



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

**DETERMINACIÓN DEL CRITERIO DE ESCALAMIENTO
PARA LA PRODUCCIÓN DE LACTATOS CON *Escherichia
coli* RECOMBINANTE**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

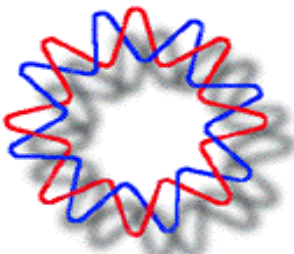
P R E S E N T A

ING. BIOLÓGICA ESTEFANÍA SIERRA IBARRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE DE 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT 41171 y el proyecto de Estímulos de la Innovación ProInnova.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Agustín López Munguía Canales..... Instituto de Biotecnología/UNAM

Dr. Leobardo Serrano Carreón..... Instituto de Biotecnología/UNAM

Dr. Alfredo Martínez Jiménez..... Instituto de Biotecnología/UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente..... Dr. Joel Osuna Quintero

Secretario..... Dra. Marcela Ayala Aceves

Vocal..... Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

Suplente..... Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Suplente..... Dr. Daniel Genaro Segura González

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Hernando y Gloria, por su apoyo incondicional en todos los proyectos que he emprendido en mi vida.

A mi tutor, el Dr. Alfredo Martínez, por su valiosa ayuda, sus consejos y sugerencias, y por contribuir a mi formación; gracias a sus numerosas enseñanzas he crecido y madurado profesional y personalmente.

A los miembros de mi comité tutorial por los valiosos aportes que dieron al proyecto durante el transcurso de la maestría.

A los miembros del jurado por los comentarios y sugerencias con respecto a la tesis.

A mis amigos en México y Colombia por estar a mi lado siempre, gracias a su apoyo he logrado salir adelante en mi vida.

Al Biólogo Mario Alberto Caro B. por su ayuda con los fermentadores de 100 L y aguantar mis lloriqueos en la Planta Piloto. Tu buen humor me alegraba el día.

A la I. Q. Verónica Albíter por el apoyo con los fermentadores de 10 L en la Planta Piloto.

A la M. C. Georgina Hernández Chávez por el apoyo con los análisis de muestras en el HPLC.

Al M. C. Ramón de Anda por el apoyo con los fermentadores de 1 L y demás requerimientos de la Unidad de Fermentaciones del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas.

A Mercedes Enzaldo (Mechita) y Aurelia González (Aure) por toda la ayuda que me brindaron en mi trabajo en el laboratorio. En especial por su cariño y sonrisas sinceros.

A todos los estudiantes y personal académico del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y Unidad de Escalamiento y Planta Piloto por su valiosa ayuda y aportaciones.

A esa persona especial que siempre estuvo a mi lado. Sin ti no habría podido concluir esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
NOMENCLATURA.....	VII
1. RESUMEN.....	1
1.2 ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 Métodos de síntesis de lactato.....	6
3.2 Microorganismos.....	6
3.3 Producción de D-lactato.....	9
3.4 Escalamiento.....	10
3.5 Efecto del oxígeno.....	16
3.6 Control de pH con diferentes bases.....	18
3.6.1 KOH.....	19
3.6.2 Ca(OH) ₂	20
3.6.3 NH ₄ OH.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivos específicos.....	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1 Microorganismos.....	24
7.2 Medio de cultivo.....	24
7.3. Preparación del inóculo.....	25
7.4 condiciones de operación.....	26
7.5 Mini- fermentadores de 200 mL.....	26

7.6 Fermentaciones en 1 litro.....	28
7.6.1. Estudio de la velocidad de agitación.....	28
7.6.2 Estudio de la velocidad de aireación.....	28
7.7 Fermentaciones en 11 litros.....	29
7.8 Fermentaciones en 85 litros y 110 L.....	29
7.9 Métodos analíticos.....	31
7.9.1 Determinación de la concentración celular.....	31
7.9.2 Determinación de ácidos orgánicos.....	32
7.9.3 Determinación de la concentración de glucosa.....	32
7.10 Parámetros cinéticos y estequiométricos.....	32
7.10.1 Factor de dilución (F_d).....	32
7.10.2 Velocidad específica de crecimiento (μ).....	33
7.10.3 Rendimiento lactato/glucosa ($Y_{P/S}$).....	33
7.10.4 Productividad volumétrica de lactato.....	33
7.11 Cálculo del k_{La}	34
7.11.1 Experimental.....	34
7.11.2 Basado en ecuaciones empíricas.....	34
7.12 Escalamiento.....	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
8.1 Cultivos en mini-fermentadores de 200 mL. Medio AM2-glc. 80 g/L.....	38
8.2 Estudio de la velocidad de agitación en fermentadores de 1 L.....	40
8.3 Estudio de la velocidad de aireación en fermentadores de 1 L.....	44
8.4 Selección de la condición para el escalamiento de la fermentación de glucosa a lactato con JU15A.....	48
8.5 Cálculo del k_{La} en el fermentador de 1 L y las condiciones de cultivo para mantenerlo en fermentadores de 11 litros.....	50
8.6 Fermentación láctica en 11 L.....	51
8.7 Fermentación láctica en 85 L.....	54
8.8 Fermentación láctica en 110 L.....	57

8.9 Fermentación utilizando la cepa L-lactogénica LL26 en 1 y 11 L.....	60
8.10. Cultivos en fermentadores de 1 L suspendiendo la aireación al llegar a fase estacionaria.....	63
8.11. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}).....	66
9. CONCLUSIONES.....	67
10. PERSPECTIVAS.....	68
11. BIBLIOGRAFÍA.....	69
APÉNDICES.....	74
Apéndice A. Fermentación láctica en 11 L controlando pH con diferentes bases. Medio AM2-glucosa 120 g/L.....	74
Apéndice B. Curvas de oxígeno disuelto para las fermentaciones en 11, 85 y 110 L.....	81
Apéndice C. Perfil de temperatura en el fermentador de 110 L.....	83
Apéndice D. Interdependencia de los criterios de escalamiento más ampliamente utilizados.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de la cepa de <i>Escherichia coli</i> JU15.....	8
Figura 2. Tren de inoculación de los fermentadores.....	26
Figura 3. Mini-fermentadores de 200 mL.....	27
Figura 4. Esquema y fotografía del fermentador de 1 L.....	28
Figura 5. Esquema y fotografía del fermentador de 11 L	29
Figura 6. Fermentador de 85 L y 110 L.....	30
Figura 7. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato con JU15A en mini-fermentadores de 200 mL, no aireados y 70 g/L de glucosa inicial.....	38
Figura 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en los cultivos con mini-fermentadores a 40 y 70 g/L de glucosa inicial.....	39
Figura 9. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de D-lactato a 60 rpm, con previa eliminación del aire presente en la parte superior del fermentador, en fermentadores de 1 L y 73 g/L de glucosa inicial.....	41
Figura 10. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de D-lactato a 400 rpm, con previa eliminación del aire presente en la parte superior del fermentador, en fermentadores de 1 L y 80 g/L de glucosa inicial.	41
Figura 11 Comparación de parámetros cinéticos entre cultivos en mini-fermentadores (150 rpm, glucosa 70 g/L y sin eliminar el aire en la parte superior del fermentador) y cultivos en fermentador de 1 litro a 60 y 400 rpm (glucosa 73 y 80 g/L, respectivamente, eliminando el aire en la parte superior del fermentador).....	42
Figura 12. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para los cultivos a diferentes velocidades de aireación	45
Figura 13. Cinéticas de oxígeno disuelto para los cultivos a diferentes velocidades de aireación.....	46
Figura 14. Parámetros cinéticos y estequiométricos para los cultivos a diferentes velocidades de aireación en fermentador de 1 L	47
Figura 15. Comparación de cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para fermentadores de 1 y 11 L con un mismo k_{La}	52
Figura 16. . Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentadores de 1 y 11 L con un mismo k_{La}	53

Figura 17. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para el cultivo a 85 L.....	54
Figura 18. Parámetros cinéticos y estequiométricos en los cultivos de 85.....	55
Figura 19. Perfil de temperatura en el fermentador de 85 L.....	56
Figura 20. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato en los cultivos de 110 L.....	58
Figura 21. Parámetros cinéticos y estequiométricos en los cultivos de 110 L.....	58
Figura 22. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para LL26 en fermentadores de 1 L (0.1 vvm, 400 rpm) y 11 L.(0.1 vvm, 180 rpm).....	61
Figura 23. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con LL26 en fermentadores de 1 y 11 L	62
Figura 24. Parámetros cinéticos y estequiométricos en las diferentes escalas estudiadas manteniendo un $k_L a$ constante de 10.9 h^{-1}	63
Figura 25. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para fermentaciones en 1 L suspendiendo (a las 12 h del cultivo) y sin suspender aireación..	64
Figura 26. Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentaciones en 1 L suspendiendo y sin suspender aireación.....	65
Figura 27. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para fermentadores de 11 L con 120 g/L de glucosa inicial y control de pH con diferentes bases.....	76
Figura 28. Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentadores de 11 L con 120 g/L de glucosa inicial y control de pH con diferentes bases.....	76
Figura 29. Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentadores de 11 L con 80 y 120 g/L de glucosa inicial y control de pH con diferentes bases $t=30 \text{ h}$	77
Figura 30. Curva de oxígeno disuelto en los fermentadores de 11 L.....	81
Figura 31. Curva de oxígeno disuelto en los fermentadores de 85 L.....	81
Figura 32. Curva de oxígeno disuelto en los fermentadores de 110 L.....	82
Figura 33. Perfil de temperatura en el fermentador de 110 L.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo AM2.....	24
Tabla 2. Dimensiones de los fermentadores.....	30
Tabla 3. Accesorios de los fermentadores.....	31
Tabla 4. Valores correspondientes de k_{La} para cada velocidad de aireación ensayada...44	

NOMENCLATURA

C^* =Solubilidad del oxígeno en el medio [$\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$]

C_L =Concentración de oxígeno disuelto en un tiempo determinado [$\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$]

D =Diámetro del impulsor [m]

D_i =Relación del diámetro del impulsor respecto al fermentador [-]

D_T =Diámetro del fermentador [m]

F_d =Factor de dilución [-]

g =Aceleración gravitacional [m/s^2]

H_L =Altura del líquido [m]

H_T =Altura del fermentador [m]

k_{La} = Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h^{-1}]

M =Relación del ancho de la mampara respecto al diámetro del fermentador [-]

N =Velocidad de agitación [min^{-1}]

OTR =Velocidad de transferencia de oxígeno [$\text{mmol}_{\text{O}_2}/\text{L.h}$]

P_f =Concentración final alcanzada de lactato [$\text{g}_{\text{lactato}}/\text{L}$]

P_i =Concentración inicial de lactato [$\text{g}_{\text{lactato}}/\text{L}$]

P/V =Potencia por unidad de volumen [W/m^3]

P_g/V =Potencia gaseada por unidad de volumen [W/m^3]

P_0 =Número de potencia específico de cada impulsor [-]

Q_G =Flujo volumétrico de gas [m^3/s]

Q_p =Productividad volumétrica de lactato [$\text{g}_{\text{lactato}}/\text{L.h}$]

S_f =Concentración final de glucosa [$\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{L}$]

S_i =Concentración inicial de glucosa [$\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{L}$]

t =Tiempo en cualquier punto de la fase exponencial [h]

t_0 =Tiempo de inicio de la fermentación [h]

V_B =Volumen de base añadida [mL]

V_i =Volumen inicial de trabajo [mL]

V_L =Volumen de trabajo [L]

V_N =Volumen nominal del reactor [L]

V_{tip} =Velocidad en la punta del impulsor (m/s)

v_s = Velocidad superficial de aireación [m/s]

X =Concentración de biomasa en cualquier punto de la fase exponencial [g_{DCW}/L]

X_0 =Concentración inicial de biomasa [g_{DCW}/L]

$Y_{P/S}$ =Rendimiento global de lactato/glucosa [$g_{lactato}/g_{glucosa}$]

η =Viscosidad del medio de cultivo (cp)

ρ_L =Densidad del medio [Kg/m^3]

μ =Velocidad específica de crecimiento [h^{-1}]

RESUMEN

1. RESUMEN

La inminente escasez del petróleo así como el deterioro ambiental que causan éste y sus derivados, hacen necesaria la búsqueda de alternativas que los suplan. Entre éstas se encuentran los bioplásticos: polímeros plásticos o precursores de polímeros, producidos por microorganismos a partir de diversas fuentes de carbono, que se perfilan como una buena alternativa a los polímeros derivados del petróleo. Una de estas opciones son los poli-lactatos (PLA), sintetizados a partir de los isómeros de L y D –lactato, que son metabolitos producidos naturalmente por diferentes microorganismos. *Escherichia coli* es uno de estos microorganismos productores, que presenta ventajas como su facilidad de crecer en medios mínimos y ser facultativo. Sin embargo, la capacidad productora de cepas nativas es baja, por lo que se han modificado por Ingeniería de vías metabólicas con el fin de generar cepas productoras de lactato como metabolito principal (homolácticas) de *E. coli*. En el presente trabajo se evaluó el efecto del aumento de escala en la producción de D- lactato con la cepa recombinante de *E. coli* JU15A ($\Delta pf1B \Delta adhE \Delta frdA, \Delta xy1FGH$), utilizando como criterio de escalamiento el k_{La} en cultivos microaireados.

Se encontró que el uso de bajas velocidades de aireación favorece la productividad volumétrica de D-lactato en fermentadores de 1 L con la cepa de *E. coli* JU15A, utilizando glucosa como fuente de carbono. Asimismo, se concluyó que un k_{La} de 10.9 h^{-1} es un criterio de escalamiento adecuado para la producción de D-lactato con la cepa JU15A en reactores de 11 y 110 L. La productividad volumétrica de lactato fue similar a la encontrada para los fermentadores de 1 L, así como un rendimiento lactato/glucosa cercano al máximo teórico. Resultados de crecimiento, productividad volumétrica y rendimiento obtenidos para la producción de L-lactato con la cepa isogénica LL26 ($\Delta pf1B, \Delta adhE, \Delta frdA, ldhA::lctE$), validan el uso de k_{La} como un criterio adecuado para el escalamiento de la producción de lactatos con cepas de *E. coli* recombinantes.

ABSTRACT

1.2 ABSTRACT

Due to the imminent shortage of petroleum oil, as well as the environmental damage caused by its derivatives, the search for alternatives to replace some derivatives of fossil fuels has become necessary. Bioplastics are within these alternatives, they are plastic polymers or polymer precursors produced by microorganisms from different carbon sources, which are considered a good alternative to petroleum derivate polymers. One of these options is poly lactic acid or PLA, a biopolymer synthesized from L and D-lactate isomers, which can be produced by a wide range of microorganisms. *Escherichia coli* is one of these producers and its importance lies on the facility that this bacteria has to grow in minimal media and its easy adaptation to aerobic and anaerobic environments. However, wild type strains have a low-producing capability. Therefore, they have been modified by metabolic pathway engineering with the aim of generating homolactic *E. coli* strains. In this work, the effect of the scale up in D-lactate production by *E. coli* JU15A ($\Delta pf1B$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xy1FGH$) was studied and the k_{La} was used as the scale up criterion.

It was found that low aeration rates improve the volumetric productivity of D-lactate from glucose in 1 L fermentors. Also, it was concluded that a k_{La} value about 11 h^{-1} is an adequate scale up value for D-lactate production in 11 and 110 L fermentors, keeping the volumetric productivity values similar to such obtained for 1 L cultures. Furthermore, the D-lactate/glucose yield was close to the maximum theoretical yield for these three scales. Results for grow, volumetric productivity and yield for L-lactate production with isogenic *E. coli* LL26 ($\Delta pf1B$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $ldhA::lctE$), show that k_{La} is a good criterion for scaling-up D or L-lactate production with recombinant *E. coli*.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

El lactato tiene un amplio rango de usos a nivel industrial, entre estos se encuentran el de acidulante, neutralizante de pH, emulsionante e inhibidor bacteriano en la industria de alimentos procesados; igualmente, tiene aplicación en las áreas farmacéutica y cosmética, así como en la producción de disolventes limpios, reguladores de crecimiento de plantas e intermediarios químicos (Tokushiro *et al.*, 2009; Maeda *et al.*, 2009). Recientemente, la producción de lactato ha cobrado gran importancia debido a su potencial uso como material de inicio para la síntesis de ácido poli – láctico (PLA), un polímero plástico biodegradable (Miura *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2009). La relevancia de este tipo de biopolímeros se debe a que constituyen alternativas a los plásticos derivados del petróleo, recurso no renovable cuya escasez se pronostica en un futuro no muy lejano. Por otra parte, los PLA, a diferencia de los polímeros sintéticos, son amigables con el medio ambiente ya que pueden ser producidos a partir de material agrícola, por lo que se disminuirían las emisiones netas de carbono a la atmósfera. Dichos compuestos también pueden ser degradados por algunos microorganismos del suelo, evitando así su acumulación en el ambiente (Okano *et al.*, 2009).

Inicialmente la atención se centró en la obtención del esteroisómero L-lactato como precursor de la síntesis de PLA (Miura *et al.*, 2003). No obstante, investigaciones más recientes demostraron que los polímeros de tipo estereocomplejo, es decir, compuestos de L y D-lactato, son altamente termoestables por lo que se hace importante la producción de ambos esteroisómeros, siendo el L-lactato el que se requiere en mayor proporción. La cantidad relativa de cada isómero en el PLA determinará las características fisicoquímicas de éste (Okano *et al.*, 2009; Trujillo Martínez, 2008).

El lactato puede ser producido por síntesis química o a través de biotecnología, vía fermentación. Con la primera se obtienen mezclas racémicas de L y D lactato; mientras que la segunda permite la síntesis de isómeros ópticamente puros, siendo entonces más ventajosa para la producción de lactatos destinados a la generación de PLA (Trujillo

INTRODUCCIÓN

Martínez, 2008). Los microorganismos más utilizados en la fermentación láctica son las bacterias ácido-lácticas (LAB); sin embargo, éstos presentan requerimientos nutricionales complejos, en especial de fuentes de nitrógeno, aumentando así los costos del proceso (Zhu y Shimizu, 2005). La utilización de microorganismos capaces de crecer y producir lactatos en medios de composición simple, constituye una buena opción para la producción de compuestos de bajo valor agregado, como son los utilizados en la síntesis de PLA. *Escherichia coli* es una bacteria que cumple con esta característica, además su capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono la hace promisoría para la obtención de lactato a partir de residuos agroindustriales (Trujillo Martínez, 2008; Zhou *et al.*, 2003).

