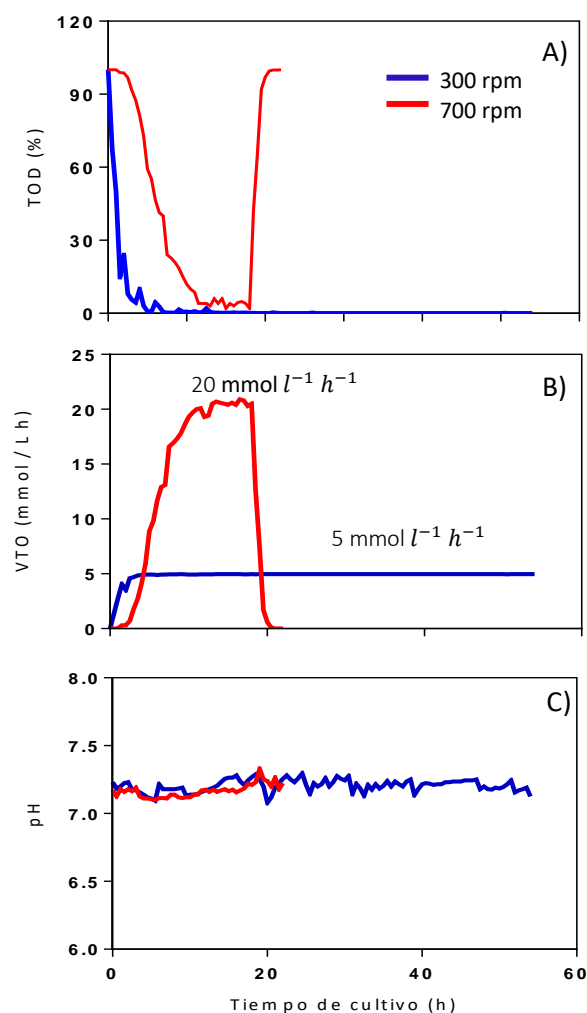


Figura 11. Perfiles de TOD (a), VTO (b) y control de pH (c), en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii* bajo diferentes $VTO_{\text{máx}}$, y con la adición de ácido valérico (10 mM).

En la figura 12 se muestra la producción de biomasa (a) (b) y proteína (c) para las dos condiciones evaluadas. En los cultivos realizados a una menor $VTO_{\text{máx}}$ ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) el crecimiento presenta un tendencia exponencial desde el inicio del cultivo hasta las 30 horas, donde se alcanza la máxima concentración de biomasa alcanzada ($7.60 \pm 0.45 \text{ g L}^{-1}$). La máxima concentración de proteína es de $1.26 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ a las 40 horas de cultivo. En los cultivos desarrollados a $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se observó un crecimiento exponencial hasta las 15 horas, lo que concuerda con la caída de la TOD. La máxima concentración

de biomasa fue de $7.03 \pm 0.12 \text{ g L}^{-1}$ a las 18 horas de cultivo, siendo similar a la máxima concentración obtenida a una menor $VTO_{\text{máx}}$. En cuanto a la concentración de proteína en estos cultivos fue de $1.95 \pm 0.21 \text{ g L}^{-1}$. Previamente, se ha reportado que, en los cultivos a baja transferencia el crecimiento es más lento y se requiere de más tiempo para alcanzar los títulos obtenidos a alta transferencia. Esto posiblemente se deba a que, en una condición de mayor concentración de oxígeno, las cepas de *A. vinelandii* usan la fuente de carbono para la producción de biomasa, mientras que, en bajas condiciones de oxígeno la fuente de carbono es desviada a la acumulación de P(3HB) (Peña *et al.*, 2014).

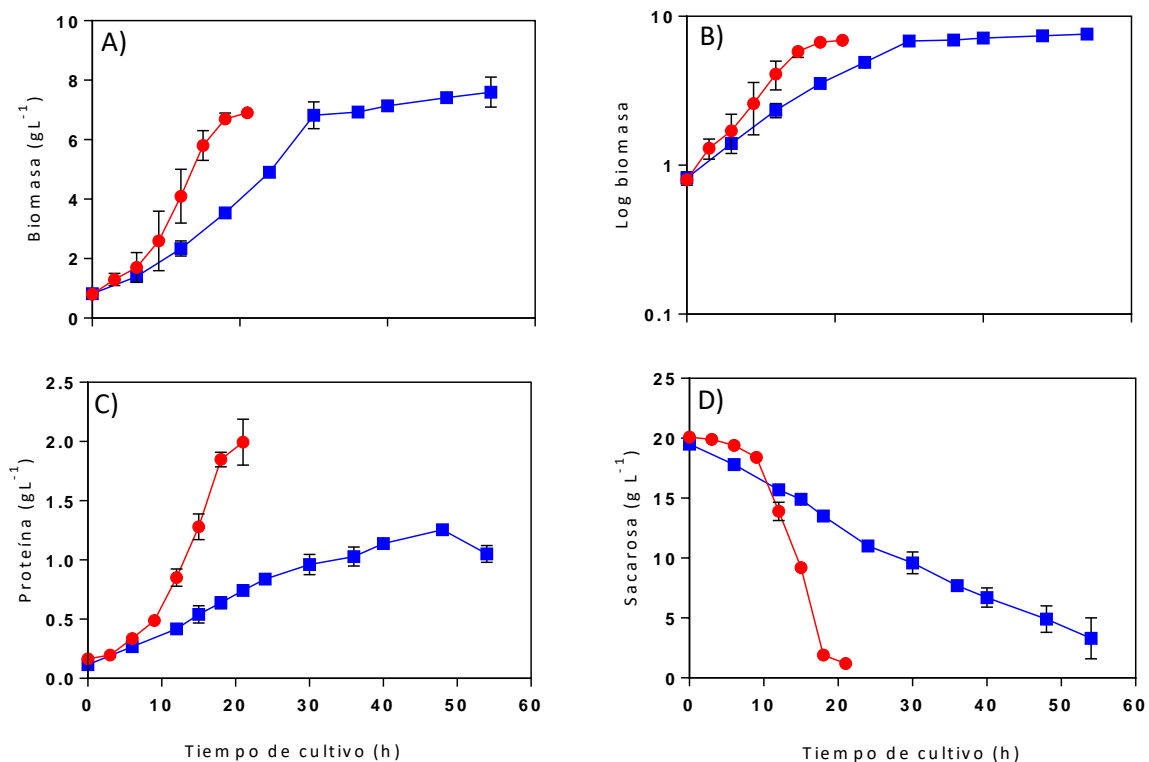


Figura 12. Efecto de la $VTO_{\text{máx}}$ sobre el crecimiento bacteriano (a) cinéticas de crecimiento celular en peso seco, cinética con base en log de biomasa (b), proteína (c), y consumo de sacarosa (d) en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, en dos condiciones de $VTO_{\text{máx}}$: $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (■) y a $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (●), con la adición de ácido valérico (10 mM).

La velocidad específica de crecimiento (μ) se observan diferencias significativas, en la condición de baja transferencia fue alrededor de 5 veces menor ($0.031 \pm 0.000 \text{ h}^{-1}$) comparada con la obtenida a alta transferencia ($0.142 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$). Este comportamiento fue similar a lo reportado previamente en cepas de *A. vinelandii*, donde una condición de menor oxígeno influye negativamente sobre la tasa de crecimiento (García *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2014).

Por otro lado, en la figura 12d se observa que en ninguno de los casos la fuente de carbono se agotó, al final del cultivo se consumieron 19.0 ± 0.0 y 16.0 ± 1.8 g L⁻¹ de sacarosa para la condición de alta (20 mmol L⁻¹ h⁻¹) y baja transferencia (5 mmol L⁻¹ h⁻¹), respectivamente. La velocidad de consumo específica en la condición de alta transferencia fue de 0.37 ± 0.02 g_{sac} g_{prot}⁻¹ h⁻¹; mientras que, en los cultivos a baja transferencia la velocidad específica de consumo del sustrato fue significativamente menor (0.28 ± 0.01 g_{sac} g_{prot}⁻¹ h⁻¹). Este comportamiento se ha descrito para cepas de *A. vinelandii*, donde un mayor consumo de la fuente de carbono es atribuido a una mayor velocidad de transferencia de oxígeno (Millán *et al.*, 2016). Por otra parte, una mayor velocidad de consumo en los cultivos a alta transferencia se ve reflejado en una rápida producción de biomasa y del polímero (Fig. 12a, 13a).