Debido a la gran variedad de aplicaciones industriales, la demanda de lactato a nivel mundial ha aumentado considerablemente en los últimos años, llegando a un valor aproximado de 259 mil toneladas métricas en el año 2008 y estimándose un aumento de 7 a 10% para el 2013, en especial en lactatos para síntesis de PLA (Malveda *et al.*, 2009). El D-lactato en particular tiene gran demanda, pues este isómero no es producido a nivel industrial. Por otra parte, se espera un incremento en la demanda de ésteres y sales de lactato para su utilización en la industria farmacéutica, siendo estos productos de alto valor agregado. Los principales consumidores de lactato son Estados Unidos, algunos países de Europa Occidental y China, seguidos en una proporción menor por América Central y del Sur, Japón y Europa Oriental. Existen varias empresas en el mundo que producen lactato a gran escala, entre estas se cuentan PURAC, NatureWorks, Sterling Chemicals, Archer Daniels Midland y Masashino (Maeda *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, se han obtenido cepas de *Escherichia coli* modificadas por ingeniería de vías metabólicas, que tienen la capacidad de sintetizar D o L- lactato como producto de fermentación mayoritario (Utrilla Carreri, 2010; Leal Reyes, 2010). Estos microorganismos han sido evaluados en el laboratorio, obteniéndose

INTRODUCCIÓN

rendimientos de conversión de azúcares en lactatos superiores al 90% del máximo teórico. Sin embargo, para determinar su potencial aplicación a nivel industrial, se requiere evaluar su capacidad de producción en reactores de escala piloto.

De acuerdo al contexto descrito, en este trabajo se pretende determinar el criterio de escalamiento que permita mantener los rendimientos y productividades obtenidas a nivel de laboratorio (0.2 L); así como reproducibilidad en cada cambio de escala hasta alcanzar 100 litros, utilizando cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería de vías metabólicas para obtener D o L-lactato.

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 Métodos de síntesis

La síntesis de lactato se puede realizar por métodos químicos o biotecnológicos; el proceso comercial para la síntesis química se basa en el lactonitrilo, el cual se obtiene por oxidación de etileno a acetaldehído y posterior reacción de este último con cianuro de hidrógeno a alta presión y temperatura; la hidrólisis ácida del lactonitrilo produce una mezcla racémica de D y L-lactato (Bicker *et al.*, 2005). No obstante los costos más bajos y la alta productividad que se alcanza con los métodos químicos (Bicker *et al.*, 2005), a nivel industrial se prefiere el proceso biológico, ya que se puede obtener cada esteroisómero ópticamente puro, de tal modo que es posible manipular la cantidad relativa de cada uno en la síntesis de PLA. Adicionalmente, la presión y temperatura requeridas para la fermentación láctica son significativamente menores, hecho que se ve reflejado en los costos finales de producción (Trujillo Martínez, 2008). Entre los microorganismos que más se han utilizado en procesos se encuentran algunas especies de *Rizhopus* (Miura *et al.*, 2003), cuyo proceso de producción se conduce en ambientes aerobios, y bacterias como *Lactobacillus*, que llevan a cabo la producción en condiciones no aireadas, condiciones bajo las cuales producen lactato a partir de piruvato con el fin de regenerar poder reductor (Zhu y Shimizu, 2005; Shukla *et al.*, 2004).

3.2 Microorganismos

Existe una gran variedad de microorganismos utilizados en la producción de lactato, entre los que se encuentran hongos como *Mucor*, *Monilia* y *Rhizopus* y las bacterias de géneros como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Trujillo Martínez, 2008; Zhou *et al.*, 2003). De todos estos microorganismos, los utilizados a nivel industrial son las bacterias ácido lácticas

ANTECEDENTES

(LAB), en especial los provenientes del género *Lactobacillus*, debido a su alta tolerancia al ácido y capacidad de ser modificados genéticamente para la producción de L y D-lactato (Zhou *et al.*, 2003). Sin embargo, su aplicación a nivel comercial está restringida a un mercado de alto valor agregado, debido a la necesidad de complementos nutricionales en el medio de cultivo, en especial compuestos nitrogenados, ya que las LAB tienen limitada habilidad para producir sus propios factores de crecimiento. La producción de lactatos para ser utilizados en la síntesis de PLA, requiere de un proceso sencillo, robusto y de bajo costo para poder ser usado en grandes volúmenes.

Entre las bacterias promisorias para la producción de lactatos y otros productos a nivel industrial, se encuentra *E. coli* debido a su rápido crecimiento en condiciones tanto aerobias como anaerobias y en medios minerales suplementados con diferentes fuentes de carbono, además de su capacidad de metabolizar hexosas y pentosas, y por tanto poder utilizar los azúcares provenientes de la hidrólisis de la lignocelulosa (Utrilla Carreri, 2010). Sin embargo, estas bacterias son de tipo heterofermentativo, por lo cual se requiere modificarlas para minimizar la formación de otros productos de fermentación (Utrilla *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2003; Zhu y Shimizu, 2005; Zhu *et al.*, 2007).

En el Instituto de Biotecnología, en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas de Bacterias, se han desarrollado cepas de *E. coli*, derivadas del linaje MG1655 y modificadas por ingeniería metabólica para la síntesis de D o L-lactato. *E. coli* JU15 (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, evolucionada) (Utrilla Carreri, 2010) produce como principal metabolito de fermentación D-lactato a partir de piruvato, por acción de la enzima nativa lactato deshidrogenasa, la cual es activada por piruvato y está codificada por el gen *ldhA*, cuya transcripción se da en condiciones de fermentación (Tarmy y Kaplan, 1968). A esta bacteria se le eliminaron genes que codifican para la piruvato formato liasa (gen *pflB*), alcohol deshidrogenasa (gen *adhE*) y fumarato reductasa (gen *frdA*). Estas enzimas catalizan reacciones que compiten por el piruvato en condiciones de fermentación, por lo tanto, al eliminar los genes que las codifican se puede dirigir el flujo

ANTECEDENTES

de carbono a la producción de D-lactato a partir de piruvato (Utrilla *et al.*, 2009). Igualmente a la cepa se le eliminó el gen *xylFGH* que codifica para un transportador de xilosa tipo ABC, el cual consume una cantidad considerable de ATP, afectando el crecimiento celular, pues en condiciones fermentativas la producción de ATP es baja (Hasona *et al.*, 2004; Utrilla Carreri, 2010). De esta manera se obtuvo la cepa CL3 que fue posteriormente sometida a evolución adaptativa con el fin de que pudiera consumir xilosa por otras rutas (Utrilla Carreri, 2010); la cepa evolucionada se denominó JU15. En evaluaciones realizadas con la cepa *E. coli* JU15 en mini-fermentadores de 0.2 L, en medio mineral suplementado con 40 g/L de glucosa, se obtuvieron rendimientos de conversión de azúcar en D-lactato superiores al 95% y productividades de aproximadamente 1.3 g/Lh (Utrilla Carreri, 2010; Leal Reyes, 2010). En la figura (1) se muestra el esquema del metabolismo de *E. coli* JU15.

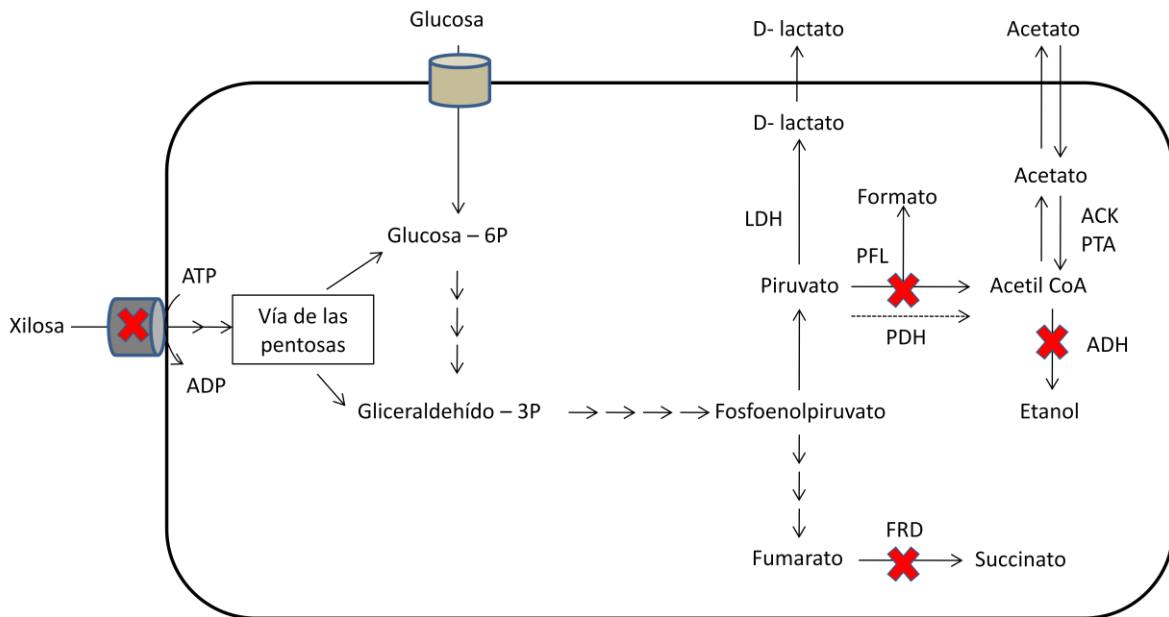


Figura 1. Metabolismo de la cepa de *Escherichia coli* JU15

E. coli JU15 también sirvió como punto de partida para la obtención de la cepa JU15A, la cual fue resultado de someter a evolución adaptativa a JU15 para darle la capacidad de crecer en presencia de acetato, un compuesto presente en los hidrolizados de lignocelulosa (Trujillo Martínez, 2008). A nivel industrial, es entonces más promisorio el

ANTECEDENTES

uso de JU15A que de JU15 para la fermentación láctica, dado que los hidrolizados lignocelulósicos constituyen un sustrato económico y con alto contenido de azúcares reductores para la producción de diferentes metabolitos de interés (Trujillo Martínez, 2008).

Adicionalmente, a partir de la cepa JU15 se construyó la cepa L-Lactogénica LL26 a la cual se le reemplazó el gen nativo *ldhA*, por el gen heterólogo *lctE* de *Bacillus subtilis*, que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa estereoespecífica para L-Lactato. Este gen se insertó en el cromosoma bajo el control del promotor nativo de la *ldhA* (Leal Reyes, 2010). La capacidad productora de la cepa LL26 se evaluó en mini-fermentadores no aireados de 200 mL con medio mineral suplementado con 40 g/L de glucosa. Las condiciones de operación fueron 37°C, 100 rpm y pH 7.0 (controlado por adición de KOH 2N). A partir de estos cultivos se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa, encontrándose velocidades específicas de crecimiento y rendimientos similares a los obtenidos para JU15A, mientras que la productividad volumétrica fue menor, alcanzando un valor alrededor de 1 g/Lh (Leal Reyes, 2009).

3.3 Producción de D-lactato

En el principio de la producción de PLA, se empleó únicamente como precursor el isómero L-lactato, por tanto, la mayoría de las investigaciones se enfocaron en la síntesis de este metabolito (Zhou *et al.*, 2003). Sin embargo, más recientemente se ha encontrado que los polímeros estereocomplejos, es decir, sintetizados a partir de ambos isómeros L y D-lactato, poseen mayor termoestabilidad, llegando a alcanzar una temperatura de fusión 50°C mayor que la de los homopolímeros de L-lactato. Además, presentan mayor resistencia a la biodegradación por microorganismos del ambiente. Por tanto, la proporción relativa de cada esteroisómero determinará las características físicas del PLA así como su velocidad de degradación (Ikada *et al.*, 1987; Okano *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2004). Es así, que pesar de ser el L-lactato el metabolito con mayor demanda

ANTECEDENTES

a nivel industrial (Okano *et al.*, 2008), la investigación de la producción de D-lactato a gran escala ha cobrado importancia en los últimos tiempos, más aún si se tiene en cuenta que su síntesis se ha estudiado a nivel de planta piloto principalmente.

3.4 Escalamiento

La creciente demanda de esteroisómeros de lactato para la síntesis de PLA hace necesario el desarrollo de procesos a gran escala que permitan la obtención de L y D-lactato ópticamente puros y en grandes cantidades, con altos rendimientos y productividades y a bajo costo, dado que este tipo de productos, como se citó anteriormente, son de bajo valor agregado. Sin embargo, el escalamiento de un proceso fermentativo no es trivial ya que los cambios de escala afectan factores biológicos, químicos y físicos del proceso en cuestión, pues es probable que el sistema pase de estar determinado por las reacciones celulares o microcinéticas a uno controlado por las limitaciones en los fenómenos de transporte a gran escala (Schuler y Kargi, 2002). Esto ocasiona que en ciertas ocasiones no haya reproducibilidad, disminuyan los rendimientos específicos, afectando los productos secundarios y posiblemente afectando también la calidad del producto deseado. Por consiguiente, lo ideal al escalar un proceso es mantener constantes varias condiciones en sus valores óptimos obtenidos en el laboratorio. No obstante, esto es casi imposible de realizar, por lo que la mejor estrategia a seguir consiste en escoger la variable más importante en el proceso, es decir, la que lo afecta en mayor grado y mantenerla constante durante el cambio de escala, mientras que las demás van a cambiar (García-Ochoa y Gómez, 2009) (ver apéndice D). A esta variable se le denomina criterio de escalamiento.

En los procesos aerobios, uno de los aspectos más relevantes es la disponibilidad de oxígeno que tengan los microorganismos, razón por la cual la transferencia de oxígeno es considerada el paso limitante en este tipo de bioprocesos, debido a la baja solubilidad del oxígeno en medios acuosos, como son los utilizados para el cultivo de microorganismos.

ANTECEDENTES

Dicha transferencia puede dividirse en cuatro pasos principales en el caso de cultivos con organismos unicelulares: difusión del oxígeno a través de la película de gas y líquido que rodean las burbujas de aire; transferencia en el medio de cultivo; difusión en el líquido que rodea la célula, y la reacción bioquímica intracelular. De estos cuatro pasos, el que mayor resistencia opone a la transferencia es la película de líquido que rodea las burbujas (Quintero Ramírez, 1981). Por esta razón, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) es uno de los criterios de escalamiento más ampliamente utilizados, ya que consta de dos componentes relacionados con dicha película de líquido: el coeficiente de transferencia de oxígeno en el líquido (k_L) y el área interfacial a través de la cual se da la transferencia (a) (Quintero Ramírez, 1981). La determinación de cada uno de estos componentes por separado es muy compleja, por lo que se utiliza generalmente el parámetro compuesto k_La (Schuler y Kargi, 2002).

El k_La es una función de las variables de operación y diseño; está determinado por correlaciones empíricas del tipo de la ecuación (1) y es característico de cada sistema (García-Ochoa y Gómez, 2009; Junker, 2004). Otro criterio aplicado al escalamiento de procesos que involucran oxígeno, es la velocidad de transferencia de oxígeno desde el gas hacia el medio (OTR), que depende de k_La y el gradiente de oxígeno en el medio de cultivo (ecuación 2). Por tanto, al utilizar cualquiera de estos dos parámetros, k_La u OTR, como criterio de escalamiento, debe determinarse el k_La para el sistema que se esté evaluando. Para esto existen varios métodos, entre los que se encuentran el de oxidación de sulfito, estado no estacionario, estado estacionario y dinámico, entre otros (Schuler y Kargi, 2002; Quintero Ramírez, 1981). Haciendo uso de estos métodos es posible encontrar el k_La para un sistema determinado de manera experimental. Asimismo, conociendo las constantes α , β , y γ , con la ecuación (1) se puede determinar el k_La teóricamente. Cabe notar que generalmente la viscosidad del medio de cultivo es similar a la del agua, correspondiente a un valor de 1. Por tanto, el término de η se elimina a menudo de la ecuación (1).

$$k_La = K'(P/V)^\alpha v_s^\beta \eta^{-\gamma} \quad (1)$$

ANTECEDENTES

$$\text{OTR} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (2)$$

Donde,

$k_L a$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h^{-1}]

K = Constante de proporcionalidad

P/V = Potencia por unidad de volumen [W/m^3]

v_s = Velocidad superficial de aireación [m/s]

η = Viscosidad del medio de cultivo (cp)

OTR = Velocidad de transferencia de oxígeno [$\text{mmol}_{\text{O}_2}/\text{L}\cdot\text{h}$]

C^* = Solubilidad del oxígeno en el medio [$\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$]

C_L = Concentración de oxígeno disuelto en un tiempo determinado [$\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$]

En contraparte, en los procesos anaerobios la disponibilidad de oxígeno no es relevante, por lo que se aplican otros criterios de escalamiento, como la potencia entregada por el agitador por unidad de volumen (P/V) (ecuación 3) y la velocidad en la punta del agitador (V_{tip}) (ecuación 4), entre otros (Quintero Ramírez, 1981).

$$P/V = (P_0 \rho_L N^3 D^5) / V \quad (3)$$

$$V_{\text{tip}} = \pi N D \quad (4)$$

Donde,

P/V = Potencia gaseada por unidad de volumen [W/m^3]

P_0 = Número de potencia específico de cada impulsor [-]

ρ_L = Densidad del medio [Kg/m^3]

N = Velocidad de agitación [s^{-1}]

D = Diámetro del impulsor [m]

V_{tip} = Velocidad en la punta del impulsor [m/s]

ANTECEDENTES

Los dos criterios anteriormente mencionados están relacionados con la velocidad de agitación (N), variable que en gran medida determinará el grado de mezclado dentro de reactor y por tanto es de vital importancia, pues como ya se mencionó anteriormente, es indispensable garantizar la homogeneidad de todos los componentes del medio. Dicha homogeneidad es más difícil de alcanzar al incrementar el tamaño del reactor, lo que puede llevar a generar zonas de agotamiento o exceso de sustrato o nutrientes, generando reducciones en la viabilidad celular, alteraciones en el metabolismo y detrimentos en la producción (Junker, 2004; Schimdt, 2005). Otros criterios de escalamiento que se han estudiado son los correspondientes a números adimensionales como el número de Reynolds, Froud, Rayleigh, etc. (García-Ochoa y Gómez, 2009). Este tipo de números relaciona diferentes parámetros que pueden afectar las condiciones del cultivo. Sin embargo, su uso como criterio de escalamiento en el área de fermentaciones no ha dado buenos resultados, pues generalmente generan valores poco razonables de otras variables importantes o no las tienen en cuenta (Junker, 2004; Schimdt, 2005). Cabe notar que el escalamiento de cultivos de *E. coli* en condiciones de fermentación (no aireadas) no ha sido estudiado ampliamente con anterioridad.

Por lo general, en el escalamiento se mantienen relaciones geométricas constantes, por tanto, es común que el criterio de escalado no esté relacionado con la distribución geométrica *per se* sino más bien con los problemas de homogeneidad y transferencia de oxígeno. Los criterios de escalamiento se encuentran relacionados entre sí, sin embargo, esto no implica que afecten el proceso de la misma manera. En general, los criterios mencionados anteriormente dependen en gran medida del tipo de impulsor utilizado, el cuál su vez depende del número de potencia adimensional P_o , que es específico para cada impulsor y está relacionado con el régimen de flujo dentro del fermentador, así como de las condiciones operacionales, como la velocidad de agitación y/o aireación, y de las propiedades del medio como la viscosidad, sólidos suspendidos, etc. (Schimdt, 2005). El tipo de impulsores más ampliamente utilizados para la dispersión de aire son las turbinas Rushton, que al igual que los agitadores de paletas planas bombean el fluido

ANTECEDENTES

primariamente en dirección radial y generan un flujo axial secundario. Las propelas marinas y otro tipo de impulsores generan flujo axial que permiten una dispersión del líquido desde o hacia el fondo del tanque (Schuler y Kargi, 2002).

A pesar de la creciente demanda de L y D- lactato para la síntesis de PLA, son escasos los estudios reportados en lo concerniente al escalamiento de este tipo de procesos, encontrándose algunos realizados con hongos del género *Rhizopus* en condiciones aireadas, los cuales presentan bajas velocidades de crecimiento (Miura *et al.*, 2003). En cuanto al comportamiento de *E. coli* bajo condiciones no aireadas, tampoco se ha encontrado información sobre escalado de fermentaciones con este microorganismo. Sin embargo, se ha reportado en experimentos de escalamiento descendente que esta bacteria incrementa su producción de metabolitos de fermentación, como etanol y lactato, en zonas de bajo contenido de oxígeno en el biorreactor (Sandoval-Basurto, 2005; Lara *et al.*, 2006). Es claro entonces que se requiere la búsqueda de criterios de escalamiento definidos para fermentaciones que utilicen *E. coli*, con el fin de mantener los rendimientos y productividades encontradas a nivel de laboratorio, particularmente en el presente estudio para la producción de lactatos.

En teoría, el escalamiento de un proceso no aireado no debería acarrear grandes dificultades ya que el paso limitante en la mayoría de los procesos de escalamiento está relacionado con la transferencia de oxígeno en el medio. Sin embargo, resultados hallados previamente en nuestro laboratorio indican que la agitación o el oxígeno pueden estar jugando un papel importante en la obtención de rendimientos, reproducibilidad y productividades similares a las obtenidas en la fermentación de azúcares a etanol o lactatos en mini-fermentadores de 0.2 L. En estos experimentos, al hacer uso de la cepa etanológica de *E. coli* MS04 (modificada a partir de JU15A para hacerla productora de etanol), se encontró que al pasar de una escala de 0.2 litros a 1 litro, en una fermentación no aireada, los rendimientos fueron considerablemente menores (comunicación personal M.T. Fernández-Sandoval); resultados que llevaron a postular que existen efectos

ANTECEDENTES

adversos de agitación o transferencia de oxígeno al cambiar de escala con estas cepas, y que por tanto deben tenerse en cuenta para un adecuado escalamiento.

No se esperaba que existieran problemas de homogeneidad en fermentadores pequeños como los de 1 litro, por tanto, existía la posibilidad que el detrimento en el rendimiento y productividades se debiera a otro factor que en este caso podría ser la transferencia de oxígeno. Aunque la producción de etanol se llevó a cabo bajo condiciones no aireadas en el mini-fermentador de 0.2 litros, se comprobó que hay cierta transferencia de oxígeno procedente del aire que queda confinado entre la superficie del líquido y la tapa del fermentador. Este oxígeno, proveniente del fenómeno conocido como aireación superficial (Fuchs *et al.*, 1971), se asume que se transfirió más fácilmente en el mini-fermentador de 0.2 L que en el de 1 L y por tanto disminuyó su disponibilidad en este último afectando la producción de etanol. Las observaciones anteriores condujeron a postular que, siendo *E. coli* un microorganismo facultativo podría requerir cierta cantidad de oxígeno para generar biomasa y transformar los azúcares reductores a etanol, o en el presente caso a lactatos, con rendimientos superiores al 90% del máximo teórico y productividades volumétricas similares a las obtenidas en mini-fermentadores.

Con base en estos resultados se realizó un experimento en los mini-fermentadores de 0.3 L de volumen nominal, variando el volumen del líquido y por tanto la cabeza de aire superficial (comunicación personal M.T. Fernández-Sandoval). Se hicieron cultivos con un volumen de líquido de 0.16, 0.18 y 0.28 L, encontrándose que para este último la productividad volumétrica descendió considerablemente de 0.75 a 0.25 g/L.h con respecto a los otros volúmenes. Estos resultados corroboran la influencia de la aireación superficial. Adicionalmente se sabe que este efecto disminuye a medida que se aumenta el tamaño del fermentador, siendo despreciable para reactores de más de 200 L (Fuchs *et al.*, 1971). Complementariamente, se llevó a cabo otro experimento en el fermentador de 1 L utilizando un volumen de trabajo constante de 0.8 L y variando la velocidad de agitación entre 120 y 400 rpm. Igualmente, se notó una baja en la productividad con respecto a la

ANTECEDENTES

obtenida en el mini-fermentador de 0.2 L a 100 rpm (0.65g/L.h), manteniéndose aproximadamente constante entre 0.41 y 0.49 g/L.h para todas las velocidades y aumentado para la de 400 rpm a 0.93 g/Lh. Esto también sugiere el efecto del aire superficial, pues se requirió un aumento en la velocidad de agitación para promover la transferencia de una mayor cantidad de oxígeno desde el aire presente en la parte superior del medio de cultivo en el fermentador.

Con respecto a lo anterior, al realizar el escalamiento de un proceso de producción de lactato utilizando una cepa de *E. coli* se deberá tener en cuenta no sólo los problemas de agitación del medio respecto a su homogeneidad, sino también la cantidad de oxígeno que podría requerir. Por lo tanto, a pesar de tratarse inicialmente la síntesis de lactato como un proceso fermentativo, es posible que se requiera cierto grado de aireación en cultivos a gran escala, donde el oxígeno superficial no es influyente o suficiente, debido al gran volumen del líquido, para alcanzar los mismos rendimientos y productividades que se tienen en los mini-fermentadores de laboratorio. De esta manera se podría incluir entonces a $k_L a$ u OTR como criterios de escalamiento en la producción de lactato; sin embargo, sus valores se verían reducidos a un estrecho intervalo, pues el cultivo debe permanecer bajo limitación de oxígeno, es decir, que el microorganismo no disponga del suficiente oxígeno que requiere para crecer bajo condiciones aerobias, bajo las cuales no se vería en la necesidad de fermentar los azúcares presentes a lactato para regenerar poder reductor. Adicionalmente, la cantidad de oxígeno disuelto en el medio no debería exceder la concentración crítica de oxígeno para *E. coli*, reportada con un valor de 5 a 10% del valor de concentración de saturación de oxígeno correspondiente a 7 mg/L (Sandoval-Basurto *et al.*, 2005).

3.5 Efecto del oxígeno

E. coli es un microorganismo anaerobio facultativo, es decir que, puede crecer bajo condiciones de aerobiosis o anaerobiosis, obteniendo energía por medio de respiración o

ANTECEDENTES

fermentación. El tipo de metabolismo que utiliza depende de la disponibilidad de oxígeno u otros aceptores de electrones, o de la capacidad para fermentar la fuente de carbono utilizada. Al pasar de una condición de oxígeno presente en el medio a otra, se prenden y apagan diferentes genes relacionados con los cambios en el tipo de metabolismo, de tal forma que la bacteria modifica su metabolismo para adoptar el proceso más favorable energéticamente de acuerdo a las condiciones ambientales (Bearson *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 1997).

A nivel transcripcional, en *E. coli* se han encontrado dos reguladores principales que se encargan de la expresión y represión de genes involucrados en los cambios de metabolismo, estos reguladores están conformados por los sistemas sensores FNR y ArcBA. FNR es un sensor directo que presenta una respuesta a los cambios de oxígeno más rápida que la de ArcBA, el cual es indirecto y su respuesta está relacionada con los cambios de potencial en la cadena transportadora de electrones (Gonçalves *et al.*, 1997). Estos dos sistemas pueden regular de forma positiva o negativa la expresión de diferentes genes, así como actuar por separado o de forma conjunta para efectuar dicha regulación. En la transición de la aerobiosis a la anaerobiosis, se pasa por una condición intermedia, la microaerobiosis, condición bajo la cual a pesar de haber presencia de cierta cantidad de oxígeno en el medio, éste no es suficiente para mantener el balance redox y por tanto la bacteria se ve en la necesidad de adoptar un metabolismo mixto, en el que obtiene parte de la energía y poder reductor de la cadena de transporte de electrones, y parte de la síntesis de metabolitos anaerobios como el lactato y el etanol.

Durante la microaerobiosis, además de los cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo central, se prenden también genes relacionados con la tolerancia celular al estrés osmótico y la homeostasis de metales pesados (Partridge *et al.*, 2007). La transcripción de estos genes es controlada por los reguladores CpxR y RpoE; CpxR muestra una respuesta más rápida a los cambios en la concentración de oxígeno disuelto que la de RpoE (Partridge *et al.*, 2007). La expresión de los reguladores de

ANTECEDENTES

respuesta al estrés osmótico se encuentra a su vez controlada por FNR y ArcA, y su nivel va disminuyendo a medida que el ambiente se torna más anaerobio (Sanders, 1999; Partridge *et al.*, 2007). Por tanto, una forma de mantener la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico en *E. coli* es mediante la microaireación del medio de cultivo; en el caso particular de la producción de lactato, la cantidad de oxígeno transferida debe ser tal que permita la regulación osmótica de la célula sin inhibir la síntesis del lactato.

3.6 Control de pH con diferentes bases

Durante la fermentación láctica, el ácido láctico que es exportado desde la célula al medio de cultivo causa un descenso en el pH del medio afectando el crecimiento y producción por parte del microorganismo. Esto se debe a que el ácido láctico es un ácido débil y a pH relativamente bajo se encontrará en su forma protonada, estado en el cual puede difundir libremente a través de la membrana celular. Al llegar al citoplasma, que se encuentra a un pH cercano a la neutralidad, el ácido láctico se disocia acidificando el citoplasma y afectando así las fuerzas motrices y a su vez el transporte de nutrientes (Bearson *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 1997). Debido a esto es necesario mantener controlado el pH del medio a un valor que se evite la protonación del lactato. En el caso de *E. coli* JU15A se ha reportado un pH adecuado de producción entre 6.6 y 7 (Trujillo Martínez, 2008) y una disminución del 20% en el rendimiento producto/sustrato a pH de 6 (Zhu *et al.*, 2007).

El control del pH se lleva a cabo mediante la adición de una base durante el transcurso de la fermentación. Sin embargo, el uso de la base genera la acumulación de cationes en el medio, lo cual causa un efecto negativo en la producción de ácidos orgánicos debido a efectos de estrés osmótico e inhibición de enzimas en *E. coli* (Zhu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009). A nivel industrial la base con la que se titula el ácido láctico cobra importancia, no sólo por el efecto de los cationes generados, sino por los co-productos que pueden obtenerse a partir de estos cationes en el proceso de purificación

ANTECEDENTES

del lactato. Tres bases se presentan como posibles candidatas a ser utilizadas para el control de pH en fermentaciones lácticas a gran escala, estas son: KOH, Ca(OH)₂ y NH₄OH.

3.6.1 KOH

Desde el punto de vista de producción de lactato, el KOH no se presenta como la mejor opción, pues en estudios realizados se ha encontrado un detrimento en la productividad y el rendimiento de producto al utilizar esta base con respecto al Ca(OH)₂. Esta disminución se debe al efecto negativo que tiene la acumulación de iones K⁺ en las proteínas de membrana de *E. coli* (Lu *et al.*, 2009). Sin embargo, esta base se ha empleado en diferentes fermentaciones lácticas realizadas en el laboratorio, obteniéndose buenos resultados (Trujillo Martínez, 2008; Utrilla Carreri, 2010; Zhou *et al.*, 2003). Adicionalmente, en el proceso de purificación puede obtenerse como co-producto sulfato de potasio (K₂SO₄), un compuesto utilizado ampliamente como fertilizante, ya que incrementa el contenido nutricional de los frutos, además de mejorar su apariencia e incrementar su resistencia al transporte y almacenamiento (Dalian Boda Sciences & Technologies Co., 2005).

Una base similar al KOH es el NaOH, cuyo catión también es monovalente y podría tener un efecto similar en el control de pH durante la fermentación láctica. Sin embargo, en experimentos realizados por Marco Tulio Fernández (comunicación personal), se encontró que se requería mayor volumen de NaOH que de KOH (con la misma concentración), al ser usados para controlar el pH de una fermentación alcohólica. El resultado anterior se debió al transportador tipo antiporte presente en la membrana plasmática de *E. coli*, el cual, al acumularse iones Na⁺ en el medio externo, hace una translocación de un H⁺ desde el citoplasma mientras ingresa un Na⁺ desde el medio (Karpel *et al.*, 1991; West y Mitchell, 1974). Por tanto, al utilizar NaOH como base para el control de pH, había una cantidad mayor de H⁺ acidificando el medio y se requería mayor volumen de base para mantener el pH en el punto de control. Estos resultados sugieren

ANTECEDENTES

que el NaOH no es una base adecuada para el control de pH de las fermentaciones lácticas a gran escala, pues un requerimiento de mayor cantidad de base implica aumentos en los costos y la dilución del producto final.

3.6.2 Ca(OH)₂

La base que mejores resultados a generado en lo referente a productividad y rendimiento para el control de pH durante la producción de ácidos orgánicos con *E. coli*, ha sido el Ca(OH)₂. A nivel industrial es la base más comúnmente utilizada en la fermentación láctica, debido a que las operaciones de purificación son relativamente sencillas cuando se hace uso de ella (Inskeep y Breitzke, 1952). Sin embargo, este proceso de purificación conlleva a la generación de sulfato de calcio (CaSO₄) o yeso, produciéndose una tonelada de éste por cada tonelada de lactato sintetizado (Datta *et al.*, 1995; Garlotta, 2001). El valor agregado del yeso es muy bajo y debido a la gran cantidad producida y su difícil comercialización, tiende a acumularse, lo que podría conllevar a que este compuesto se convierta en un desecho peligroso para el medio ambiente (Datta *et al.*, 1995; Joglekar *et al.*, 2006; Madzingaidzo *et al.*, 2002).

3.6.3 NH₄OH

No se ha reportado hasta el momento que la utilización de esta base tenga efectos negativos en la producción de lactato, por el contrario, el ion amonio puede constituir una fuente adicional de nitrógeno favoreciendo el buen funcionamiento celular. De hecho, el NH₄OH es utilizado en diferentes cultivos con este fin. Adicionalmente, en la purificación del lactato puede obtenerse sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, compuesto que al igual que el K₂SO₄ se emplea como fertilizante y cuya demanda se espera incremente 1.7% cada año entre 2008 y 2020 (CRU Forecasts, 2000).

ANTECEDENTES

Es importante entonces evaluar el efecto del control de pH con cada una de estas bases en la producción de lactato con la cepa de *E. coli* JU15A, y con base en la productividad y rendimiento de producto, así como la generación de coproductos, determinar cuál podría ser la más indicada para su uso en la fermentación láctica a gran escala.

4. JUSTIFICACIÓN

La síntesis de plásticos biodegradables como son los PLAs requiere de ambos isómeros, L y D- lactato, y sus características dependerán de la cantidad relativa de cada esteroisómero usada en la polimerización. El interés por los bioplásticos provenientes del lactato es relativamente reciente, razón por la cual, la producción a nivel industrial del isómero D-lactato no se ha estudiado ampliamente, puesto que es el isómero L el más utilizado en otras industrias. Sin embargo, debido a la inminente escasez de petróleo en un futuro no muy lejano, es necesaria la producción de plásticos alternativos, que no involucren derivados del petróleo, como los PLAs. De esta manera, la generación de conocimiento sobre la producción industrial de D-lactato cobra importancia dada la necesidad de obtener materias primas de bajo costo, que hagan de los PLAs productos competitivos en el creciente mercado global. El escalamiento de la producción de D-lactato hasta un nivel de planta piloto, constituye un primer acercamiento con miras a la síntesis industrial del metabolito. Aunado a esto, la utilización de un microorganismo como *E. coli*, con requerimientos nutricionales mínimos y capacidad de crecer en medios minerales, representa una disminución en los costos y exhibe la producción de D-lactato con *E. coli* como una buena opción. Por ende, la búsqueda de un criterio de escalamiento adecuado, que permita alcanzar altos rendimientos y productividades, para esta fermentación es de gran relevancia en la obtención de D-lactato a gran escala.

5. HIPÓTESIS

Es posible determinar un criterio de escalamiento para la producción de lactatos con *Escherichia coli* JU15A y LL26, basado en la transferencia de *momentum* o de masa, que permita alcanzar rendimientos y productividades de lactato similares o mayores a los obtenidos en escala de laboratorio.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Determinar el criterio de escalamiento para la fermentación de glucosa a lactatos con cepas de *E. coli* recombinantes.

6.2 Específicos

- En fermentador de 1 L evaluar, por separado, diferentes condiciones de aireación y agitación, para determinar cuál se ajusta mejor con el rendimiento lactato/glucosa y la productividad volumétrica encontrados para la cepa de *E. coli* D-lactogénica JU15A en escala de laboratorio.
- Seleccionar un criterio de escalamiento a partir de las condiciones con las que se obtuvo mejor rendimiento y productividad.
- Evaluar el criterio de escalamiento encontrado en fermentadores de 1 L para la fermentación láctica con JU15A en reactores de la planta piloto con volúmenes de trabajo de 11 y 85 litros
- Validar el criterio de escalamiento realizando cultivos con la cepa L-lactogénica LL26 en reactores de 1 y 11 L de volumen de trabajo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS**7.1 Microorganismos**

Se hizo uso de la cepas D-homolactogénica JU15A ($\Delta pflB \Delta adhE \Delta frdA, \Delta xyIFGH$; evolucionada) (Utrilla Carreri, 2010; Trujillo Martínez, 2008) y la L-homolactogénica LL26 ($\Delta pflB, \Delta adhE, \Delta frdA, \Delta xyIFGH$, evolucionada, $ldhA::lctE$) (Leal Reyes, 2010), provenientes del linaje MG1655 de *E. coli*; obtenidas en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en las fermentaciones con JU15A y LL26 fue el medio mineral AM1 (Martínez *et al.*, 2007), suplementado con 0.1 g/L de ácido cítrico y 80 g/L de glucosa (en algunos cultivos, que se presentan en los anexos, se utilizaron 120 g/L de glucosa). Para la preparación del medio se hizo uso de soluciones patrón concentradas de cada uno de los componentes. La composición de estas soluciones y su concentración en el medio final se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo AM2

Componente	Concentración en solución patrón	Concentración inicial en el medio de cultivo
$(NH_4)_2HPO_4$ y $NH_4H_2PO_4$	20X	2.63 g/L 0.87 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 M	1 mM
KCl	2 M	2 mM
Betaína	1 M	1 mM
Ácido cítrico	50 g/L	0.1 g/L
Elementos traza		1.5 mL/L

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación de 1 L de medio se agregaron 50 mL de sales $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 2 mL de ácido cítrico, 1.5 mL de elementos traza, 1 mL de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL de betaína y 1 mL de KCl. Todas las soluciones patrón se esterilizaron previamente; las sales, el KCl y el $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se esterilizaron en autoclave a 121°C por 25 minutos; el ácido cítrico, la betaína y los elementos traza se esterilizaron por filtración.