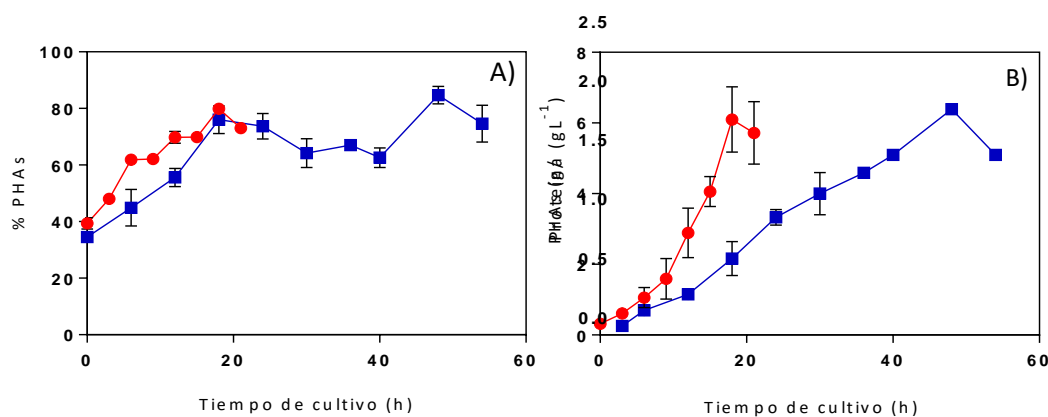


Figura 13. Cinéticas de acumulación (a) y concentración (b) de PHAs, en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii* bajo dos condiciones de VTO_{máx}: 5 mmol L⁻¹ h⁻¹ (■) y a 20 mmol L⁻¹ h⁻¹ (●), y con la adición de ácido valérico (10 mM).

Con respecto a la concentración y acumulación de PHAs, se observa que la producción del polímero se encuentra asociada al crecimiento, como se ha reportado previamente para cultivos con esta cepa (García *et al.*, 2014). En los cultivos a alta transferencia se obtiene un máximo porcentaje de acumulación del 80.0 ± 0.7 % del polímero en base a su peso seco, a las 18 horas de cultivo; mientras que, el porcentaje de acumulación a baja transferencia fue ligeramente mayor (85.0 ± 3.0 %) a las 48 horas de cultivo (Fig. 13a). De igual manera se alcanzó una concentración de PHAs de 6.1 ± 0.9 y 6.4 ± 0.0 g L⁻¹ en los cultivos a alta y baja transferencia, respectivamente (Fig. 13b). No se observaron diferencias significativas, entre los porcentajes de acumulación, ni entre las máximas concentraciones de PHAs reportadas para las dos condiciones de VTO evaluadas.

Por otra parte, se calcularon los rendimientos de PHAs con respecto a sacarosa, para la condición de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ el máximo rendimiento ($Y_{p/s}$) alcanzado es de $0.41 \pm 0.01 \text{ g g}^{-1}$, mientras que, para la condición de mayor transferencia el rendimiento máximo es de $0.34 \pm 0.05 \text{ g g}^{-1}$. La productividad volumétrica fue mayor en la condición de $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($0.34 \pm 0.05 \text{ g}_{\text{PHAs}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mientras que, en la condición de menor transferencia la productividad volumétrica máxima fue de $0.13 \pm 0.00 \text{ g}_{\text{PHAs}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Sin embargo, no se presentan diferencias significativas entre los rendimientos ni entre las productividades volumétricas.

Lo anterior indica que, bajo las dos condiciones evaluadas no existe un efecto significativo del oxígeno sobre la producción, ni sobre el porcentaje máximo de acumulación del polímero. Previamente se ha reportado que, la cepa OPNA tiene la capacidad de acumular más del 80 % de polímero en base a peso seco, independiente de la condición de oxígeno en la que se encuentre (García *et al.*, 2014).

A diferencia de los cultivos en matraces, en los cultivos en biorreactor la adición del ácido valérico no tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento celular, la producción y acumulación de PHAs. Esto posiblemente se deba a la baja concentración del precursor que se utilizó, con el fin de evitar inhibiciones. Con respecto a lo anterior se ha observado que, en cultivos de la cepa UWD de *A. vinelandii* una disminución en la concentración del precursor (de 40 a 10 mM) incrementa en un 25 % el crecimiento celular y en un 30 % la concentración del polímero (Page *et al.*, 1992).

Sin embargo, es importante resaltar que la cantidad de oxígeno suministrado al cultivo puede variar entre matraces agitados y biorreactores (Gómez, 2020). Previamente, se ha reportado que uno de los principales problemas asociados al uso de matraces agitados, es la insuficiencia en el suministro de oxígeno, lo que puede ocasionar una ralentización o cambios en el metabolismo, lo cual repercutirá en la actividad microbiana (Büchs, 2001). Asimismo, Gómez (2020) reportó que en matraces agitados el suministro total de oxígeno es menor ($571 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), al suministrado en biorreactores ($702 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) cuando se tiene la misma $VTO_{\text{máx}}$ ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Por lo cual, no podría descartarse un posible efecto de la limitación de oxígeno en los matraces agitados sobre el crecimiento celular, la producción y acumulación de PHAs.

En otros modelos bacterianos se ha reportado que, la regulación del pH disminuye el efecto inhibitorio de la adición de ácidos orgánicos para la producción de copolímeros de

PHAs. En cultivos de *A.eutrophus* NCIMB 11599 empleando ácido propiónico para la producción de PHBHV, se evidenció que, al controlar al pH a 7.5 durante todo el cultivo, se incrementaba un 50 % la producción celular y la concentración del copolímero P(3HB)-co-3HV, al compararlo con lo obtenido a un pH controlado de 6.8 (Chung *et al.*, 1997). Asimismo, los autores indicaron que el pH afecta la disociación del ácido, ya que, al incrementar el pH disminuyó la concentración de formas no disociadas facilitando el transporte antiporter del ácido a la célula.

Es posible que este fenómeno esté ocurriendo en nuestros cultivos, ya que, en biorreactor el pH se controló durante todo el cultivo a 7.2, lo que favorece una mayor concentración de formas disociadas del ácido, a diferencia de los cultivos realizados en matraces agitados donde se ajustó el pH al inicio del cultivo (7.2) y se trató de mantener durante el cultivo (mediante la adición de MOPS y Buffer fosfato). Sin embargo, al final del cultivo el pH había disminuido hasta 5.6, lo que posiblemente impactó de manera negativa en la concentración de formas disociadas presentes en el medio, favoreciendo el transporte por difusión pasiva, lo que causó la inhibición de la síntesis de ATP e impactó de manera negativa en el crecimiento (Visser & Postma, 1973; Baronofsky *et al.*, 1984).

Por otro lado, es importante destacar que en los cultivos en biorreactor no se adicionó MOPS como amortiguador de pH, mientras que, en los cultivos en matraces agitados la concentración de MOPS (0.15 M) tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento, probablemente se debe a la alta presión osmótica a la que estaban expuestas las células (Scheidle *et al.*, 2011).

Como se observa en la figura 14, el ácido valérico se adicionó a las seis y nueve horas de cultivo, para la condición de alta y baja transferencia, respectivamente. En los cultivos realizados a alta transferencia, la bacteria consumió el ácido valérico a una velocidad específica de consumo de $0.09 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{val}} \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, incorporando el 100 % (10 mM) del ácido seis horas después de la adición; de este porcentaje el 59 % fue desviado hacia la producción de monómeros de hidroxivalerato (5.9 mM), mientras que, el 41 % restante es posible que se haya oxidado completamente a propionil CoA y acetil CoA, los cuales pueden entrar en el metabolismo general (Page *et al.*, 1992). En los cultivos a baja transferencia, la velocidad específica de consumo del ácido fue significativamente menor ($0.07 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{val}} \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), aunque el 100 % del ácido se incorporó a la célula, 18 horas después de la adición. El 50 % (5 mM) del precursor fue convertido en monómeros de

hidroxivalerato, mientras que el otro 50 % es posible que haya continuado el ciclo de β -oxidación, para después ingresar al metabolismo general.

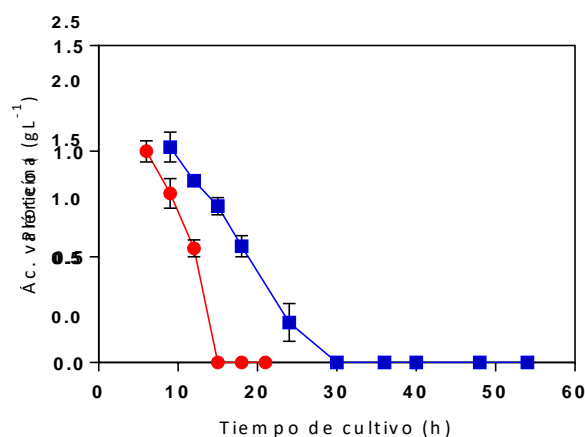


Figura 14. Cinética de consumo de ácido valérico en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii* bajo en dos condiciones de $VTO_{máx}$: 5 $mmol L^{-1} h^{-1}$ (■) y a 20 $mmol L^{-1} h^{-1}$ (●), y con la adición de ácido valérico (10 mM).

La condición de $VTO_{máx}$ afecta significativamente la velocidad de consumo específica del ácido valérico, al incrementar la $VTO_{máx}$ también incrementa la velocidad de consumo del precursor. Este comportamiento también se observa en el consumo de la sacarosa (Fig. 12d). Por otra parte, se observa que, en los cultivos en biorreactor, independientemente del tiempo de adición, velocidad de consumo del precursor o $VTO_{máx}$, el porcentaje del precursor que fue desviado a la producción de los monómeros de hidroxivalerato fue mayor (alrededor del 50 al 60 %) en comparación a lo obtenido en los matraces agitados (33 %).

Estas diferencias podrían atribuirse a la concentración del precursor, ya que, en matraces agitados la concentración del ácido fue cuatro veces mayor (40 mM) que la empleada en los biorreactores (10 mM). Se ha reportado que, en cultivos de la cepa UWD de *A. vinelandii*, cuando se adiciona el precursor (ácido valérico) en una concentración final de 10 mM, se incorpora el 76 % a los monómeros de 3HV; mientras que, al aumentar la concentración del ácido a 30 mM la incorporación disminuye a 40 % (Page *et al.*, 1992).

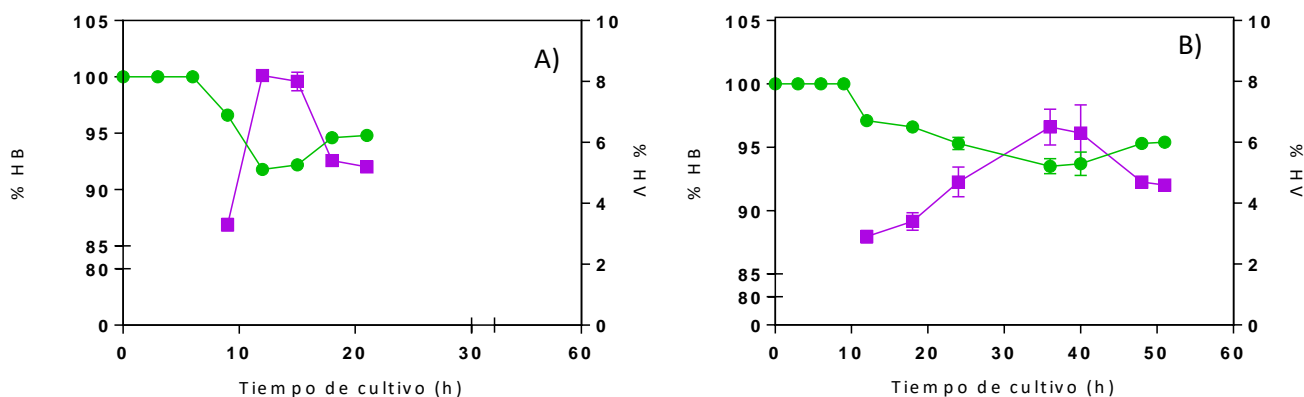


Figura 15. Evolución de la composición monomérica de los copolímeros producidos en los cultivos a alta transferencia (a) y baja transferencia de oxígeno (b) en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, con la adición de ácido valérico (10 mM). El % HB está representado por los círculos verdes (●) y los cuadrados morados corresponden al % 3HV (■).

En los cultivos a alta transferencia el máximo porcentaje de hidroxivalerato ($8.3 \pm 0.0 \%$) se obtuvo seis horas después de la adición del precursor; sin embargo, al final del cultivo el porcentaje mol disminuyó hasta $5.2 \pm 0.1 \%$; mientras que, en los cultivos a baja transferencia se obtuvo un máximo porcentaje de hidroxivalerato de $6.6 \pm 0.2 \%$ a las 27 horas después de la adición, posterior a este tiempo el porcentaje mol disminuyó a $4.6 \pm 0.1 \%$ (Fig. 15b). Es importante resaltar que existen diferencias significativas entre los máximos porcentajes mol de 3HV (p valor ≤ 0.05) para las condiciones de $VTO_{\text{máx}}$ evaluadas, lo que sugiere que la $VTO_{\text{máx}}$ afecta el contenido de 3HV en el copolímero de PHBV producido por la cepa OPNA.

Es posible que la disminución del contenido de 3HV se deba a un incremento en la actividad de las depolimerasas. Sin embargo, como lo observó Millán *et al.*, (2016) un incremento en la actividad de las depolimerasas se ve reflejado en una disminución del peso molecular del polímero. En nuestro caso, no se observa una disminución del peso molecular (Fig. 16 a, b). Una posible explicación de este fenómeno podría atribuirse a que el ácido valérico se está agotando, lo que disminuye la síntesis de los monómeros de 3HV. Sin embargo, la síntesis de P(3HB) continúa, lo que genera la modificación en la fracción molar de ambos monómeros en el copolímero (Page *et al.*, 1992). La disminución en el porcentaje mol de 3HV no podría deberse a una degradación (Page *et al.*, 1992; Volova *et al.*, 2005), porque la concentración de 3HV se mantiene en valores entre 0.60 ± 0.023 y $0.530 \pm 0.017 \text{ mg L}^{-1}$ y entre 0.54 ± 0.06 y $0.48 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$ (para los cultivos a alta y baja transferencia, respectivamente), durante el resto del cultivo. Mientras que,

en los cultivos en matraces agitados no se observa una disminución en el porcentaje de 3HV (Tabla. 6), esto posiblemente se deba a que no se ha agotado la concentración del precursor en el medio del cultivo, por lo cual la síntesis de los monómeros de 3HV continúa. Es evidente que la $VTO_{m\acute{a}x}$ tiene una influencia positiva sobre el porcentaje mol de 3HV producido por la cepa OPNA de *A. vinelandii*; lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente en matraces agitados (Tabla. 4).

Adicionalmente, esto concuerda con lo reportado por Urtuvia *et al.* (2020), quienes observaron que en cultivos en biorreactor y en una condición de fijación de nitrógeno de la cepa OP de *A. vinelandii*, la adición de ácido valérico (10 mM) en una condición de alta transferencia ($17.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), permite obtener un copolímero de PHBV con un porcentaje mol de hidroxivalerato de $34.95 \pm 6.68 \%$, mientras que, al disminuir la VTO ($4.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) el porcentaje de 3HV disminuye a $18.58 \pm 6.40 \%$. Lo anterior indica que la VTO tiene un efecto positivo sobre la producción de hidroxivalerato en el copolímero de PHBV. Adicionalmente, los autores atribuyeron este efecto a las variaciones en la respiración celular lo que produce un incremento en el poder reductor (NADPH/NADP⁺), el cual juega un papel importante en la biosíntesis de PHAs (García *et al.*, 2018).

Por otra parte, los porcentajes mol de hidroxivalerato obtenidos en biorreactor son menores a los obtenidos en matraces agitados ($39.1 \pm 2.9 \%$). Lo anterior puede deberse a que en biorreactores la concentración del precursor disminuyó de 40 a 10 mM. Como lo reportaron Page *et al.* (1992) el contenido de 3HV depende de la cantidad de ácido valérico presente en el medio; estos autores reportaron que, al adicionar una concentración de 10 mM del ácido se produce un 17 % mol de 3HV en el copolímero, mientras que, en una concentración de 40 mM la producción de 3HV es de 24 %. Asimismo, Myskhina *et al.* (2010) observaron que en cultivos de la cepa 7B de *A. chroococcum* incrementar la concentración de ácido valérico (de 10 a 20 mM) permite incrementar el porcentaje de 3HV en un 37 %.

En la tabla 7 se muestra un resumen de los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos llevados a cabo en biorreactor de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, con la adición de 10 mM de ácido valérico y bajo dos condiciones de VTO. A baja transferencia de oxígeno se obtuvo el mayor rendimiento de producto en base a sustrato ($0.41 \pm 0.01 \text{ g g}^{-1}$), y el mayor rendimiento biomasa en base a sustrato ($0.42 \pm 0.02 \text{ g g}^{-1}$) comparado con

los rendimientos obtenidos a alta transferencia ($Y_{x/s}$ ($0.32 \pm 0.00 \text{ g g}^{-1}$), y $Y_{p/s}$ ($0.34 \pm 0.05 \text{ g g}^{-1}$)).