La solución patrón de elementos traza contiene por cada litro:

0.6 g FeCl_3 , 0.2 g $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g CuCl_2 , 0.2 g $\text{ZnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g Na_2MoO_4 , 0.05 g H_3BO_3 y 0.33 g $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

7.3. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de la cepa JU15A o LL26 almacenadas en glicerol a 70°C, las cuales fueron sembradas en medio Luria sólido, e incubadas a 37°C por 12 horas. Posteriormente, se tomó una azada de las colonias formadas y se resembró en tubos con medio mineral líquido, los cuales se utilizaron para preinocular mini-fermentadores (fleakers) de 200 mL de volumen de trabajo. El inóculo se dejó crecer en estos mini-fermentadores durante 10 a 14 horas, bajo condiciones de temperatura, pH y agitaciones controladas a 37°C, 6.6 y 150 rpm respectivamente, hasta alcanzar una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) entre 1 y 1.5.

Para los fermentadores operados con volúmenes de 11 y 85 L se siguió este mismo tren de inoculación, con la diferencia que en estos casos se utilizó el mini-fermentador para inocular un reactor con volumen de 10 L, que al alcanzar la $\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 1-1.5$, fue usado como inóculo de dichos fermentadores. Todas las fermentaciones comenzaron con una DO inicial entre 0.1 y 0.3. El esquema general del tren de inoculación se ilustra en la figura 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

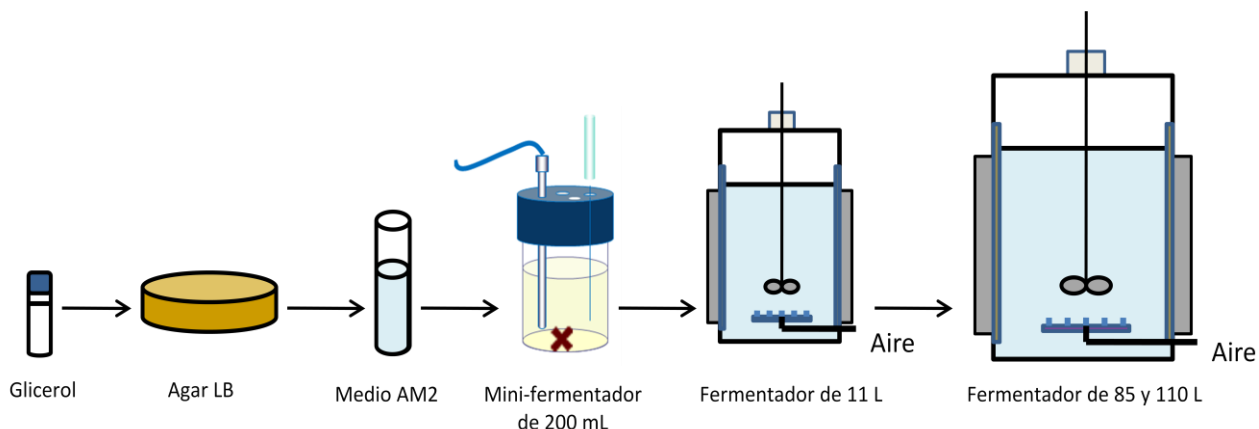


Figura 2. Tren de inoculación de los fermentadores de 11 y 85 L

7.4 Condiciones de operación

Todas las fermentaciones en los diferentes volúmenes de trabajo, se mantuvieron, en la medida de lo posible, bajo condiciones de temperatura y pH constantes, de 37°C y 6.6 respectivamente. El control de pH se llevó a cabo por adición de KOH 4 y 6N (Ca(OH)₂ y NH₄OH para el caso de algunos cultivos de 11 L). Igualmente, la frecuencia de muestreo fue similar en todos los cultivos, tomando muestras de 1.5 a 2 mL cada dos horas durante la fase de crecimiento exponencial y cada 5 a 8 horas durante la etapa estacionaria, hasta el agotamiento de la fuente de carbono. Las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes almacenados a -4°C para su análisis posterior. Todos los experimentos, en las diferentes escalas, se hicieron al menos por duplicado. En los resultados se muestran los promedios de las repeticiones, en las figuras y tablas, así como el error estándar de las mediciones.

7.5 Mini-fermentadores de 200 mL

Se hizo uso de mini-fermentadores de 200 mL de volumen de trabajo con el fin de determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos en escala de laboratorio, tal como se había hecho en trabajos anteriores a esta tesis (Leal Reyes, 2010; Utrilla Carreri, 2010), y poder así comprarlos con los obtenidos en fermentadores de 1 L para determinar el

MATERIALES Y MÉTODOS

criterio de escalamiento a utilizar. De igual forma, los mini-fermentadores se emplearon para la preparación del inóculo de los fermentadores más grandes, tal como se ilustró en la figura 2. Estos mini-fermentadores o fleakers constan de un envase de vidrio con tapa y cuentan con sistema de toma de muestra, control de pH por adición de base, control de temperatura por inmersión en una tina con agua a la temperatura deseada y agitación magnética (figura 3). En este caso las condiciones de trabajo de los mini-fermentadores fueron pH 6.6, 37°C y 150 rpm. Cabe notar que a pesar de que estos equipos no son aireados, el sistema no es completamente anaerobio puesto que en la toma de muestra, así como por el espacio entre la tapa y el envase de vidrio, puede entrar cierta cantidad de aire.

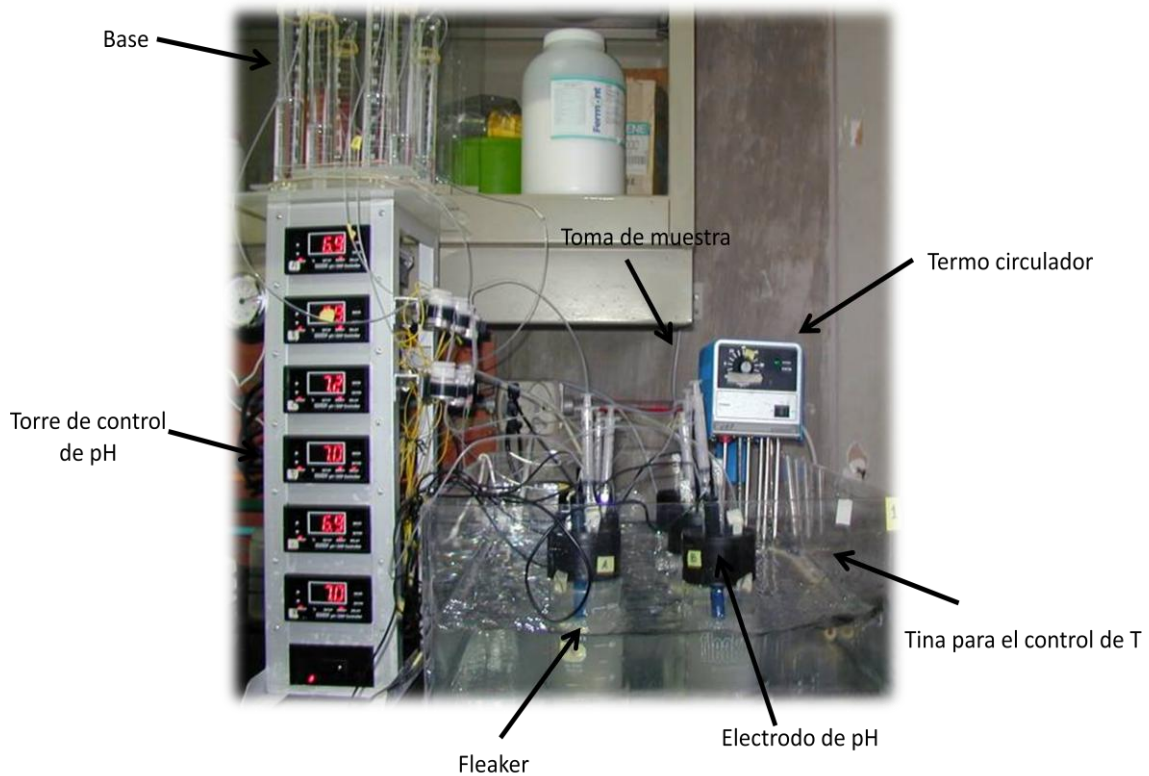


Figura 3. Mini-fermentadores de 200 mL

MATERIALES Y MÉTODOS

7.6 Fermentaciones en 1 litro

7.6.1. Estudio de la velocidad de agitación

Se llevaron a cabo cultivos con la cepa JU15A en medio AM2 ensayando 2 diferentes velocidades de agitación, 60 y 400 rpm, bajo condiciones de anaerobiosis luego de burbujear nitrógeno en la cabeza de aire del fermentador, y de esta manera determinar los efectos de la agitación en la producción de D-lactato. Para ello, se hizo uso de fermentadores Applikon Inc. de 1 litro de volumen de trabajo, equipados con 4 mamparas, una turbina tipo Rushton de 6 paletas y control de temperatura (por medio de una manta de calentamiento y circulación de agua fría), pH, agitación y oxígeno disuelto. Las fermentaciones se siguieron durante 48 y 96 horas para 60 y 400 rpm respectivamente.

7.6.2 Estudio de la velocidad de aireación

Se ensayaron las siguientes velocidades de aireación: 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 vvm, en los fermentadores de 1 L con una velocidad de agitación de 400 rpm y sin control de oxígeno disuelto. Los cultivos se siguieron durante 30 a 40 horas hasta el agotamiento de la glucosa.

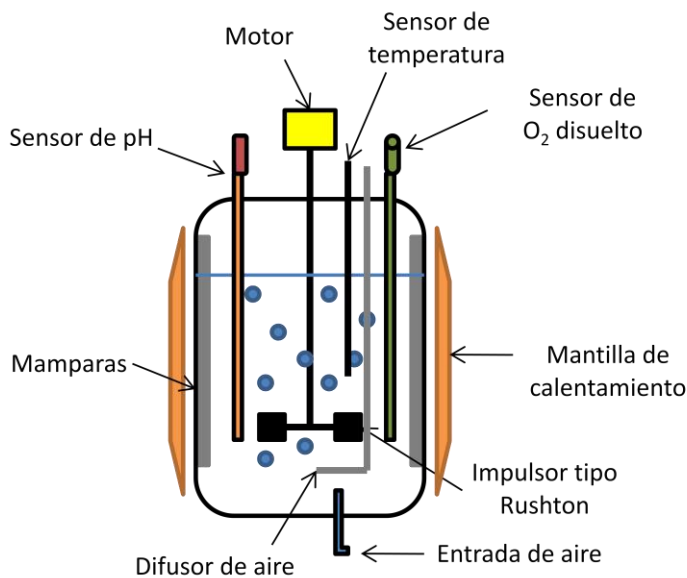


Figura 4. Esquema y fotografía del fermentador de 1 L

MATERIALES Y MÉTODOS

7.7 Fermentaciones en 11 litros

Estas fermentaciones se llevaron a cabo en fermentadores Microferm (New Brunswick Sci.) de 14 L de volumen nominal y de 10 a 11 litros de volumen de trabajo, equipados con 3 impulsores tipo Rushton de 1/3 del diámetro del reactor, ubicados en la planta piloto del Instituto de Biotecnología/UNAM. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones ya descritas de pH y temperatura, y velocidades de aireación y agitación de 0.1 vvm y 180 rpm respectivamente. Para las fermentaciones se ensayaron concentraciones iniciales de glucosa de 80 g/L y base KOH 6 N para el control de pH (en una serie de experimentos, presentados en los anexos, se utilizaron 120 g/L de glucosa y 3 bases diferentes: KOH, $(\text{NH}_4)\text{OH}$ y $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Los cultivos se siguieron por un lapso de 40 a 60 horas hasta el agotamiento de la fuente de carbono.

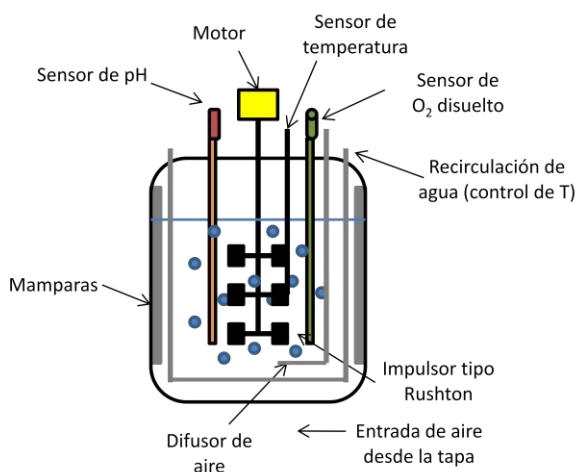


Figura 5. Esquema y fotografía del fermentador de 11 L

7.8 Fermentaciones en 85 y 110 L

Para los cultivos realizados en un volumen de 85 litros se hizo uso de un fermentador equipado con dos turbinas tipo Rushton de $\frac{1}{2}$ del diámetro del reactor. Se operó bajo las mismas condiciones de pH 6.6 y temperatura 37°C. La velocidad de aireación se mantuvo en 0.1 vvm, mientras que la velocidad de agitación fue de 70 rpm.

MATERIALES Y MÉTODOS

La concentración inicial de glucosa fue de 80 g/L y el pH se controló con KOH 6N. Este mismo fermentador y condiciones se utilizaron para los cultivos en un volumen de 110 L.



Figura 6. Fermentador de 85 y 110 L

En la siguiente tabla se muestran las dimensiones de los diferentes fermentadores utilizados.

Tabla 2. Dimensiones de los fermentadores

Fermentador	D_T (m)	H_T (m)	H_L (m) ($H_L/D_T=1.5$)	V_L (L)	V_N (L)
1	0.095	0.165	0.144	1.042	1.17
2	0.212	0.397	0.318	11.23	14
3	0.416	0.956	0.624	84.81	130
4	0.416	0.956	0.809	110.0	130

Donde,

D_T =Diámetro interno del fermentador [m]

H_T = Altura total del fermentador [m]

H_L = Altura del líquido [m]

MATERIALES Y MÉTODOS

V_L =Volumen de trabajo [L]

V_N = Volumen nominal [L]

Tabla 3. Accesorios de los fermentadores

Fermentador	V_L (L)	N° Impulsores	D_i	N° Mamparas	M	Tipo de difusor de aire
1	1.042	1	1/3	2	1/10	Punto
2	11.23	3	1/3	4	1/10	Punto
3	84.81	2	1/2	4	1/10	Dona
4	110.0	2	1/2	4	1/10	Dona

D_i =Relación del diámetro del impulsor respecto al diámetro del fermentador

M= Relación del ancho de la mampara respecto al diámetro del fermentador

A menos que se indique otra cosa, todos los cultivos se realizaron por duplicado. En las gráficas se presentan los valores promedio de las cinéticas y de los parámetros cinéticos y estequiométricos, así como el correspondiente error estándar.

7.9 Métodos analíticos

7.9.1 Determinación de la concentración celular

Para medir la concentración celular, a través de las diferentes etapas y escalas de los cultivos, se hizo uso de la densidad óptica, la cual fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-70) a cada una de las muestras tomadas. Posteriormente se hizo la conversión de esta DO_{600nm} a peso seco de células (DCW: dry cellular weight), haciendo uso de una curva de calibración en la cual $1 DO_{600nm} = 0.37 g_{DCW}/L$. A continuación se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm durante 4 min en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se recuperó el sobrenadante para almacenarlo a $-4^{\circ}C$ para su posterior análisis; por su parte, el paquete celular se desechó.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.9.2 Determinación de ácidos orgánicos

Tanto los productos principales D y L lactato, como los subproductos ácido acético, succínico, fórmico y pirúvico, se determinaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), haciendo uso de una columna aminada (Aminex HPX-87H Biorad) operada a una temperatura de 50°C; como fase móvil se utilizó H₂SO₄ 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min. Para la detección de los compuestos se empleó un detector de arreglo de diodos Waters 996 y el análisis y procesamiento se llevó a cabo con el sistema Millenium.

La preparación de las muestras para ser analizadas en el equipo de HPLC se hizo por medio de filtración con membranas con un tamaño de poro de 0.45 µm; en algunos casos que se requería, éstas muestras fueron diluidas en fase móvil.

7.9.3 Determinación de la concentración de glucosa

La determinación de glucosa presente en el sobrenadante se realizó con un analizador bioquímico basado en un método enzimático, utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada (YSI Modelo 2700; Yellow Springs Instruments, Ohio USA).

7.10 Parámetros cinéticos y estequiométricos

Los parámetros evaluados fueron: velocidad específica de crecimiento μ (h⁻¹), rendimiento producto/sustrato $Y_{P/S}$ (g_{lactato}/g_{glucosa}) y productividad volumétrica de lactato Q_P (g_{lactato}/L.h). Dichos parámetros se calcularon de acuerdo a los datos obtenidos para las curvas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato. Estos datos fueron previamente corregidos por el factor de dilución, corrección necesaria ya que a medida que avanzaba la fermentación se añadía una cantidad considerable de base para el control de pH y por ende se diluía el medio y sus componentes.

7.10.1 Factor de dilución (F_d)

Este factor adimensional depende de la base adicionada (V_B) y el volumen de trabajo inicial (V_i). Para la corrección de los datos se debe multiplicar el factor de dilución por el valor sin corregir.

MATERIALES Y MÉTODOS

$$F_d = \frac{(V_i + V_B)}{V_i} \quad (5)$$

7.10.2 Velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento se calculó con base en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria. Para esto se graficó el logaritmo natural de los datos de crecimiento contra el tiempo y se hizo una regresión lineal de los datos correspondientes a la fase exponencial, la pendiente de dicha regresión corresponde a la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = \frac{\text{Ln}\left(\frac{X}{X_0}\right)}{t-t_0} \quad (6)$$

7.10.3 Rendimiento lactato/glucosa ($Y_{P/S}$)

El rendimiento lactato/glucosa se calculó como el lactato neto producido ($P_f - P_i$) durante todo el transcurso de la fermentación, dividido por la glucosa neta consumida ($S_i - S_f$) durante dicha fermentación.