Tabla 7. Parámetros estequiométricos obtenidos a partir de los cultivos realizados en biorreactor en condiciones de alta y baja velocidad de transferencia de oxígeno con la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

VTO _{máx} (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	5	20
Parámetro	(300 rpm)	(700 rpm)
μ (h ⁻¹) con respecto a proteína	0.031 ± 0.000 ^a	0.142 ± 0.003 ^b
μ (h ⁻¹) con respecto a biomasa	0.050 ± 0.001 ^a	0.142 ± 0.021 ^b
PHAs (g L ⁻¹) máx	6.4 ± 0.0	6.1 ± 0.9
% PHAs máx.	85.0 ± 3.0	80.0 ± 0.7
Biomasa máx. (g L ⁻¹)	7.60 ± 0.45	7.03 ± 0.12
Proteína máx. (g L ⁻¹)	1.26 ± 0.01	1.95 ± 0.2
q_{sac} (g _{sac} g _{prot} ⁻¹ h ⁻¹)	0.28 ± 0.01 ^a	0.37 ± 0.02 ^b
q_{Val} (g _{Val} g _{prot} ⁻¹ h ⁻¹)	0.07 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^b
$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	0.42 ± 0.02	0.32 ± 0.00
$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	0.41 ± 0.01	0.34 ± 0.05
Productividad PHAs (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.13 ± 0.00	0.34 ± 0.05
3HV (porcentaje mol) máx	6.6 ± 0.2 ^a	8.3 ± 0.0 ^b

^{a, b} Indica diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones de VTO_{máx} según un análisis pareado (p valor ≤ 0.05).

Los copolímeros producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii* presentaron pesos moleculares promedio (PMP) entre 6,550 y 6,760 kDa en las dos condiciones de VTO_{máx} evaluadas. En la condición de mayor transferencia, se observa una distribución homogénea de pesos moleculares (Fig. 16a). En cuanto al IP es de 2.8 a las 3 horas de cultivo, mientras que, disminuye a 1.6 a las 12 horas de cultivo; es importante resaltar que esta disminución en el IP se encuentra relacionada con un incremento en el PMP (6,710 kDa), hacia el final del cultivo el IP incremento a 2.7 acompañado de una disminución en el PMP (6,550 kDa). Es importante resaltar que al realizar una ANOVA no se observaron cambios significativos en el PMP. En la condición de baja transferencia se observan distribuciones homogéneas (Fig.16b), con IP entre 1.4 a 2.9 y sin cambios significativos en los PMP. Lo anterior, indica que la VTO_{máx} no tiene un efecto significativo sobre la evolución de pesos moleculares de los copolímeros de PHBV producidos por la cepa OPNA.

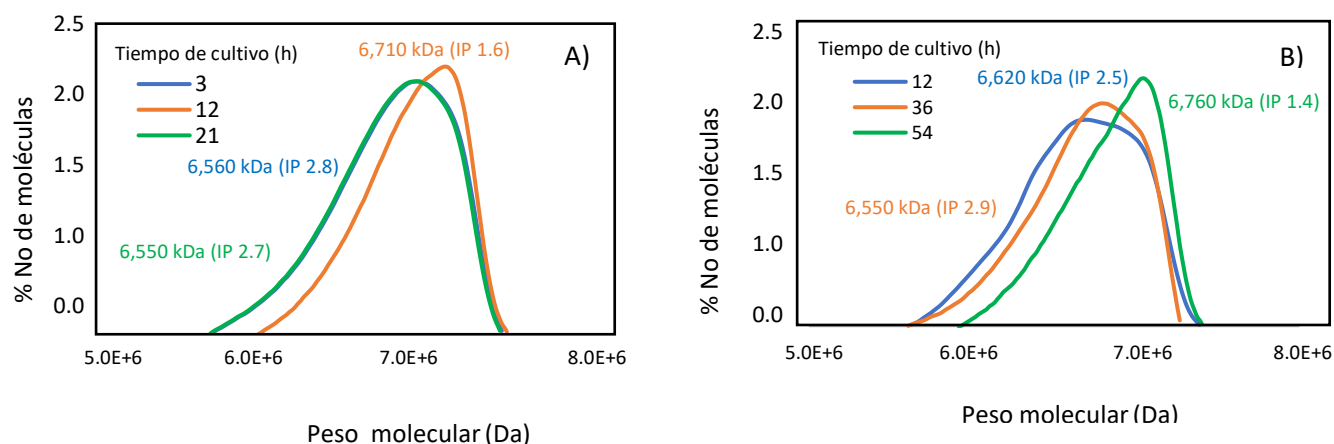


Figura 16. Distribución de pesos moleculares de los PHAs producidos a alta (a) y baja transferencia de VTO_{máx} (b), en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, con la adición de ácido valérico (10 mM).

A partir de los resultados obtenidos en biorreactor se puede concluir que la concentración de 10 mM de ácido valérico no tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular, la producción y acumulación de los copolímeros de PHAs. Por otra parte, se observó que la VTO_{máx} tiene un efecto significativo positivo sobre la producción de los monómeros de hidroxivalerato en el copolímero de PHBHV. Sin embargo, el porcentaje mol de 3HV obtenido fue más bajo comparado con el obtenido previamente en matraces agitados.

Previamente se ha reportado que, el incremento en la concentración del precursor (en valores entre 40 -60 mM) tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular y sobre el porcentaje de acumulación (Page *et al.*, 1992). Con el fin de determinar si la concentración del precursor afectó la producción de los monómeros de hidroxivalerato, en el copolímero PHBV en los cultivos en biorreactor, se realizaron cultivos en biorreactor por duplicado incrementando la concentración del ácido valérico de 10 a 40 mM, adicionándolo a las seis horas de cultivo y empleando la condición de alta transferencia (20 mmol L⁻¹ h⁻¹).

La máxima concentración de biomasa alcanzada fue de 6.61 ± 0.15 g L⁻¹ a las 24 horas y de proteína fue de 1.89 ± 0.11 g L⁻¹ a las 21 horas de cultivo (Fig. 17 a, b). Por otra parte, la μ disminuyó significativamente en un 20 % (0.113 ± 0.001 h⁻¹). Previamente se ha reportado que, el incremento en la concentración del precursor tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular (Page *et al.*, 1992; Myshkina *et al.*, 2010).

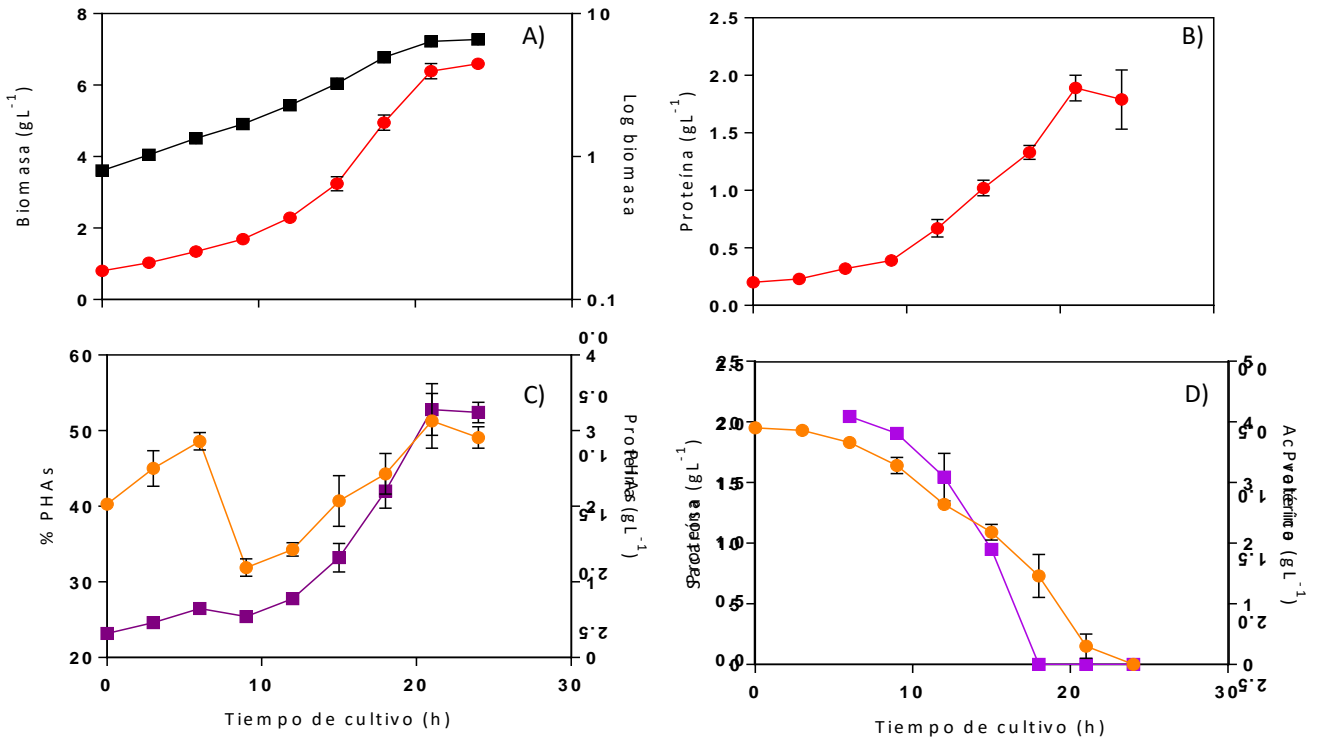


Figura 17. Efecto de la concentración de ácido valérico sobre crecimiento bacteriano (a) cinética de crecimiento en base a biomasa (●) y log de biomasa (■), (b) proteína, (c) producción (○) y concentración de PHAs (■), (d) consumo de sacarosa (○) y ácido valérico (■), en cultivos en lote a alta transferencia de oxígeno de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, con la adición de ácido valérico (40 mM).

Con respecto a la acumulación de PHAs, se observa un incremento en el porcentaje de acumulación durante las primeras seis horas del cultivo. Una vez adicionado el ácido valérico hay una caída en la acumulación (32 ± 1.1 %); sin embargo, es importante resaltar que después de las nueve horas hay un incremento en la acumulación hasta obtenerse un máximo porcentaje de 51.0 ± 3.6 a las 21 horas de cultivo, a este tiempo la concentración del polímero fue de 3.3 ± 0.3 g L⁻¹ (Fig. 17c). Este porcentaje y concentración de PHAs son significativamente más bajos a los obtenidos (80.0 ± 0.7 % y 6.1 ± 0.9 g L⁻¹) en los cultivos realizados con una menor concentración del precursor (10 mM) (Fig. 13).

Lo anterior sugiere que, la adición del ácido valérico en una concentración de 40 mM afecta el porcentaje de acumulación de los copolímeros. Este comportamiento también fue observado en los cultivos en matraces agitados, donde la adición de 40 mM del precursor generaba una disminución en el porcentaje de acumulación en comparación con la condición control (Fig. 7b). Como se mencionó anteriormente, la activación de la vía de β -oxidación inhibe la actividad de las enzimas de la vía de biosíntesis de PHAs (Page

& Manchak, 1995). Cabe resaltar que, en los cultivos en biorreactor donde se empleó una concentración de 10 mM del precursor, no se evidenció un efecto negativo en el porcentaje de acumulación de PHAs (Fig. 13a). Previamente, Page *et al.* (1992) reportaron que, en cultivos en biorreactor de la cepa UWD de *A. vinelandii*, el porcentaje de acumulación de PHAs en la célula se ve afectado por la concentración del precursor presente en el medio. Adicionalmente observaron que, en concentraciones entre 40 a 60 mM del precursor hay una disminución del 20 % de acumulación. Cabe resaltar que, estos autores tampoco observaron un efecto negativo de una concentración de 10 mM del precursor sobre la acumulación de PHAs.

Al final del cultivo la sacarosa fue consumida completamente (Fig. 17d). En cuanto a la velocidad de consumo específico de la sacarosa es de $0.31 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{sac}} \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, cabe resaltar que no se observaron diferencias significativas, al compararla con la velocidad de consumo específico obtenida en los cultivos en los que se adicionó 10 mM de ácido valérico ($0.37 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{sac}} \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Lo anterior indica que la velocidad de consumo específico de la sacarosa no se ve afectada por la concentración de ácido valérico. En cuanto al consumo de ácido valérico es significativamente mayor ($0.21 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{val}} \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), en comparación a lo obtenido en los cultivos con 10 mM de ácido valérico, donde el consumo específico fue de $0.09 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{val}} \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En todos los cultivos en biorreactor, la sacarosa y el ácido valérico se consumieron simultáneamente, este comportamiento también fue observado por Urtuvia *et al.* (2020).

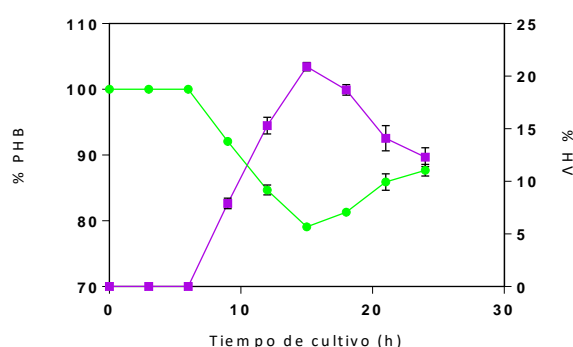


Figura 18. Evolución de la composición monomérica de los copolímeros producidos en los cultivos a alta transferencia en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, con la adición de ácido valérico (40 mM). El % HB está representado por los círculos verdes (●) y los cuadrados morados corresponden al % 3HV (■).

El máximo porcentaje de 3HV (21.0 ± 0.5 %) se alcanzó 9 horas después de la adición (Fig. 18). Lo anterior indica que, al aumentar 4 veces la concentración del precursor, incrementa alrededor de tres veces el contenido de 3HV en el copolímero de PHBHV, esto al compararlo con el porcentaje de 3HV (8.3 ± 0.0) obtenido cuando se emplea una concentración de 10 mM del precursor (Fig. 15a).

Lo anterior es similar a lo observado por Page *et al.* (1992) quienes reportaron que, en cultivos en biorreactor de la cepa UWD de *A. vinelandii*, al incrementar la concentración del precursor de 10 a 40 mM, incrementa en un 30 % el contenido de 3HV en el copolímero de PHBHV. Asimismo, otros autores como Urtuvia *et al.*, (2020) observaron que en cultivos en lote de la cepa OP *A. vinelandii*, un incremento en la concentración del ácido valérico (de 5 a 10 mM) permite incrementar 27 % el porcentaje mol de 3HV. Esto sugiere que la concentración tiene un efecto positivo sobre la producción de los monómeros de 3HV.

Mediante el análisis teórico de la distribución flujo del ácido valérico, se encontró que el 100 % del ácido valérico (40 mM) fue incorporando 15 horas después de la adición; de este porcentaje el 20 % (8 mM) fue desviado hacia la producción de monómeros de hidroxivalerato, mientras que, el 80 % restante (32 mM) posiblemente completo el ciclo de β -oxidación, generándose propionil CoA y acetil CoA, los cuales, pueden entrar en el metabolismo general (Page *et al.*, 1992). Al comparar estos resultados con los obtenidos a una concentración de 10 mM de ácido valérico es evidente que, en una mayor concentración del precursor, hay un mayor porcentaje de este, que no es desviado a la producción de los monómeros de 3HV. Sin embargo, a una mayor concentración del precursor hay un mayor porcentaje mol de 3HV.

En la tabla 8 se realiza una comparación de los parámetros obtenidos en los cultivos a alta transferencia empleando 10 y 40 mM de ácido valérico. Como se observa, el incremento en la concentración del precursor, afecta de manera negativa la velocidad de crecimiento, la producción y acumulación de PHAs. Cabe resaltar que este comportamiento fue previamente observado en los cultivos en matraces agitados (Fig. 6).

Por otra parte, se observa que el rendimiento de PHAs en base a sustrato es menor (0.15 ± 0.01 g g⁻¹) cuando se incrementa la concentración del precursor, en comparación al obtenido a una menor concentración (0.34 ± 0.05 g g⁻¹). Con respecto a lo anterior Urtuvia *et al.* (2020) observaron que, en cultivos en biorreactor de la cepa OP de *A. vinelandii*, al

incrementar la concentración del precursor de 10 a 15 mM, hay una disminución del 20 % en el $Y_{p/s}$ y en el $Y_{x/s}$. Sin embargo, es importante resaltar que, en los cultivos con 40 mM de ácido valérico, el contenido de 3HV incremento alrededor de tres veces en el copolímero, obteniendo un porcentaje mol de 3HV de 21.0 ± 0.5 .

Tabla 8. Comparación de parámetros obtenidos a partir de los cultivos realizados en biorreactor en condiciones de alta de transferencia de oxígeno de la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Empleando 10 y 40 mM de ácido valérico.