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (7)$$

7.10.4 Productividad volumétrica de lactato (Q_P)

La productividad volumétrica de lactato se calculó como el lactato neto producido en la fermentación, dividido por el tiempo total de fermentación. Cabe notar que en el caso que la concentración de lactato entre los dos valores finales no variara en un valor mayor al 5%, se tomó el dato del tiempo menor para calcular la productividad.

$$Q_P = \frac{(P_f - P_i)}{(t - t_0)} \quad (8)$$

MATERIALES Y MÉTODOS

7.11 Cálculo del k_La

7.11.1 Experimental

Para el cálculo experimental de k_La se hizo uso del método de estado no estacionario en fermentadores de 1 L. Éste es un método para calcular k_La inicial (sin células) que consiste en burbujear nitrógeno al reactor bajo condiciones iguales a las empleadas en las fermentaciones lácticas. El nitrógeno arrastra el oxígeno presente en el medio de tal forma que se tendrán condiciones anaerobias. Luego se burbujea aire al reactor y se toman las concentraciones crecientes en el tiempo de oxígeno disuelto en el medio, hasta alcanzar la saturación. Para el cálculo del k_La a partir de estos datos se parte de un balance de oxígeno en el líquido.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_La(C^* - C_L) \quad (9)$$

Reorganizando esta ecuación e integrando entre $t_0=0$ y $t=t$ se obtiene:

$$\ln(C^* - C_L) = -k_La * t \quad (10)$$

Por tanto, al graficar $\ln(C^* - C_L)$ vs t se obtendrá una línea recta con pendiente $-k_La$, correspondiente al coeficiente de transferencia de oxígeno en un medio sin células bajo las mismas condiciones de cultivo que las fermentaciones (Schuler y Kargi, 2002).

7.11.2 Basado en ecuaciones empíricas

La determinación del k_La se hizo también con base en la ecuación empírica propuesta por Linek y Vacek (Linek y Vacek, 1988) para reactores de tanque agitado. El uso de esta ecuación, se debe a que las condiciones de geometría y composición del medio de cultivo empleadas por los autores, fueron similares a las utilizadas en esta tesis. A continuación se muestra dicha ecuación y el procedimiento llevado a cabo para el cálculo del k_La en el reactor de 1 L y las condiciones para mantener el k_La constante en los fermentadores de 11, 85 y 110 L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Correlación utilizada para el cálculo de k_La :

$$k_La = 1.07 * 10^{-3} \left(\frac{P_g}{V}\right)^{0.944} * v_s^{0.4} \quad (11)$$

Donde,

P_g/V =Potencia gaseada por unidad de volumen [W/m^3]

v_s = Velocidad superficial de aireación [m/s]

Para el cálculo de la potencia gaseada se hizo uso de las ecuaciones propuestas en el Handbook of Industrial Mixing, basadas en números adimensionales y la potencia sin gasear, a continuación se muestran estas ecuaciones.

Número de flujo de gas (Fl_G)

$$Fl_G = \frac{Q_G}{ND^3} \quad (12)$$

Donde,

Q_G =flujo volumétrico de gas [m^3/s]

N =velocidad de agitación [rps]

D =diámetro del impulsor [m]

Número de Froude (Fr)

$$Fr = \frac{N^2D}{g} \quad (13)$$

Donde,

g =aceleración gravitacional (m/s^2)

Demanda relativa de potencia (RPD)

$$RPD = 0.18 * Fr^{-0.25} Fl_G^{-0.2} \quad (14)$$

Potencia sin gasear (P_U)

$$P_U = P_0 N^3 D^5 \rho_L \quad (15)$$

MATERIALES Y MÉTODOS

Donde,

P_0 =número de potencia específico de cada impulsor [-]

ρ_L =Densidad del medio [Kg/m^3]

Potencia gaseada (P_g)

$$P_g = \text{RPD} * P_U \quad (16)$$

Con base en las ecuaciones (11) a (16) se puede calcular el k_La para un reactor agitado operando con un impulsor a una velocidad de agitación y aireación determinadas.

Para reactores operando con varios impulsores se asume que el impulsor ubicado en el fondo del reactor dispersa el gas que ingresa a éste y recibe toda la carga de flujo de gas entrante; mientras que los impulsores ubicados más arriba sólo reciben una parte del flujo. Experimentalmente se ha encontrado que dicha carga corresponde aproximadamente a la mitad del flujo de gas que entra al reactor cuando la separación entre impulsores corresponde a 1 diámetro del impulsor (Kresta, 2004). Es decir, Fl_G para los impulsores ubicados más arriba se calculará con la mitad del flujo de gas (Q_G) total. La potencia gaseada total corresponderá a la suma de las potencias entregadas por cada impulsor, que se calculan de acuerdo a las ecuaciones (11) a (16) y la consideración de flujo de gas para cada impulsor mencionada anteriormente.

7.12 Escalamiento

Para el escalamiento basado en el k_La se mantuvo una relación geométrica constante $H/D_T=1.5$; igualmente, el flujo de aire se mantuvo en 0.1 vvm para todos los reactores, cambiando solamente la velocidad de agitación en cada uno. Para determinar esta velocidad de agitación con el fin de mantener constante el k_La se realizó un proceso iterativo basado en las ecuaciones (11) a (16). De esta manera teniendo definidas las dimensiones de los reactores y sus partes así como el flujo de aire, fue posible suponer

MATERIALES Y MÉTODOS

diferentes velocidades de agitación para cada reactor y escoger la que permitía obtener el $k_L a$ deseado.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cultivos en mini-fermentadores de 200 mL. Medio AM2-glc. 80 g/L

Se realizaron cultivos en mini-fermentadores de 200 mL, agitados a 150 rpm, no aireados; con el fin caracterizar la cepa JU15A en medio mineral suplementado con 70 g/L de glucosa (cuantificado experimentalmente) y comparar los resultados con los obtenidos, durante la construcción y caracterización de la cepa L-lactogénica JU15A con 40 g/L (1.3 g/L.h) de glucosa inicial en estos mismos mini-fermentadores (Utrilla Carreri, 2010). Desde el inicio de esta tesis, se decidió incrementar la concentración de glucosa aproximadamente el doble con respecto al usado para caracterizar las cepas lactogénicas construidas en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, con el fin de evaluar a las cepas en un contexto más cercano al de un proceso de producción comercial. En la figura 7 se presentan las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato con 70 g/L de glucosa. En la figura 8 se muestra la comparación de los diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos con respecto a los datos obtenidos para JU15A con 40 g/L de glucosa.

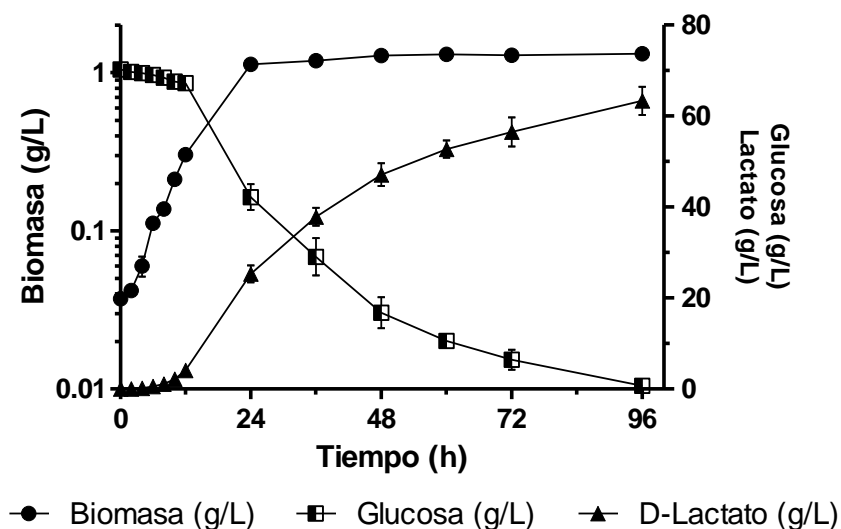


Figura 7. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato con JU15A en mini-fermentadores de 200 mL, no aireados y 70 g/L de glucosa inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

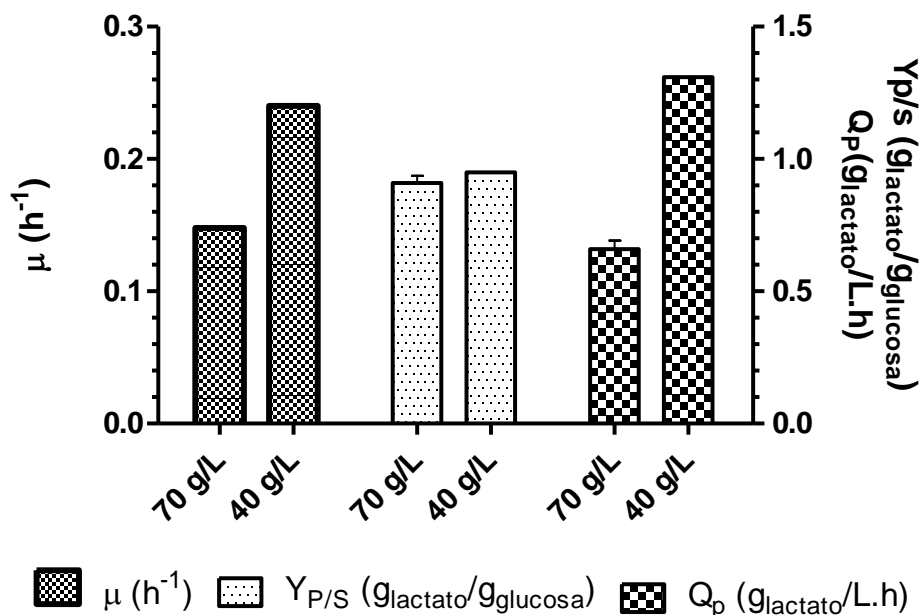


Figura 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en los cultivos con mini-fermentadores a 40 y 70 g/L de glucosa inicial

La biomasa promedio que se alcanzó entre las 24 y 96 horas del cultivo con 70 g/L de glucosa fue de 1.25 g/L, valor similar al obtenido con 40 g/L. La mayor velocidad de consumo de glucosa y de producción de D-Lactato se presentó entre las 12 y 36 h del cultivo. Durante la fase estacionaria, después de las 40 h, disminuyeron las velocidades de consumo de glucosa y de producción de lactato; a las 96 h se agotó la glucosa y se alcanzó una concentración de 63 g/L de lactato. En comparación con el cultivo con 40 g/L de glucosa, la velocidad específica de crecimiento (μ) se redujo 40%, la productividad volumétrica de lactato 50% y el rendimiento lactato/glucosa 5%, siendo este último 91% del máximo teórico, y lográndose 38 y 63 g/L de lactato, respectivamente. De las 12 a 36 h de la fermentación la productividad volumétrica de lactato en el cultivo con 70 g/L de glucosa fue de 1.41 g/L.h, valor muy similar al obtenido en el de 40 g/L. Este comportamiento aunado al posterior decremento en la velocidad de consumo de glucosa y de producción de lactato, sugieren que existe un efecto negativo (una probable inhibición) por el lactato acumulado y la base agregada (en forma de KOH) al cultivo para neutralizar la producción de ácido láctico. Adicionalmente, la disminución en la μ sugiere

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que también se presenta al inicio del cultivo un efecto de presión osmótica; no obstante, el efecto sobre el rendimiento lactato/glucosa es menor, lográndose rendimientos aceptables para la producción comercial del metabolito (Utrilla Carreri, 2010).

8.2 Estudio de la velocidad de agitación en fermentadores de 1 L

De acuerdo a la estrategia experimental y con el fin de generar resultados para evaluar las estrategias de escalamiento, se estudió el efecto de la velocidad de agitación, 60 y 400 rpm, en fermentadores de 1 L, que a diferencia de los mini-fermentadores (sección 7.5), cuentan con una configuración geométrica y operacional similar a los fermentadores de 10 y 100 litros de volumen nominal, que se tienen en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnología – UNAM (y de fermentadores de escala industrial). Los fermentadores de 1 L (descritos en la sección 7.6) tienen una mayor versatilidad y mejor control sobre variables como: pH, temperatura, tipo y velocidad de agitación, espuma, y de ser requerido, suministro de aire, control de oxígeno disuelto y transferencia del mismo. Para estudiar el efecto independiente de la velocidad de agitación en estos cultivos se le eliminó, previamente a la inoculación, mediante el suministro de una corriente gaseosa de nitrógeno, el aire contenido en la parte superior del fermentador. En las figuras 9 y 10 se presenta el comportamiento de la cepa en cuanto a crecimiento, consumo de glucosa y producción de D-lactato para cada velocidad de agitación, 60 y 400 rpm. Se encontró que para ambas velocidades de agitación, la cepa presenta una fase de adaptación significativamente larga, de 26 h para el cultivo a 60 rpm y poco menor a 16 h para el de 400 rpm. A las 72 horas de cultivo, con 400 rpm, se obtuvieron mayores concentraciones de biomasa y D-Lactato, así como un mayor consumo de glucosa, aunque a ese tiempo la cantidad de glucosa remanente en el medio fue mayor a 35 g/L (figura 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

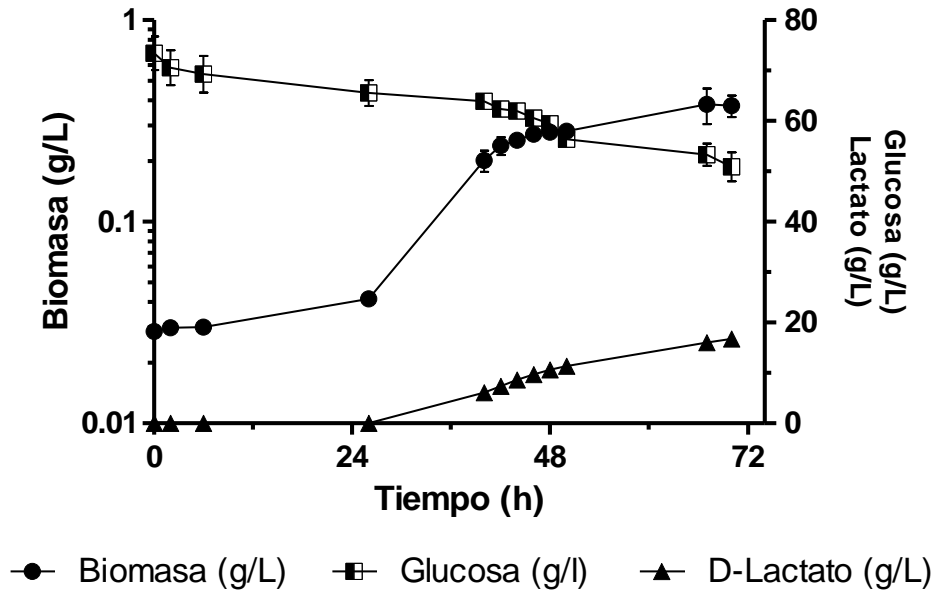


Figura 9. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de D-lactato a 60 rpm, con previa eliminación del aire presente en la parte superior del fermentador, en fermentadores de 1 L y 73 g/L de glucosa inicial.

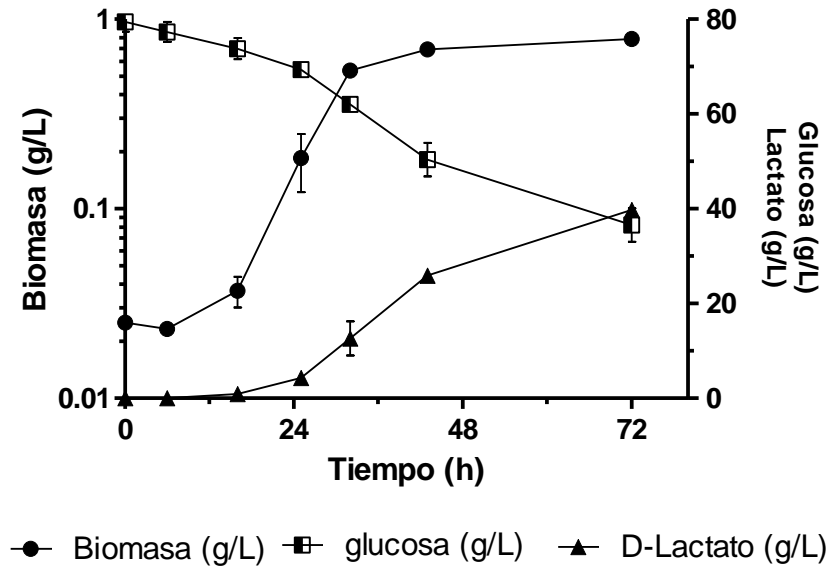


Figura 10. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de D-lactato a 400 rpm, con previa eliminación del aire presente en la parte superior del fermentador, en fermentadores de 1 L y 80 g/L de glucosa inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En comparación a lo obtenido en mini-fermentadores de 200 mL con 70 g/L de glucosa inicial y agitados a 150 rpm (figura 11), la μ fue ligeramente mayor para el cultivo a 400 rpm; así mismo la productividad volumétrica fue 45 y 9.4% menor para los cultivos a 60 y 400 rpm, respectivamente. Aún con la presencia de la fase crecimiento retardado y la baja productividad volumétrica, el rendimiento de conversión de glucosa a D-Lactato fue mayor al 90% del teórico máximo.

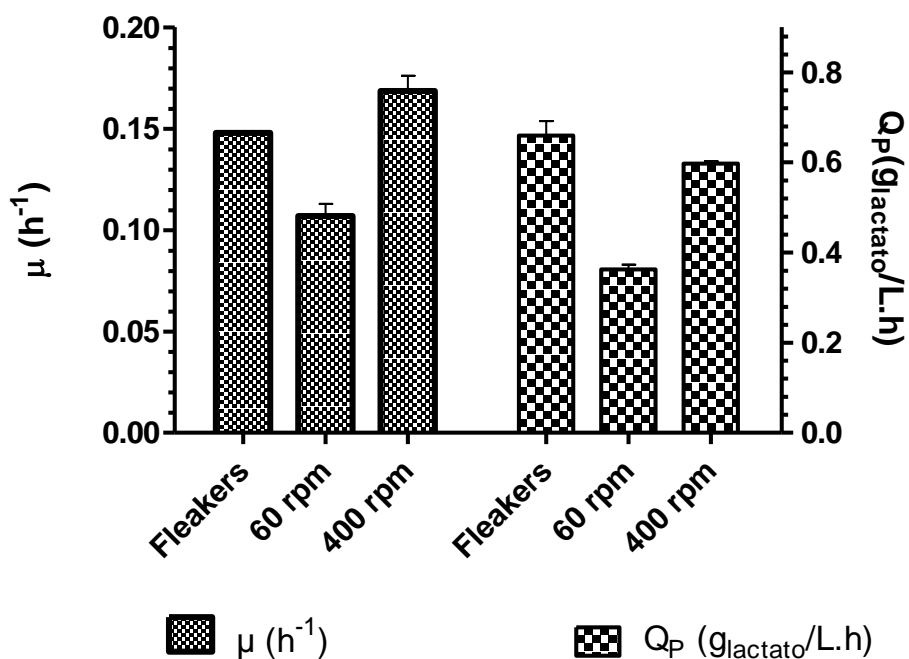


Figura 11. Comparación de parámetros cinéticos entre cultivos en mini-fermentadores (150 rpm, glucosa 70 g/L y sin eliminar el aire en la parte superior del fermentador) y cultivos en fermentador de 1 litro a 60 y 400 rpm (glucosa 73 y 80 g/L, respectivamente, eliminando el aire en la parte superior del fermentador)

No obstante que el lactato es un producto del metabolismo fermentativo de *E. coli*, que se sintetiza para regenerar poder reductor en ausencia de oxígeno, la larga fase de adaptación de los cultivos en los que se eliminó el aire en la parte superior del fermentador, sugiere que se requirió una adaptación metabólica. Esto podría deberse a que el inóculo utilizado fue preparado en mini-fermentadores que a pesar de ser no aireados, no se les retiró el aire contenido en la parte superior (100 mL aproximadamente). Tampoco se evitó estrictamente el intercambio de gases entre el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mini-fermentador y el medio ambiente, y por tanto existe cierta cantidad de oxígeno que se transfiere al medio de cultivo, al inicio y a lo largo de la fermentación. Por esta razón, las bacterias en un ambiente “microaerobio” en los mini-fermentadores, no presentaron fase de crecimiento retardado; mientras que las células cultivadas en el medio anoxigénico, del reactor de 1 L, requirieron de una etapa de adaptación para comenzar a crecer.

Como consecuencia de la fase de adaptación, la productividad volumétrica y el consumo de glucosa se vieron fuertemente reducidos con respecto a los obtenidos en los cultivos en mini-fermentadores. Estos resultados sugieren que cambiando la forma de preparación del inóculo, de microaerobia a una libre de oxígeno, podría eliminarse la fase de adaptación, y por tanto, se obtendría una mayor productividad. Sin embargo, realizando cálculos en los que se prescindió del tiempo de esta fase (a 400 rpm), el valor de productividad alcanzada en los mini-fermentadores con 70 g/L de glucosa inicial siguió siendo mayor ($0.83 \text{ g}_{\text{Lactato}}/\text{L.h}$) al obtenido en 1 L. Con base en estos resultados, se consideró que la utilización de una condición anaerobia no es recomendable para un proceso comercial, más aún si se tiene en cuenta que la aspersion de nitrógeno u otro gas inerte y el mantenimiento de una condición anóxica estricta en un fermentador de gran escala generaría incrementos en el costo de operación, comparado por ejemplo con el suministro de aire. Cabe notar que los reactores no se encontraban totalmente aislados del ambiente y en casos como la toma de muestra pudo entrar cierta cantidad de aire, el cual transfiere una mayor cantidad de oxígeno a la velocidad de agitación de 400 rpm. Esta condición favorece el crecimiento celular y, en conjunción con los resultados descritos en los párrafos anteriores, sugieren la necesidad de suministrar cierta cantidad de oxígeno en el medio. Además, el suministro de cantidades pequeñas y controladas de aire permitiría tener un mejor control del crecimiento celular y generar a escala comercial una presión positiva en el fermentador, disminuyendo las posibilidades de entrada de contaminantes.

A pesar de ser *E. coli* un microorganismo facultativo, que regula su metabolismo a través de los sistemas FRN y Arc, con el fin de llevar a cabo los procesos energéticamente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

más favorables a los cambios de disponibilidad de oxígeno en el medio (Spiro y Guest, 1991), cierta cantidad de oxígeno transferido al medio favorece el crecimiento, y por tanto el consumo de la fuente de carbono y producción de lactato por parte de la cepa JU15A. En su conjunto, estos resultados sugieren que al escalar este tipo de fermentación se deba buscar un criterio que involucre valores controlados de transferencia de oxígeno con el fin de favorecer una mayor productividad volumétrica de lactato.

8.3 Estudio de la velocidad de aireación en fermentadores de 1 L

Con base en los resultados reportados en la sección anterior y al diseño experimental original, se decidió evaluar el efecto de la velocidad de aireación usando 4 velocidades: 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 vvm, y una velocidad de agitación constante de 400 rpm en el fermentador de 1 L. En las figuras 12a, 12b y 12c se muestran las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato respectivamente. Cabe notar que cada una de estas velocidades de aireación corresponde a un valor de k_{La} en el fermentador, valor que fue determinado por el método de estado no estacionario. Las figuras 12 a-c, 13 y 14 se muestran en función del k_{La} y no de la velocidad de aireación, los valores correspondientes vvm/ k_{La} se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores correspondientes de k_{La} para cada velocidad de aireación ensayada

vvm	0.05	0.1	0.2	0.5
k_{La} (h^{-1})	5.9	12.6	17.5	28.7

El crecimiento bacteriano (figura 12a) fue similar para los k_{La} de 17.5 y 28.7 h^{-1} , alcanzando concentraciones de biomasa alrededor de 2.5 g/L, esto es 2.5 veces más que en los cultivos en los mini-fermentadores. En el caso del cultivo de 12.6 h^{-1} , se obtuvo un crecimiento ligeramente menor, llegando a una concentración de 2 g/L de biomasa. Sin embargo, la velocidad de consumo de glucosa (figura 12b) y de producción de lactato (figura 12c), fueron similares a las obtenidas para 17.5 y 28.7 h^{-1} . En lo referente al cultivo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

con un k_{La} de 5.9 h^{-1} , la concentración alcanzada de biomasa fue de 1.3 g/L , reduciéndose de forma significativa el consumo de glucosa y la síntesis de D-lactato. La producción de D-lactato fue mayor a 60 g/L , entre las 24 y 30 h, para los fermentadores con un k_{La} entre 12.6 y 28.7 h^{-1} (figura 12c), mientras que para 5.9 h^{-1} , la concentración de lactato solo llegó a 50 g/L , quedando un remanente de 20 g/L de glucosa a las 36 horas.

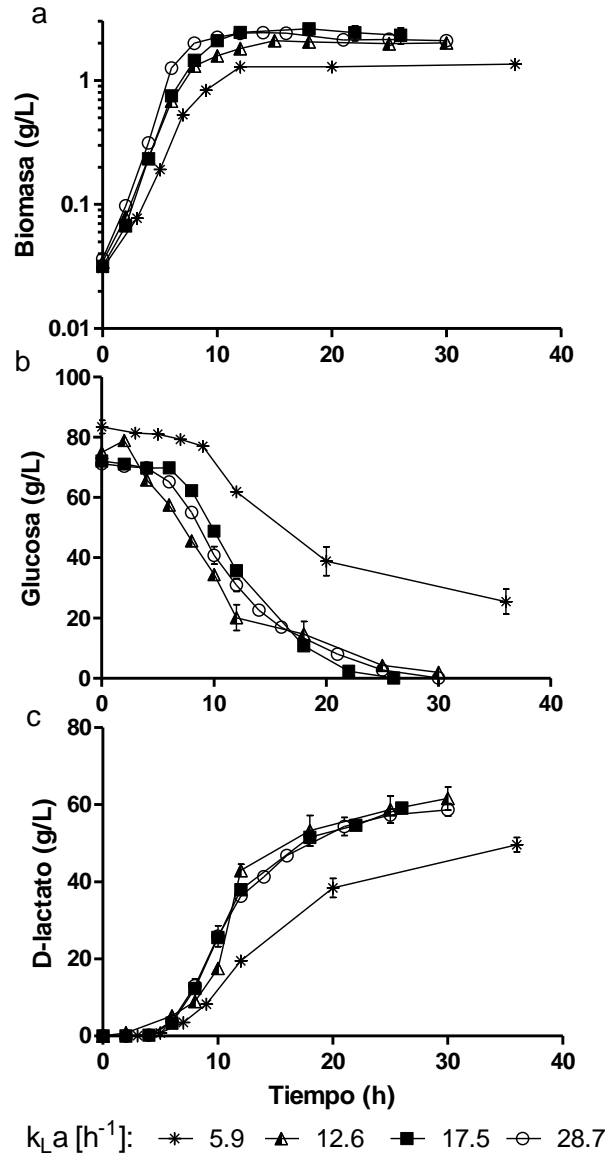


Figura 12. Cinéticas de crecimiento (a), consumo de glucosa (b) y producción de lactato (c) para los cultivos a diferentes velocidades de aireación. Glucosa 80 g/L, 400 rpm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

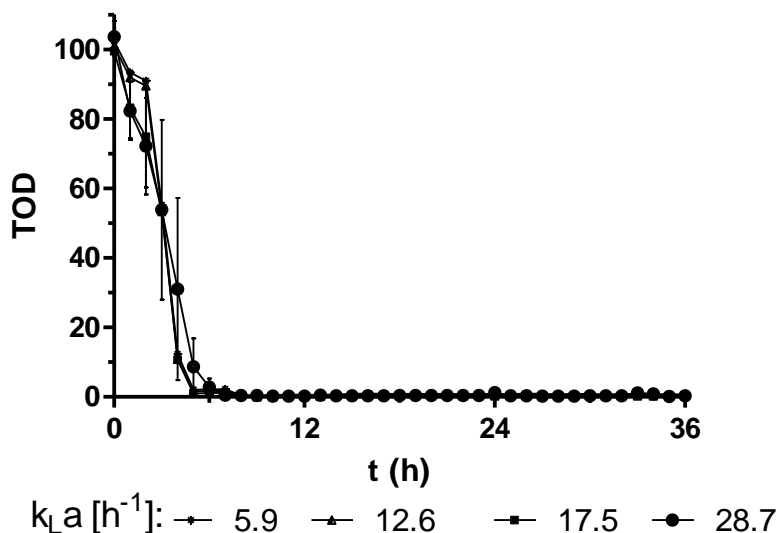


Figura 13. Cinéticas de tensión de oxígeno disuelto para los cultivos a diferentes velocidades de aireación

Con fines de comparación, el cultivo en fermentadores de 1 L sin aireación y agitados a 400 rpm, se incluyó en la figura 14; en todos los casos la μ y la velocidad volumétrica de producción fueron sustancialmente mayores para los cultivos con aireación controlada. La μ aumentó proporcionalmente al incremento en la velocidad de aireación. La productividad volumétrica aumentó sustancialmente al pasar de 5.9 a 12.6 h^{-1} ; sin embargo, el incremento de este parámetro fue mínimo cuando el k_{La} se incrementó de 12.6 a 28.7 h^{-1} . El mayor rendimiento lactato/glucosa se obtuvo en los fermentadores de 1 L sin aireación (91% del máximo teórico) y fue prácticamente constante de 5.9 a 12.6 h^{-1} (0.86 y 0.87) y de 17.5 a 28.7 h^{-1} (0.82 y 0.83), en los fermentadores de 1 L aireados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

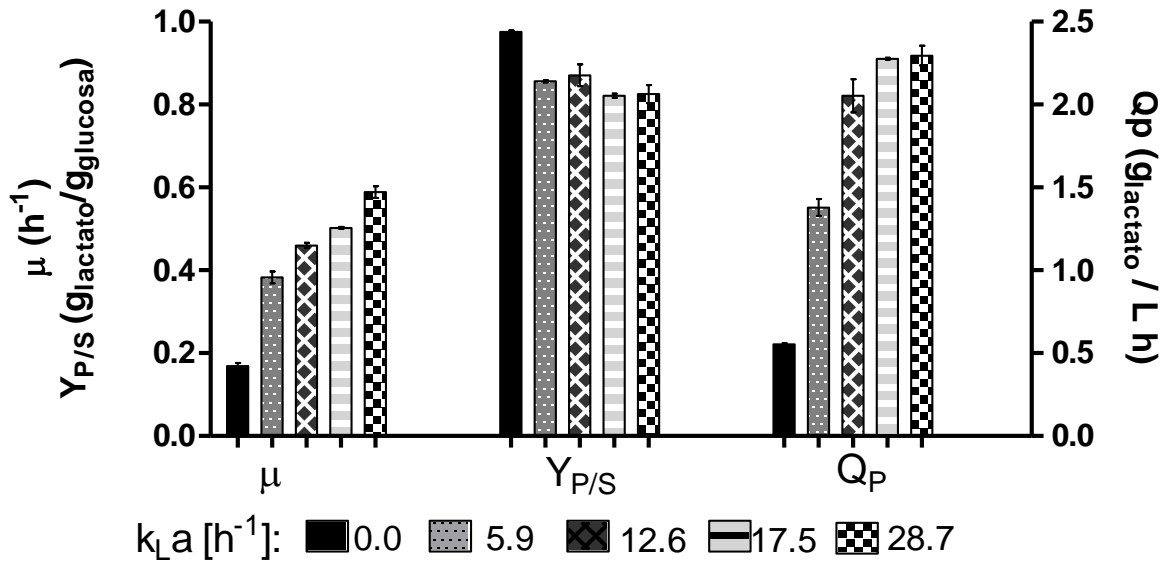


Figura 14. Parámetros cinéticos y estequiométricos para los cultivos a diferentes $k_L a$ en fermentador de 1 L

Es evidente que al acumular cantidades de biomasa mayores a 0.2 g/L el nivel de oxígeno disuelto llega a valores de 0 ($C_L = 0$), entre las 5 y 6 h para todos los cultivos reportados en la figura 13. Como se presentó anteriormente, el $k_L a$, p.ej. a 0.1 vvm, es de $12.6 h^{-1}$, y considerando que con la temperatura y el medio de cultivo empleados se tienen solubilidades similares del oxígeno en agua ($C_L^* = 7$ ppm o 0.22 mmol O_2 /L) (Doran, 1995), la transferencia de oxígeno ($k_L a [C_L^* - C_L]$) es igual a 2.77 mmol O_2 /L.h. Por otro lado, la velocidad específica de respiración (q_{O_2}) de *E. coli* es de 10 mmol O_2 /g $_{DCW}$.h (Doran, 1995) y al alcanzar 0.3 g/L de biomasa, la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno ($q_{O_2} \cdot X$) es al menos 3 mmol O_2 /L.h. En consecuencia, el balance entre suministro y consumo de oxígeno demuestra que todo el oxígeno transferido es consumido, ocasionando que el oxígeno disuelto sea cero y por lo tanto se presentan condiciones de limitación de oxígeno que favorecen los procesos de fermentación, particularmente en este caso la formación de D-Lactato, a partir de las 6 horas de cultivo (Fig. 12b), con el fin de reciclar el NAD^+ necesario para que las células se mantengan viables bajo limitación de oxígeno. Además, la cantidad de oxígeno que se transfiere al medio, y se consume, propicia un crecimiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bacteriano más rápido (Fig. 14), así como una densidad celular final mayor (Figs. 12a). Por otra parte, las cinéticas presentadas en la figura 12 indican que el lactato es un metabolito parcialmente asociado al crecimiento, cuya producción se da mayoritariamente en fase estacionaria, en el caso de los cultivos aireados. Adicionalmente, al alcanzarse más rápidamente una mayor densidad celular, y mantenerse activas las enzimas involucradas en la vía de producción de lactato (Utrilla *et al.*, 2009), entonces la productividad volumétrica aumenta considerablemente (fig. 14).

Tomando en consideración que el contenido de carbono en la glucosa es del 40% y en *E. coli* 48% (Doran, 1995; Tao et al., 2001), entonces se tiene que de 1.7 a 3.0 g/L de glucosa se utilizaron para la producción de biomasa. En lo relacionado con otros productos de fermentación, cuantificados por HPLC, como ácido acético, succínico, fórmico y pirúvico, no se produjeron en cantidades apreciables (datos no mostrados), y contribuyeron aproximadamente al consumo de 2 g/L de glucosa; de tal manera que un balance de carbono permite estimar que entre el 7 y 11% de la glucosa se canalizó a la producción de CO₂ debido al metabolismo aerobio durante las primeras 5 a 6 h de los cultivos.

8.4 Selección de la condición para el escalamiento de la fermentación de glucosa a D-lactato con JU15A.

A pesar de la disminución en el rendimiento, los cultivos aireados a bajas velocidades se presentan como una buena alternativa para la producción a gran escala de D-lactato con la cepa JU15A, debido al sustancial incremento en la productividad volumétrica del metabolito. Este parámetro incrementó 3.2 veces (de 0.66 a 2.1 g/L.h) cuando se compararon los cultivos en los mini-fermentadores sin aireación y los cultivos en fermentador de 1 L a 0.1 vvm con concentraciones iniciales de glucosa similares (aprox. 70 g/L; Fig. 14), resultando en una reducción de 96 a 30 h de cultivo. También la productividad en este último caso fue 1.6 veces mayor cuando se compara con el obtenido con 40 g/L de glucosa en mini-fermentadores sin aireación (Fig. 8). Aunque los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

valores de productividad de lactato para 0.2 y 0.5 vvm fueron 10% mayores que para 0.1 vvm, la reducción efectiva del tiempo de fermentación es menos a 6 h y por tanto, para efectos prácticos y de economía, se escogió la condición de 0.1 vvm, para llevar a cabo el escalamiento con la cepa JU15A.

A partir de estos resultados se procedió a elegir un criterio de escalamiento que permitiera obtener rendimientos y productividades similares a los obtenidos en 1 L en cultivos con JU15A a escalas mayores. Dada la importancia de la transferencia de oxígeno en la producción de lactato con la cepa evaluada, fue necesario elegir un criterio con el objetivo de mantener a los cultivos bajo una transferencia suficiente oxígeno para permitir un adecuado crecimiento celular, pero sin evitar la limitación por oxígeno en las bacterias, con el fin de favorecer la producción de lactato y regenerar poder reductor.

Existen varios métodos para elegir el criterio de escalamiento: fundamentales, semi-fundamentales, análisis dimensional y empíricos (García-Ochoa y Gómez, 2009). Los dos primeros requieren el empleo de una gran cantidad de modelos matemáticos para determinar la influencia de las condiciones operacionales y la geometría del fermentador. Por su parte, el análisis dimensional no se considera la mejor opción, puesto que muchas veces deja por fuera variables muy importante en el proceso o da lugar a valores imposibles de otras variables (García-Ochoa y Gómez, 2009; Quintero Ramírez, 1981; Ramírez Reivich, 2007). Con base en los resultados reportados en la sección anterior, en este trabajo se seleccionó como criterio de escalamiento al $k_L a$ debido a que permite tener control sobre la transferencia de oxígeno cuando el oxígeno disuelto es cero durante gran parte de los cultivos. El mantener constante otros criterios tal como P_g/V , genera un aumento en el estrés de corte y una reducción sensible en el $k_L a$ (García-Ochoa y Gómez, 2009; Quintero Ramírez, 1981; Ramírez Reivich, 2007). Cabe mencionar que cuando el oxígeno disuelto es igual a cero, en un proceso con baja aireación, el escalar una fermentación con base en $k_L a$ o velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) es equivalente (ec. 9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.5 Cálculo del k_La en el fermentador de 1 L y las condiciones de cultivo para mantenerlo constante en 11 y 85 L.

El cálculo del k_La en el fermentador de 1 L se hizo con base en la velocidad de aireación seleccionada, correspondiente a 0.1 vvm, y la velocidad de agitación de 400 rpm. Reemplazando estos valores en las ecuaciones empíricas (11) a (16) se determinó un k_La de 10.1 h^{-1} ; se consideró la densidad del medio similar a la del agua ($1,000 \text{ kg/m}^3$) y el diámetro del impulsor (0.032m) correspondiendo a 1/3 del diámetro del tanque.