VTO _{máx} (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	20	20
Parámetro	(10 mM Ac val)	(40 mM Ac val)
μ (h ⁻¹) en base a proteína	0.142 ± 0.003^a	0.113 ± 0.001^b
μ (h ⁻¹) en base a biomasa	0.142 ± 0.021	0.101 ± 0.001
PHAs (g L ⁻¹) máx	6.1 ± 0.9^a	3.3 ± 0.3^b
% PHAs máx.	80.0 ± 0.7^a	51.0 ± 3.6^b
Biomasa máx. (g L ⁻¹)	7.03 ± 0.12	6.61 ± 0.15
Proteína máx. (g L ⁻¹)	2.01 ± 0.22	1.89 ± 0.11
q_{sac} (g _{sac} g _{prot} ⁻¹ h ⁻¹)	0.37 ± 0.02	0.31 ± 0.00
q_{val} (g _{val} g _{prot} ⁻¹ h ⁻¹)	0.09 ± 0.01^a	0.21 ± 0.01^b
$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	0.32 ± 0.00	0.30 ± 0.00
$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	0.34 ± 0.05	0.15 ± 0.01
% mol HV	8.3 ± 0.0^a	21.0 ± 0.5^b

^{a, b} Indica diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones de concentración de ácido valérico evaluadas según un análisis pareado (p valor ≤ 0.05).

Los copolímeros producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii* presentaron un PMP de 6,560 kDa con un IP de 2.1 a las 3 horas de cultivo, con una distribución de pesos moleculares homogénea. Este PMP e IP son similares a los obtenidos cuando se adiciona una menor concentración de ácido valérico (10 mM) (6,560 kDa; IP 2.8), es importante resaltar que independientemente de la concentración del precursor, este fue adicionado a las 6 horas de cultivo; por lo cual, se esperaría que los PMP fuera similar en ambas condiciones.

A las 12 horas de cultivo, se observa una incremento en el IP (2.8) acompañado de una disminución del PMP (6,430 kDa), mientras que, al final del cultivo el PMP fue de 6,540 kDa con un IP de 3.4 (Fig. 19). Al igual que, en los cultivos realizados a un concentración de 10 mM, no se observan cambios significativos en el PMP a lo largo de la fermentación.

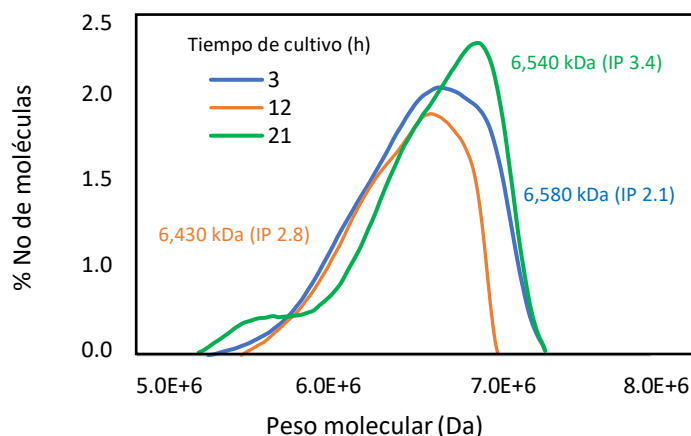


Figura 19. Distribución de pesos moleculares de los PHAs producidos a alta transferencia, en cultivos en lote de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, con la adición de ácido valérico (40 mM). Las líneas azules (---) hacen referencia a las 3 horas, las líneas naranjas (---) a las 12 horas y las líneas verdes (---) a las 21 horas de cultivo.

A pesar de que en este estudio no se llevó a cabo la evaluación de las propiedades termomecánicas de los materiales obtenidos, en la literatura se encuentran reportadas algunas propiedades térmicas y mecánicas con base en el porcentaje mol de 3HV presente en el copolímero. En la tabla 9 se observan las propiedades termomecánicas de copolímeros de PHBV con diferentes contenidos de 3HV, producidos por *A. chroococcum* 23 en cultivos en matraces agitados y con la adición de 60 mM de valerato. Como lo indican los autores, el incremento en el contenido de HV en el copolímero permitió disminuir la temperatura de fusión de 180 a 116.4 °C (Savenkova *et al.*, 2000). Una menor temperatura de fusión permite una mayor procesabilidad del material; además de mejorar la flexibilidad del polímero (Tebaldi *et al.*, 2019).

En el caso de la elongación a la ruptura, esta incrementa conforme incrementa el contenido de 3HV en el copolímero. Lo anterior indica que los copolímeros de PHBV son materiales más elásticos que el PHB, el cual tiende a ser un material rígido (Anjum *et al.*, 2016). Por último, los copolímeros de PHBV presentan una menor resistencia a la tracción, en comparación al PHB.

Tabla 9. Propiedades termomecánicas de P(3HB) y P(3HB)-co-3HV producidos en cultivos en matraces agitados de *A. chroococcum* 23, con la adición de 60 mM de ácido valérico (Savenkova *et al.*, 2000).

% mol 3HV	Temperatura fusión (°C)	Elongación a la ruptura (%)	Resistencia a la tracción (MPa)
0	180.0	5.6	29.9
8	164.3	177	20.6
10	163.2	355	23.4
13	161.0	490	16.4
17	124.4	800	19.2
18	123.0	680	23.2
20	116.4	690	21.5

En nuestro caso el mayor porcentaje de 3HV que se alcanzó en el copolímero fue de 21.0 ± 0.5 % cuando se adicionó 40 mM de ácido valérico en una condición de alta transferencia (20 mmol L⁻¹ h⁻¹).

Capítulo 3

PESO MOLECULAR VS COMPOSICIÓN MONOMÉRICA**9.4 Relación del peso molecular y composición monomérica del copolímero PHBV.**

Previamente se ha reportado que, el peso molecular determina diferentes propiedades termomecánicas de los polímeros de PHAs, tales como la resistencia mecánica y el comportamiento elástico (Iwata, 2005; Peña *et al.*, 2014). A su vez, el peso molecular depende de las condiciones de cultivo, y en el caso de los copolímeros puede depender de la composición monomérica (Khanna & Srivastava, 2005; Albuquerque *et al.*, 2011).

En la tabla 10 se presenta un resumen de los pesos moleculares promedio (PMP) a tiempo final del cultivo, para cada una de las estrategias de fermentación, $VTO_{\text{máx}}$ y concentración de precursor empleadas en este estudio; así como el contenido mol de 3HV obtenido al mismo tiempo de cultivo. Tanto para los cultivos realizados a baja transferencia ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) como a alta transferencia ($20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) no se observa un cambio significativo en el PMP. Esto contrasta con lo previamente reportado por Gómez (2020), quién observó que, en cultivos en lote de la cepa OP de *A. vinelandii* el PMP se ve afectado por la condición de oxígeno, siendo a baja transferencia ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) donde se promueve la producción de polímeros de alto peso molecular (8,300 kDa); mientras que, en un condición de más alta transferencia ($8\text{-}11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) el PMP disminuye a 3,500 kDa.

Tabla 10. Pesos moleculares promedio y porcentaje mol de 3HV de tiempo final de cultivo, de las diferentes estrategias de cultivo, VTOs y concentración del precursor empleadas en estudio, con la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Las desviaciones estándar corresponden a la desviación calculada del PMP de las réplicas biológicas.

Estrategia de fermentación	$VTO_{\text{máx}}$ ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Ácido valérico (mM)	% mol 3HV	peso molecular promedio (kDa)
Matraces	5	40	39.1 ± 2.9	$6,350 \pm 295$
Biorreactor	20	10	5.2 ± 0.1	$6,550 \pm 170$
Biorreactor	5	10	4.6 ± 0.1	$6,760 \pm 197$
Biorreactor	20	40	12.3 ± 0.9	$6,540 \pm 376$

Sin embargo, se ha reportado previamente que la cepa OPNA tiende a acumular un alto porcentaje del polímero, independientemente de la condición de oxígeno en la que se

encuentre (García *et al.*, 2014). Lo anterior indica que, la cepa OPNA no es tan sensible a los cambios en la concentración de oxígeno, como sí lo son otras cepa como la OP. Esto posiblemente se deba a que, en la cepa OPNA se inactivaron los genes que codifican para las proteínas RsmA y IIA^{Ntr}, las cuales regulan negativamente la síntesis de P(3HB) (Noguez *et al.*, 2008). Es posible que estas mutaciones hayan alterado a su vez los mecanismos de regulación (cambios en la relaciones de cofactores como NADH/NAD⁺), que se inducen bajo cierta condición de oxígeno.