Dicho valor de k_La fue comparado con el obtenido de manera experimental por el método de estado no estacionario (ecuaciones 9 y 10), corregido por el tiempo de respuesta del electrodo por el método de los momentos. De esta manera se obtuvo un valor de 12.6 h^{-1} , es decir con una variación del 20% entre el valor experimental y el basado en ecuaciones empíricas. Esta comparación permitió utilizar las ecuaciones (11) a (16) con el fin de determinar las condiciones de operación para otras escalas evaluadas en este trabajo.

Con base en el valor de k_La obtenido empíricamente para el fermentador de 1 L, se determinó la velocidad de agitación requerida para mantener el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno constante en escala de 11 L. Por cuestiones económicas, se decidió conservar la velocidad de aireación en un valor de 0.1 vvm. Para este fin se hizo uso de las ecuaciones (11) a (16) y un cálculo iterativo en el que se ensayaron diferentes velocidades de agitación, hasta encontrar la que se ajustaba mejor al k_La deseado. Los cálculos se hicieron con base en la utilización de 3 impulsores separados por una distancia igual a su diámetro (1/3 del fermentador). La velocidad de agitación hallada por este método para el fermentador de 11 L fue de 180 rpm, con la cual se obtuvo un k_La de 10.9 h^{-1} . De igual manera se realizó el cálculo para la velocidad de agitación en el fermentador de 85 L, el cual se usó con 2 impulsores, con una separación correspondiente al doble de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

su diámetro; en este caso una velocidad de 70 rpm permitió obtener un k_La de aproximadamente 10.9 h^{-1} , cuando se utiliza, también, un flujo de aireación de 0.1 vvm.

8.6. Fermentación láctica en 11 L

Se realizó la experimentación (por duplicado) en fermentadores de 11 L utilizando 80 g/L de glucosa inicial y controlando el pH con KOH 4 N (0.1 vvm, 180 rpm). Para realizar una comparación y constatar los resultados obtenidos a escala de 1 L. A la par se hicieron (por duplicado) otros cultivos de 1 L usándose en este caso KOH 4N para controlar el pH y 91.5 g/L iniciales de glucosa a 0.1 vvm y 400 rpm; esto es a un mismo valor de k_La . En la figura 15 se muestran las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para los cultivos mencionados y su comparación con los datos obtenidos para los fermentadores de 1 L

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

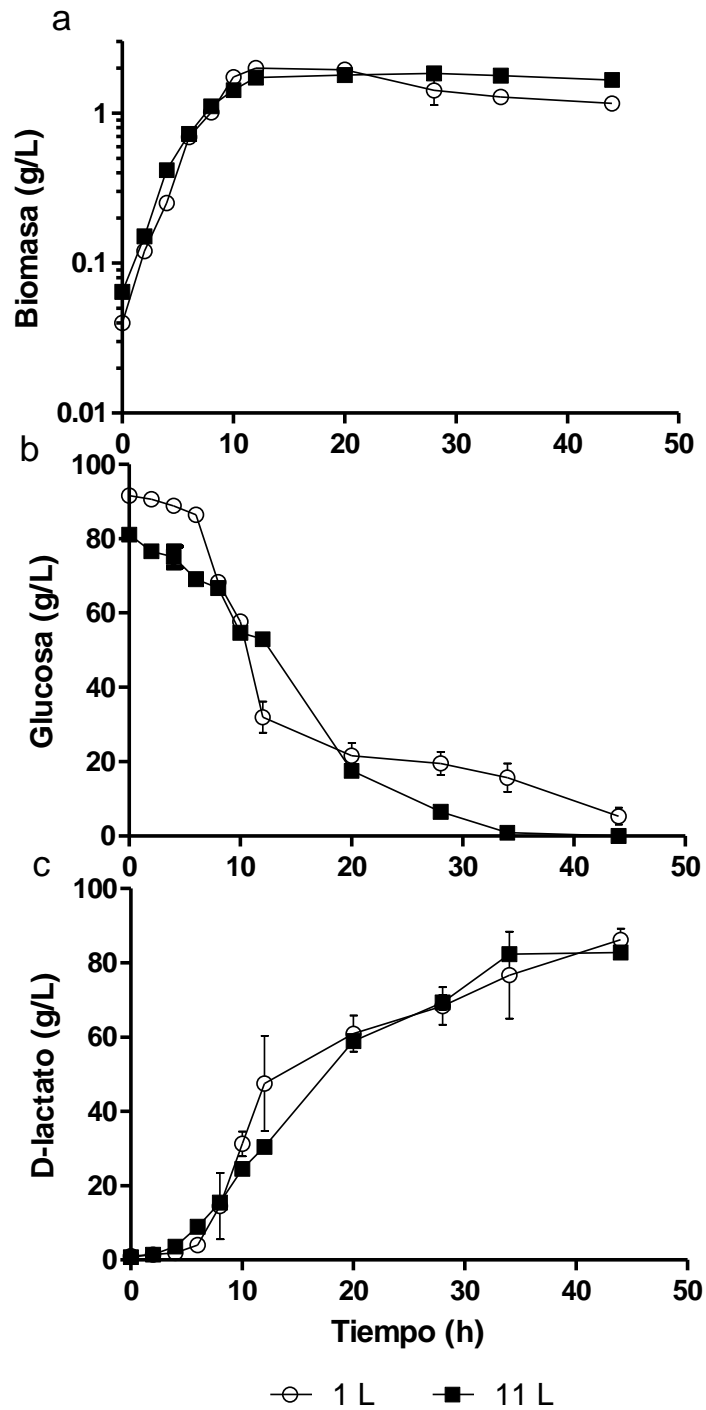


Figura 15. Comparación de cinéticas de crecimiento (a), consumo de glucosa (b) y producción de lactato (c) para fermentadores de 1 y 11 L con un $k_{L\alpha}$ de 10.9 h^{-1} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de estos datos se calcularon los parámetros cinéticos y estequiométricos que se ilustran en la figura 16.

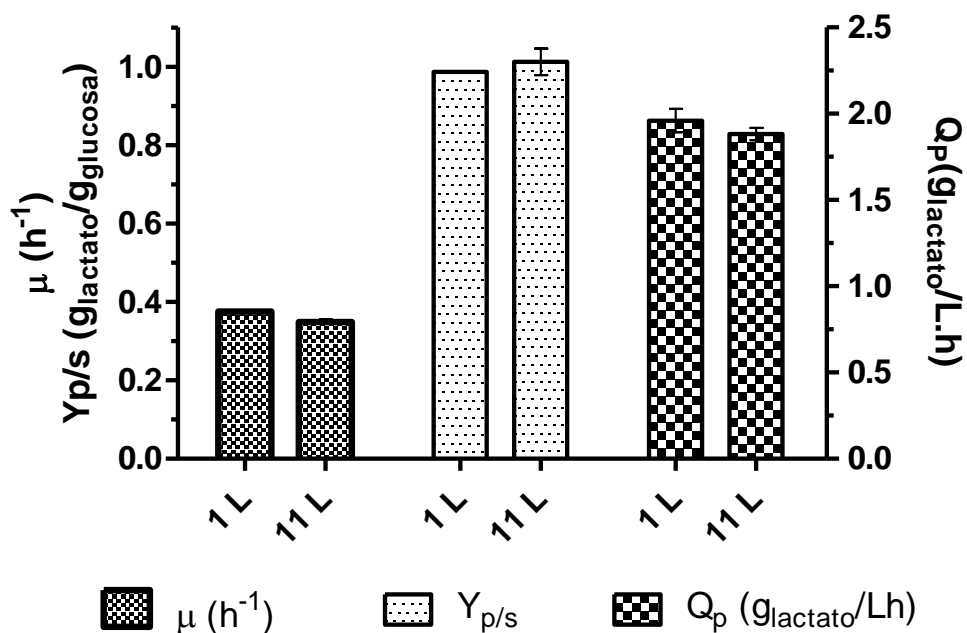


Figura 16. . Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentadores de 1 y 11 L con un mismo k_{La} de 10.9 h^{-1} .

Como se aprecia en la figura 15, hay una tendencia similar para el crecimiento (figura 15a), consumo de glucosa (figura 15b) y producción de D-Lactato (figura 15c) en ambos volúmenes de trabajo. La μ fue similar para ambas escalas (figura 16); en el cultivo de 1 L, por haberse iniciado con una concentración de glucosa superior (91.5 g/L), se tuvo un retraso en el consumo de glucosa y la producción de lactato. Sin embargo, esto no afectó la productividad volumétrica que se mantuvo alrededor de 2 g/Lh. Estos resultados sugieren que el k_{La} es un criterio adecuado para escalar la producción de lactato con JU15A, al menos de una escala de 1 a 11 L.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.7 Fermentación láctica en 85 litros

Esta fermentación se llevó a cabo usando una velocidad de agitación de 70 rpm, para mantener el $k_L a$ constante en 10.9 h^{-1} , al utilizar una velocidad de aireación de 0.1 vvm. Cabe notar que la configuración de estos fermentadores es diferente a la que se tenía para las escalas de 1 y 11 L, cuyos impulsores tenían un tamaño equivalente a $1/3$ del diámetro del tanque, mientras que los del fermentador de 85 L son de $1/2$. Otra variación importante consiste en el agua utilizada para los cultivos, en los de 1 y 11 L se hizo uso de agua destilada, mientras que en los de 85 L se utilizó agua potable.

Las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato se ilustran en la figura 17, y en la figura 18 se presentan los valores de μ , rendimiento y productividad. Estos cultivos se realizaron por duplicado.

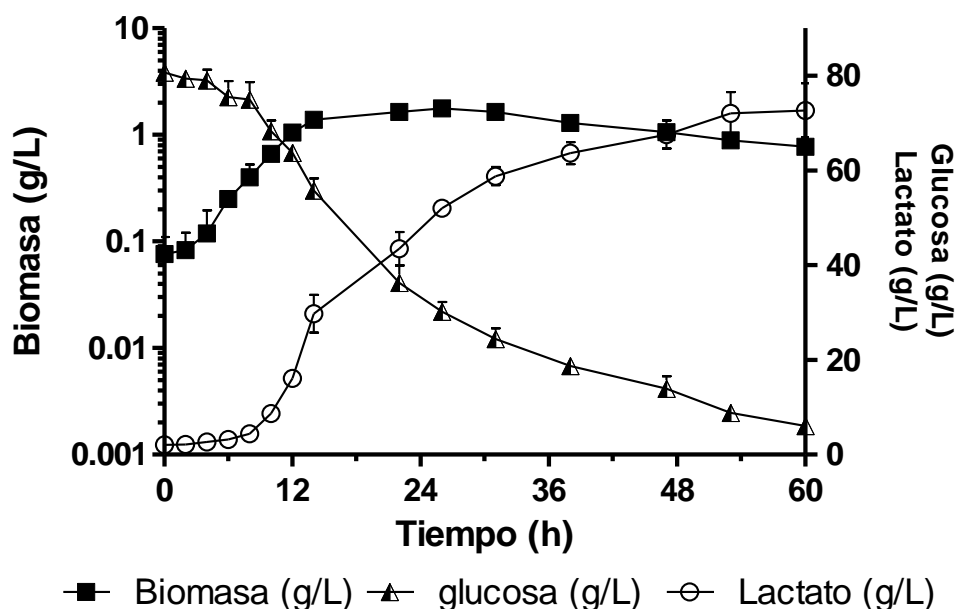


Figura 17. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para el cultivo a 85 L.

En comparación con los cultivos realizados a escalas de 1 y 11 L con un $k_L a$ de 10.9 h^{-1} , se observa que en los cultivos de 85 L se redujeron drásticamente las velocidades de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

crecimiento (15%) y de consumo de glucosa, así como en la productividad de lactato (figura 18) (40%), tardándose más de 60 h para consumir los 80 g/L de glucosa (Figura 17). Por su parte, el rendimiento lactato/glucosa no fue apreciablemente diferente entre los 3 volúmenes, debido a no ser un parámetro cinético dependiente del tiempo, sino estequiométrico, que depende de las concentraciones iniciales y finales de glucosa y lactato, las cuales fueron similares para los 3 fermentadores.

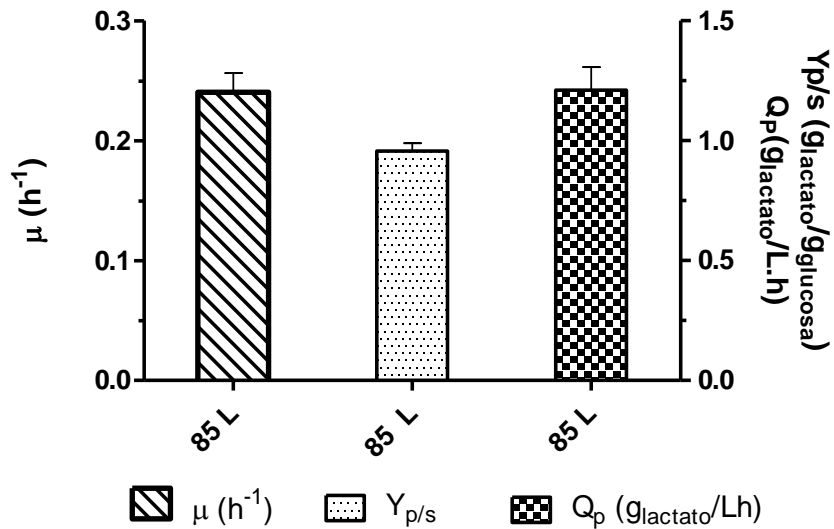


Figura 18. Parámetros cinéticos y estequiométricos en los cultivos de 85 L. Glucosa 80 g/L, 70 rpm

Los resultados cinéticos encontrados en los experimentos a 85 L, resultaban contradictorios con lo postulado a partir del uso del k_La como criterio de escalamiento, además de que al descargar y limpiar el segundo lote de fermentación a esta escala, se notó que en la pared interna de la parte superior había una gran cantidad de material que parecía estar quemado. Este fermentador de la UEPP del IBT-UNAM controla la temperatura mediante el flujo de agua proveniente de una torre de enfriamiento, cuando requiere enfriar, y mediante la adición de vapor, cuando requiere calentar. En ambos casos el flujo de vapor o agua es a través de una chaqueta que tiene el fermentador. Este hecho llevó a sospechar que podrían haberse presentado oscilaciones, debido al sistema de control y a que se usó un volumen de operación relativamente bajo. Adicionalmente al

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

control que muestra la temperatura instantánea en un punto del fermentador, la UEPP cuenta con un sistema de adquisición de datos para diversas variables del mismo. Se procedió a analizar el registro de esta variable y como puede apreciarse en la figura 19, el registro de la temperatura, en el termopozo que tiene instalado el fermentador, osciló entre 33 y 40°C durante el inicio de la fermentación. Estos valores no aseguran que en la parte superior del fermentador tuviesen lugar mayores variaciones de temperatura. La oscilación en la temperatura se debe que el fermentador está diseñado para un volumen de trabajo igual o mayor a 100 L (tabla 3). Al trabajar con un volumen de 85 L, el nivel de líquido es muy bajo y la transferencia de calor desde la chaqueta (utilizada para el control de temperatura) al medio es deficiente, generando las oscilaciones descritas. Este resultado se corrobora por el hecho que al final de la fermentación la variación en la temperatura fue menor, debido al aumento en el volumen del medio por la adición de base durante la producción de lactato.

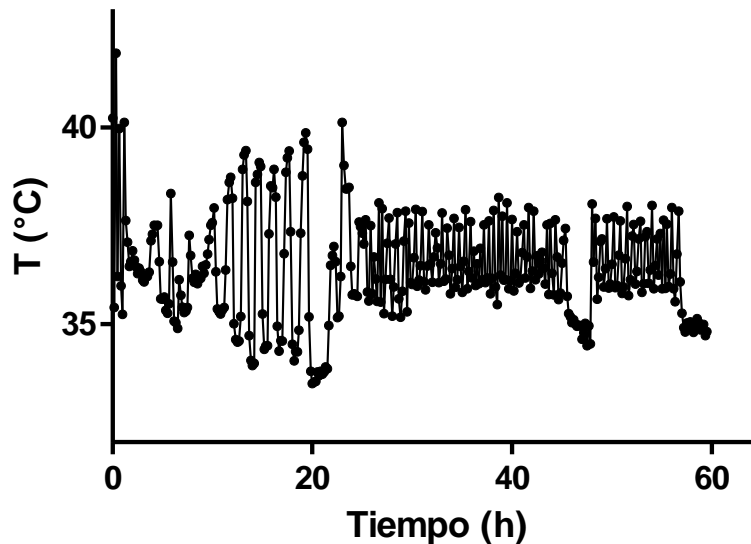


Figura 19. Perfil de temperatura, medida en líquido, en el fermentador de 85 L

Los resultados encontrados para el monitoreo de las variaciones en la temperatura del fermentador, sugieren que el cambio de escala no fue el responsable directo de los detrimentos sufridos en las fermentaciones de 85 L. Se ha reportado que la velocidad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

específica de crecimiento de bacterias como *E. coli* se encuentra relacionada con la temperatura por medio de una modificación de la ley de Arrhenius descrita en la ecuación 17 (Ratkowsky *et al.*, 1982), siendo de carácter exponencial, y por tanto, pequeñas variaciones en la temperatura generaran grandes variaciones en la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = Ae^{-(T_c/RT)} \quad (17)$$

La temperatura de crecimiento óptima de *E. coli* es 37°C, de tal forma que las oscilaciones de más o menos 4°C (figura 19), afectan considerablemente el crecimiento bacteriano y por tanto las demás actividades celulares como el consumo de glucosa y la producción de lactato. Como se explica en la sección de materiales y métodos, se decidió utilizar 85 L en este fermentador con el fin de mantener la mayor similitud geométrica en todas las escalas, particularmente en este caso la altura del líquido respecto al diámetro del fermentador. En consecuencia, emplear un volumen de trabajo mayor constituye una opción para reducir las variaciones de temperatura; se sugirió entonces realizar ensayos con un volumen de trabajo de 110 L en el mismo fermentador.

8.8 Fermentación láctica en 110 litros

Esta fermentación se realizó empleando una velocidad de agitación de 70 rpm, con el fin de mantener el $k_L a$ constante, esto es, el mismo valor empleado para 85 L. La similitud se debe a que al mantener la misma velocidad de aireación (0.1 vmm) e incrementando el volumen en el mismo fermentador, aumenta de forma proporcional la velocidad superficial del aire, lo que influye en gran manera los cálculos a través de las ecuaciones 11 a 16. Las demás condiciones de operación se mantuvieron similares a las utilizadas en el fermentador de 85 L.

En la figura 20 se muestran las curvas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para este volumen de trabajo, y en la 21 los diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos.