Por otra parte, se observa que no hay una relación entre el contenido de 3HV y el PMP de los copolímeros producidos (Tabla 10). Esto difiere de lo reportado por Myshkina *et al.* (2010), quienes observaron que en los copolímeros de PHBV producidos por la cepa 7B de *A. chroococcum*, hay una relación inversa entre el porcentaje de 3HV y el PMP. En copolímeros con un contenido mol de 3HV de 21.6 % el PMP es más bajo (1,300 kDa), en comparación al PMP obtenido (1,490 kDa) en un copolímero con menor porcentaje de 3HV (13.1 %). En contraste a lo anterior Savenkova *et al.* (2000), observaron que en cultivos en matraces agitados de la cepa 23 de *A. chroococcum*, hay una relación directa entre el PMP y el contenido de 3HV, ya que, el PMP del copolímero (PHBV) incrementa de 1,365 kDa a 1,740 kDa, cuando el contenido mol de 3HV también incrementa (del 8 a 13 %). Es importante resaltar que en los estudios realizados por Savenkova *et al.* (2000) y Myshkina *et al.* (2010) no se reportan desviaciones estándar ni se indican si existen diferencias significativas entre los PMP cuando varía la composición de los polímeros.

Previamente se ha reportado que, el peso molecular es controlado por la actividad de la PHA sintasa (Rehm, 2003). La sintasa de clase I, (la cual está presente en *A. vinelandii* y *A. chroococcum*), se ha sugerido que es una de las sintasas más procesivas, esto significa que puede generar moléculas de mayor longitud sin reiniciar el proceso (Tian *et al.*, 2005; Gómez, 2020). Sin embargo, la procesividad depende de la proporción sustrato/enzima; cuando esta proporción es alta permite que la polimerización ocurra sin interrupciones (Tian *et al.*, 2005). En el caso de los copolímeros, se ha sugerido que los cambios en la radio de los monómeros (HB/HV) influyen sobre la composición monomérica de los copolímeros y la distribución del peso molecular (Iadevaia & Mantzaris, 2006). A su vez, los cambios en la relación HB/HV dependen de la fuente de carbono empleada para la producción de los monómeros y de la actividad de enzimas involucradas en su formación (Rehm, 2003; Iadevaia & Mantzaris, 2006).

Lo anterior sugiere que, si la proporción sustrato/enzima es lo suficientemente alta, la enzima producirá polímeros de manera ininterrumpida; mientras que, si la proporción sustrato/enzima es baja es más posible que la enzima se detenga, lo que se vería reflejado en una disminución en el peso molecular. Es posible que, en nuestros cultivos la proporción sustrato/enzima se mantenga estable por lo cual no hay un efecto en el peso molecular.

Finalmente, hemos encontrado que la composición monomérica puede modificarse sin afectar el peso molecular de los copolímeros de PHBV producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Desde un punto de vista tecnológico, esto permite obtener copolímeros de PHBV con diferentes propiedades termomecánicas, sin afectar parámetros ligados al peso molecular como la procesabilidad y el tiempo de degradación del material (Hong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Lo anterior abre la posibilidad de que estos materiales puedan ser empleados en aplicaciones de alto valor agregado como, por ejemplo, en las áreas biomédica y farmacéutica (Wang *et al.*, 2014).

10. CONCLUSIONES

- En los cultivos en biorreactores de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, al incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno incrementó el contenido mol de 3HV, lo que indica que la $VTO_{m\acute{a}x}$ tiene un efecto positivo sobre la síntesis de los monómeros de 3HV en el copolímero de PHBV.
- En los cultivos realizados en matraces agitados de la cepa OPNA de *A. vinelandii* la adición del precursor (40 mM) tiene un efecto negativo sobre el crecimiento, acumulación y producción de PHAs. Sin embargo, permitió obtener un porcentaje mol de 3HV de $39.1 \pm 2.9 \%$ en el copolímero de PHBV. Hasta donde sabemos este porcentaje es el más alto reportado para cepas de *A. vinelandii*.
- En cultivos en biorreactor de la cepa OPNA, la disminución en la concentración del precursor permitió incrementar en un 37 % la acumulación y en un 50 % la producción de PHAs. Sin embargo, disminuyó en un 61 % el contenido de 3HV en el copolímero.
- En los cultivos en biorreactor se observó que, al incrementar la concentración del precursor disminuye la distribución del carbono canalizado a la síntesis de los monómeros de 3HV en el copolímero PHBV.
- Los pesos moleculares obtenidos en matraces agitados y biorreactores no presentan diferencias significativas entre sí, lo que indica que no existe una relación entre el contenido mol de 3HV, y los pesos moleculares de los copolímeros producidos por la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

11. PERSPECTIVAS

- Debido a que un gran porcentaje del precursor (ácido valérico) no se desvía a la producción de los monómeros de 3HV, sería importante realizar un estudio más fino sobre la distribución de flujo de carbono y sobre cómo la concentración de cofactores como $[NADH] / [NAD]$ y $[FADH_2] / [FAD]$ influyen sobre dicha distribución.
- En este proyecto se obtuvieron copolímeros con diferentes porcentajes mol de 3HV, por lo cual, sería interesante realizar las caracterizaciones termo-mecánicas de los materiales producidos.
- Con el fin de disminuir el efecto de la concentración del precursor se podrían realizar cultivos en biorreactor, siguiendo una estrategia de alimentación por pulsos o alimentada exponencialmente.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson AJ & Dawes EA. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, MN., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>.
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 732-743. <https://doi.org/10.1002/jctb.2392>.
- Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>
- Aoyagi, Y., Doi, Y., & Iwata, T (2003) Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: effects of annealing and two-step drawing. *Polymer Degradation and Stability* 79(2):209–216. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00273-2).
- Baronofsky, J. J., Schreurs, W. J., & Kashket, E. R. (1984). Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied. Environmental. Microbiology.*, 48(6), 1134-1139.
- Bonartsev, A. P., Zharkova, I. I., Yakovlev, S. G., Myshkina, V. L., Mahina, T. K., Voinova, V. V., Kuznetsova, E. S. (2017). Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: A precursor feeding strategy. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2), 173-184. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1188317>.
- Blunt, W., Sparling, R., Gapes, DJ., Levin, DB., & Cicek, N., (2018) The role of dissolved oxygen content as a modulator of microbial polyhydroxyalkanoate synthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2488-6>.
- Brigham, C.J., Zhila, N., Shishatskaya, E., Volova, T.G. & Sinsky, A.J. (2012). Manipulation of *Ralstonia eutropha* carbon storage pathways to produce useful bio-

- based products. *Subcell Biochem.* 64:343-66. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5055-5_17.
- Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 91-98. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00106-6)
- Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., & Schneider, K. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly (3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*, 48(7), 995-1003. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.014>.
- Castillo, T., Flores, C., Segura, D., Espín, G., Sanguino, J., Cabrera, E., & Peña, C. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(7), 1809-1816. <https://doi.org/10.1002/jctb.5182>.
- Cavalheiro, J. M., Raposo, R. S., de Almeida, M. C. M., Cesário, M. T., Sevrin, C., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. M. R. (2012). Effect of cultivation parameters on the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, 111, 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.176>.
- Chang, HM., Wang, ZH., Luo, HN., Xu, M., Ren, XY., Zheng, GX., & Jing, XH. (2014). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(7), 533-539. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20143930>.
- Chung, Y. J., Cha, H. J., Yeo, J. S., & Yoo, Y. J. (1997). Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(5), 492-495. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)83009-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)83009-7).
- Díaz-Barrera, A., Peña, C., & Galindo, E. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 903-910. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1060-3>
- Doi Y, & Steinbüchel, A. (2002) Biopolymers, polyesters III-applications and commercial products (Vol. 4). Wiley-Blackwell. 275-290.

- Espín, G. 2002. Biología de *Azotobacter vinelandii*. En: Microbios en línea. Editores: Martínez-Romero E y Martínez-Romero J.L. Dirección en línea. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios>.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6(1), 7-23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>.
- García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña C. (2014). High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in P(3HB) regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.020>
- García, A. (2014). Producción de poli-B-hidroxibutirato en cultivos multietapas y en lote alimentado usando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México, pp 28-39.
- García, A., Ferrer, P., Albiol, J., Castillo, T., Segura, D., & Peña, C. (2018). Metabolic flux analysis and the NAD (P) H/NAD (P)+ ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0860-8>.
- García, A. Perez,D. Castro,M. Urtuvia,V. Castillo,T. Diaz-Barrera, A. Espin,G. Peña ,C. (2019). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) of ultra-high molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94, 1853-1860.
- Gómez, K. (2015). Capacidad viscosificante del alginato producido por *Azotobacter vinelandii* en cultivos en matraces agitados sometidos a bajos consumos de potencia. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México, pp 38-39.
- Gómez, E. (2020). Influencia de la traferencia de oxigeno bajo condiciones de microaerofilia sobrel el peso molecular del poli-3-hidroxibutirato (P3HB) en las cepas mutantes phbZ1 y OP de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México, pp 58- 60.
- Gutiérrez-Rojas, I., Torres-Geraldo, AB., Moreno-Sarmiento, N. (2011). Optimising carbon and nitrogen sources for *Azotobacter chroococcum* growth. *African Journal of Biotechnology*, 10(15), 2951-2958. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1484>.
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes

- phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiology*, 157(11), 3014-3023.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.051649-0>
- Hokamura, A., Wakida, I., Miyahara, Y., Tsuge, T., Shiratsuchi, H., Tanaka, K., & Matsusaki, H. (2015). Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(3), 305-310.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.022>
- Hong, SW., Hsu, HW., and Ye, MT. (2013) Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 111: 1243– 1250. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2503-3>
- Iadevaia, S., & Mantzaris, NV. (2006). Genetic network driven control of PHBV copolymer composition. *Journal of Biotechnology*, 122(1), 99-121.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.030>
- Iwata T. (2005). Strong fibers and films of microbial polyesters. *Macromolecular Bioscience*, 5(8), 689-701. <https://doi.org/10.1002/mabi.200500066>
- Jackson, FA & Dawes, EA (1976). Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *Microbiology*, 97(2), 303-312.
- Juengert, J., Bresan, S., & Jendrossek D. (2018). Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile red staining. *Biological Protocol*, 8, 27-48. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2748>
- Kawashima, Y., Cheng, W., Mifune, J., Orita, I., Nakamura, S., Fukui, T. (2012). Characterization and functional analyses of R-specific enoyl coenzyme A hydratases in polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha*. *Applied Environmental Microbiology*, 78(2), 493-502. <https://doi.org/10.1128/AEM.06937-11>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Klimek, J., & Ollis, D. F. (1980). Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(11), 2321-2342.
<https://doi.org/10.1002/bit.260221109>
- Lee, W. H., Azizan, M. N., & Sudesh, K. (2004). Effects of culture conditions on the composition of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by

- Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability*, 84(1), 129-134.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2003.10.003>
- Loo, C. Y., & Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2(2), 31-57.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.020>
- Lozano, E., Galindo, E., & Peña, CF. (2011). Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and no oxygen-limited conditions. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-13>
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Madison, LL & Huisman, GW. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21-53.
- Maier, U & Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 99-106.
[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00107-8).
- Martínez-Valenzuela, M., Guzmán, J., Moreno, S., Ahumada-Manuel, C. L., Espín, G., & Núñez, C. (2018). Expression of the sRNAs CrcZ and CrcY modulate the strength of carbon catabolite repression under diazotrophic or non-diazotrophic growing conditions in *Azotobacter vinelandii*. *PloS One*, 13(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208975>.
- Matsusaki, H., Abe, H., & Doi, Y. (2000) Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas sp.* *Biomacromolecules*, 22:1–17 <https://doi.org/10.1021/bm9900040>.
- Mendonça, TT., Tavares, RR., Cespedes, LG., Sánchez-Rodríguez, RJ., Schripsema, J., Taciro, MK., & Silva, LF. (2017). Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 654-663.
- Millán, M., Segura, D., Galindo, E., & Peña, C. (2016). Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is determined by the ratio of synthesis and degradation under fixed dissolved oxygen tension. *Process Biochemistry*, 51(8), 950-958. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.013>.

- Millán, M (2017). Estudio de los procesos de polimerización y de polimerización de poli-3-hidroxi-*butirato* (P3HB) en cultivos de *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones controladas de tensión de oxígeno disuelto. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México, pp 28-33.
- Muhammadi, Shabina., Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56-77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>.
- Myshkina, V. L., Nikolaeva, D. A., Makhina, T. K., Bonartsev, A. P., & Bonartseva, G. A. (2008). Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(5), 482-486. <https://doi.org/10.1134/S0003683808050050>.
- Myshkina, V. L., Ivanov, E. A., Nikolaeva, D. A., Makhina, T. K., Bonartsev, A. P., Filatova, E. V., Bonartseva, G. A. (2010). Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Azotobacter chroococcum* strain 7B. *Applied biochemistry and microbiology*, 46(3), 289-296. <https://doi.org/10.1134/S0003683810030075>.
- Noda, I., Green, PR., Satkowski, MM., & Schechtman, LA. (2005). Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biomacromolecules*, 6(2), 580-586. <https://doi.org/10.1021/bm049472m>
- Noda, I., Lindsey, SB., & Caraway, D. (2010). Nodax™ class PHA copolymers: their properties and applications. In *Plastics from Bacteria*, 237-255. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(4), 244-254. <https://doi.org/10.1159/000108658>.
- Page, W. J., Manchak, J. A. N. E. T., Rudy, B. R. E. N. T. (1992). Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied Environmental Microbiology*, 58(9), 2866-2873.
- Page, W. J., & Manchak, J. (1995). The role of β -oxidation of short-chain alkanates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 106-114. <https://doi.org/10.1139/m95-176>.

- Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo-Uribe, A., & Segura, D. (2014). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, 64(1), 39-47. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0630-0>.
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(3), 233-247. <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>.
- Pozo, C., Martínez-Toledo, M. V., Rodelas, B., & Gonzalez-Lopez, J. (2002). Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *Journal of Biotechnology*, 97(2), 125-131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00056-1).
- Prieto, A., Escapa, IF., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Revelles, O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 18(2), 341-357. <https://doi.org/10.1111/1462-2920>.
- Ramírez, RD. (2011). Optimización de un medio de cultivo para la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) utilizando cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, México, pp 35-38.
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>.
- Reddy CSK., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, 87(2), 137-146. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2).
- Rehm, B. H. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15-33. <https://doi.org/10.1042/bj20031254>.
- Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., & Thöny-Meyer, L. (2009). Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation?. *Biomacromolecules*, 10(4), 916-922. <https://doi.org/10.1021/bm801431c>.
- Ryu, HW., Cho, KS., Goodrich, PR., Park, CH. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD using swine wastewater: Effect of supplementing glucose, yeast extract, and inorganic salts. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(6), 651-658. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0072-x>.

- Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I., & Kalnin, M. (2000). Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochemistry*, 36(5), 445-450. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00235-1).
- Scheidle, M., Dittrich, B., Klinger, J., Ikeda, H., Klee, D., Büchs, J. (2011). Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics. *BMC Biotechnology*, 11(1), 25-36. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-25>.
- Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology*, 179(6), 437-443. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0553-4>.
- Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F., & Dawe, E.A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 128(5), 1193-1201. <https://doi.org/10.1042/bj1281193>.
- Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Curatti, L. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534-4545. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-09>.
- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., Valentin, H. (1992). Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2-4), 217-230. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90313-D](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90313-D)
- Sudesh, K., & Doi, Y. (2005). Polyhydroxyalkanoates. *Handbook of biodegradable polymers*, 219-256.
- Tappel, R. C., Pan, W., Bergey, N. S., Wang, Q., Patterson, I. L., Ozumba, O. A., Nomura, C. T. (2014). Engineering *Escherichia coli* for improved production of short-chain-length-co-medium-chain-length poly [(R)-3-hydroxyalkanoate] (SCL-co-MCL PHA) copolymers from renewable nonfatty acid feedstocks. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(7), 1879-1887. <https://doi.org/10.1021/sc500217p>.
- Tebaldi, M. L., Maia, A. L. C., Poletto, F., Andrade, F., & Soares, D. C. F. (2019). Poly (-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis

- methodologies, antitumor applications and biocompatibility. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.007>.
- Tian, J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2005). Class III polyhydroxybutyrate synthase: involvement in chain termination and reinitiation. *Biochemistry*, 44(23), 8369-8377. <https://doi.org/10.1021/bi050331u>.
- Tinoco R, (1993) Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *A. vinelandii*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México, pp 49-52.
- Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., Díaz-Barrera, A. (2020). Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *A. vinelandii* with different 3HV fraction in shaken flasks and bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1-10 <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02340-6>.
- Vela, G. R., & Rosenthal, R. S. (1972). Effect of peptone on *Azotobacter morphology*. *Journal of bacteriology*, 111(1), 260-266.
- Verlinden, RA., Hill, DJ., Kenward, MA., Williams, CD., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672>.
- Visser, A. S., & Postma, P. W. (1973). Permeability of *Azotobacter vinelandii* to cations and anions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 298(2), 333-340.
- Volova, T. G., & Kalacheva, G. S. (2005). The synthesis of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate copolymers by the bacterium *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*, 74(1), 54-59. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0028-5>.
- Wang, Y., Yin, J., & Chen, G. Q. (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001>.
- Zeng A-P, Byun T, Posten C, Deckwer W-D (1994) Use of the respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under micro-aerobic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 19:1107–1114. <https://doi.org/10.1002/bit.260440912>.