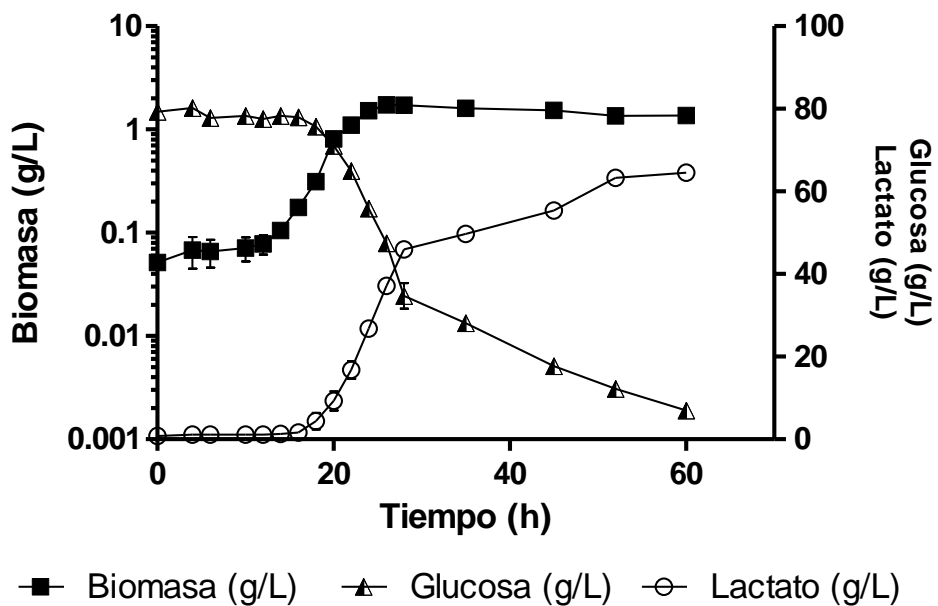


Figura 20. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato en los cultivos de 110 L a un k_{La} de 10.9 h^{-1}

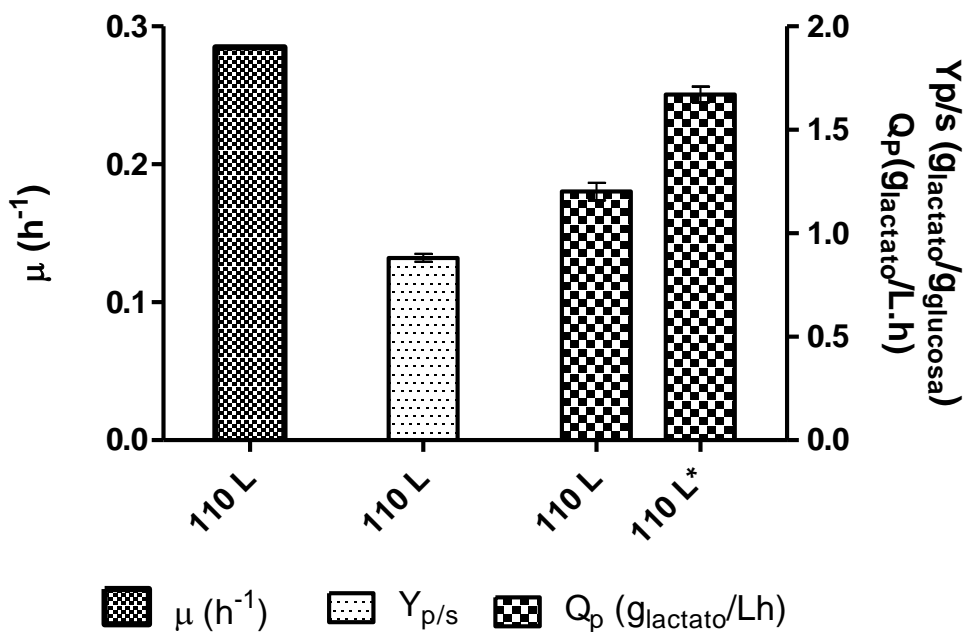


Figura 21. Parámetros cinéticos y estequiométricos en los cultivos de 110 L

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Donde,

$110L^*$ =productividad de lactato eliminando la fase de adaptación

En la cinética de crecimiento (figura 20) puede observarse una fase de adaptación de aproximadamente 16 horas. Este retardo en el inicio del crecimiento generó a su vez un retraso de igual magnitud en el consumo de glucosa y producción de lactato (figura 20), reduciendo la productividad volumétrica en 40% con respecto a la obtenida en escalas menores (figura 21). En principio, si se eliminara esta fase, la productividad volumétrica se recuperaría en un 25%, es decir, sólo sería 15% menor a la obtenida en volúmenes más pequeños (figura 21), pues se mantendría similar la tendencia en las diferentes cinéticas con respecto a las presentadas anteriormente para 1 y 11 L (figuras 15 y 20). Por esta razón, la velocidad específica de crecimiento no se vería afectada, pues este parámetro es determinado a partir de los datos obtenidos para la fase exponencial; de igual manera el rendimiento no disminuye.

La disminución del 15% aún existente en la productividad para 110 L quitando la fase de adaptación, puede corresponder, en parte, a que para este fermentador no se corrigieron los datos por la dilución causada al agregar base, debido a que en este sistema se dio evaporación del medio durante todo el tiempo de cultivo. Sin embargo, no se determinó el volumen evaporado, por lo que corregir los datos solamente con respecto al volumen de base añadida conllevaría a una sobreestimación del lactato producido. No obstante, fue posible observar, al final de la fermentación, que la cantidad evaporada de líquido fue menor que la añadida de base, ya que se obtuvo un mayor volumen de medio de cultivo que el inicial; por tanto, los datos sin corregir aquí utilizados son una subestimación de las cantidades reales presentes.

Las causas de la fase de adaptación son todavía desconocidas puesto que el inóculo fue preparado en fermentadores de 10 L bajo las mismas condiciones que el de 110 L; inclusive se preparó tal como se hizo para los de 85 L. Evitando la fase de adaptación y determinando el factor de dilución real para el final del cultivo, es muy probable que se obtengan resultados de productividad similares a los logrados en fermentadores de 1 y 11

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

L, demostrando la efectividad del k_{La} como criterio de escalamiento de la producción de lactato de 1 a 110 L. No obstante, para poder eliminar dicha fase es necesario primero conocer sus causas, lo cual se sale de los objetivos de este trabajo y se deja para investigaciones posteriores.

8.9 Fermentaciones utilizando la cepa L-lactogénica LL26 en fermentadores de 1 y 11L

La cepa L-lactogénica LL26 se cultivó en fermentadores de 1 y 11 L bajo las mismas condiciones de operación utilizadas para la cepa D-lactogénica JU15A. La importancia de la utilización de esta cepa radica en que LL26 es derivada de JU15A (Leal Reyes, 2010), por tanto, permite validar el criterio de escalamiento, puesto que si éste resulta adecuado también para esta cepa, entonces puede sugerirse el k_{La} de 10.9 h^{-1} como un criterio que podría ser utilizado para el escalamiento a nivel industrial de la producción tanto de D como L-lactato con *E. coli*. En la figura 22 se muestran las curvas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de L-Lactato con LL26 para ambas escalas, en corridas de 35 y 38 h para 1 y 11 L, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

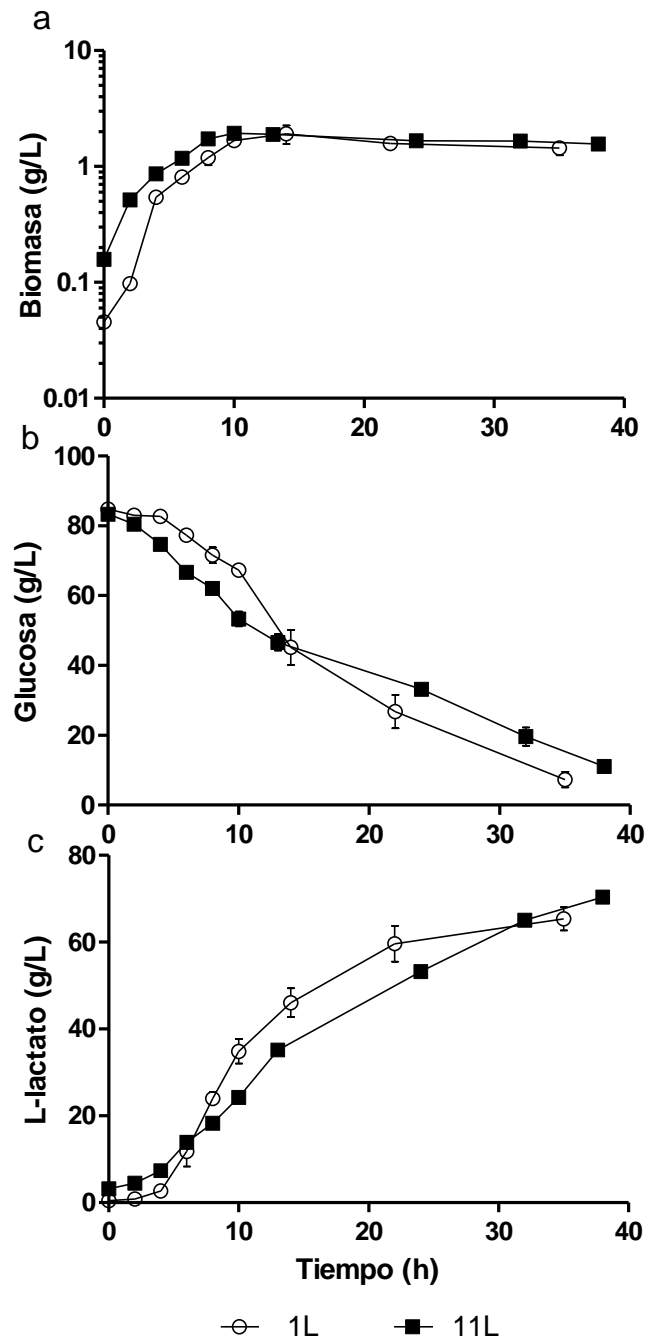


Figura 22. Cinéticas de crecimiento (a), consumo de glucosa (b) y producción de L- lactato (c) para LL26 en fermentadores de 1 L (0.1 vvm, 400 rpm) y 11 L.(0.1 vvm, 180 rpm) con un k_{La} de 10.9 h^{-1}

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cinéticas para ambas escalas mantienen una tendencia similar (figura 22), a pesar de haberse iniciado el cultivo de 11 litros con 3 veces mayor cantidad de inóculo y un consumo de la glucosa más lento para esta misma escala; no obstante en este cultivo se alcanzó una concentración mayor de lactato, lo que genera una productividad similar para ambos cultivos (Figura 23). Las μ para estas fermentaciones con LL26 fueron similares a los que se obtuvieron para JU15A (Figs. 21 y 23). Los rendimientos variaron de 83 a 95% del teórico máximo y también son similares a los obtenidos con JU15A para las escalas correspondientes. Sin embargo, la productividad volumétrica fue entre 15 y 20% menor a la obtenida para JU15A. Leal Reyes (2010) reportó que LL26 tiene mayor actividad enzimática específica de L-Lactato deshidrogenasa que JU15A de D-Lactato deshidrogenasa pero con una productividad volumétrica de lactato 25% menor para LL26. Aunque no se tiene una explicación para este comportamiento, los resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan con lo reportado por Leal Reyes (2010).

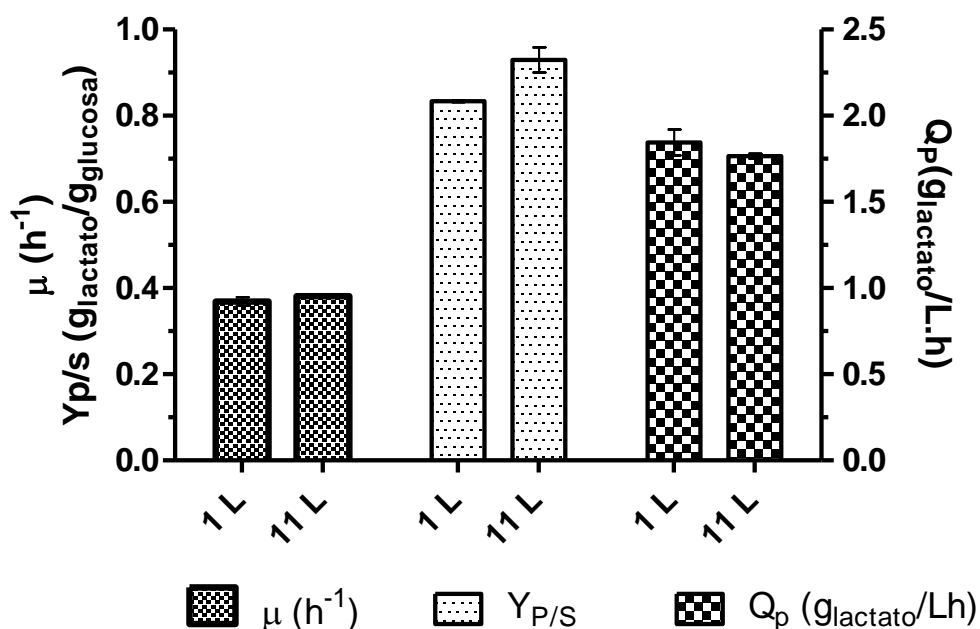


Figura 23. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con LL26 en fermentadores de 1 y 11 L

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De forma global, los resultados obtenidos permiten concluir que el valor de k_La de 10.9 h^{-1} es adecuado para el escalamiento de la etapa de fermentación de L y D-lactato con *E. coli* JU15A y LL26. En la figura 24 se muestra un resumen de los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en las diferentes escalas estudiadas.

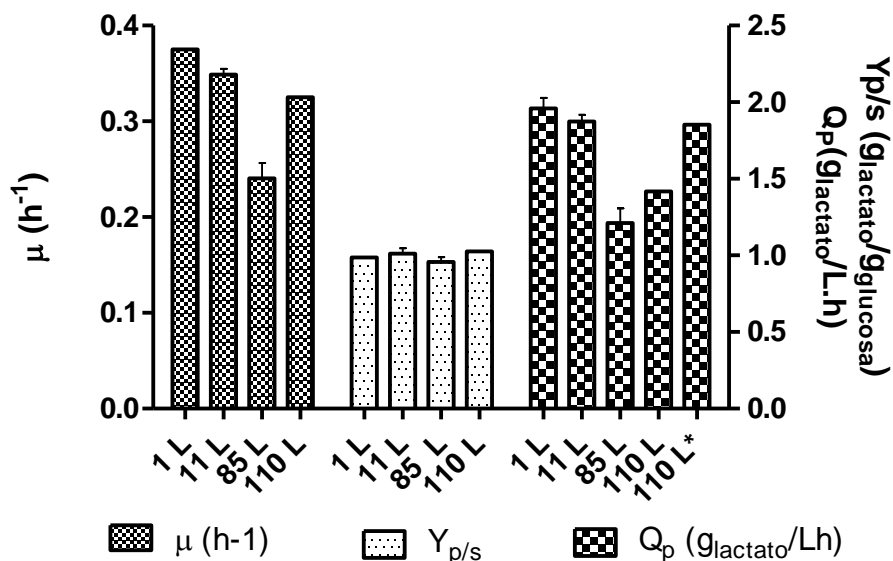


Figura 26. Parámetros cinéticos y estequiométricos en las diferentes escalas estudiadas manteniendo un k_La constante de 10.9 h^{-1}

8.10. Cultivos en fermentadores de 1 L suspendiendo la aireación al llegar a fase estacionaria

Con base a los resultados obtenidos, es posible pensar que el principal efecto de la aireación del cultivo en la producción de lactato está relacionado tanto con la concentración final de biomasa y la μ . Por tanto, es posible que no sea necesario mantener dicha aireación durante todo el cultivo, sino solo durante la fase de crecimiento exponencial, puesto que en fase estacionaria, aparte de alcanzar la máxima concentración celular, las células presentan las vías metabólicas activas para producir lactato, probablemente sin que se requiera de la transferencia de O_2 al medio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estos experimentos se empleó una velocidad de aireación de 0.1 vvm y una velocidad de agitación de 400 rpm, usando los fermentadores de 1 L. El suministro de aire se suspendió a las 12 horas, tiempo en el cual se alcanzó la fase estacionaria. En la figura 25 se presenta la comparación de las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para experimentos paralelos, donde la única diferencia fue suspender la aireación en la fase estacionaria para los cultivos.

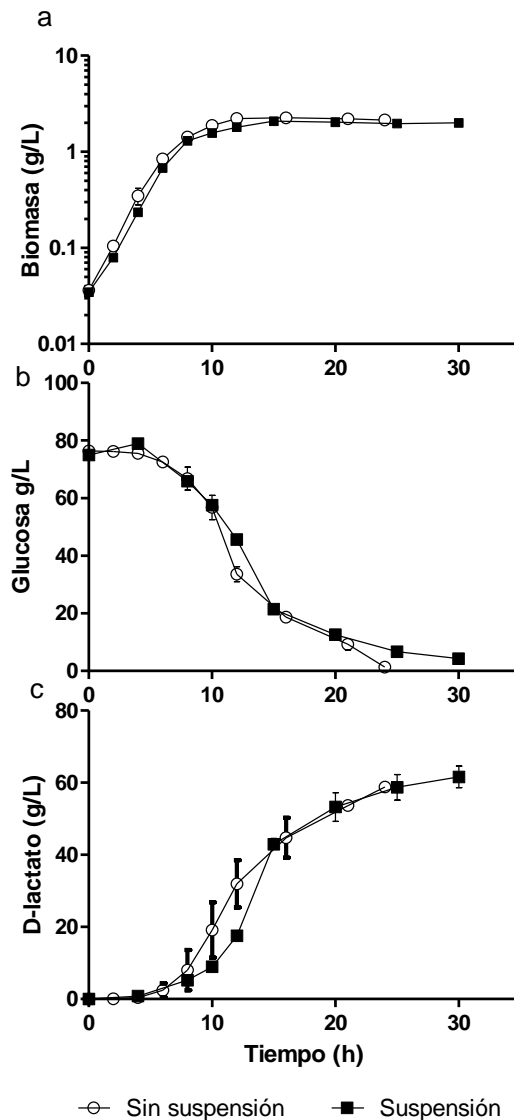


Figura 25. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para fermentaciones en 1 L suspendiendo (a las 12 h del cultivo) y sin suspender aireación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es notable la similitud en todas las cinéticas para ambos cultivos, a pesar de que el cultivo al que se suspendió la aireación tardó 5 horas más en consumir la glucosa, siendo la productividad volumétrica (figura 26) a las 25 horas muy similar para ambos cultivos, así como la μ y el rendimiento. De esta manera se confirmó que para fermentaciones con 80 g/L de glucosa inicial, no es necesario mantener el suministro de aire durante todo el cultivo, sino solamente durante el crecimiento exponencial. En conjunción con los datos de los cultivos en los cuales se eliminó el aire en la parte superior del fermentador, estos resultados claramente indican que la fase de crecimiento retardado y la reducción en μ se deben a la ausencia de aire, pero que para llevar a cabo la fermentación de glucosa a lactato, con el concomitante reciclamiento del NAD^+ , a una elevada productividad y rendimiento con JU15A, no se requiere de la presencia de aireación.

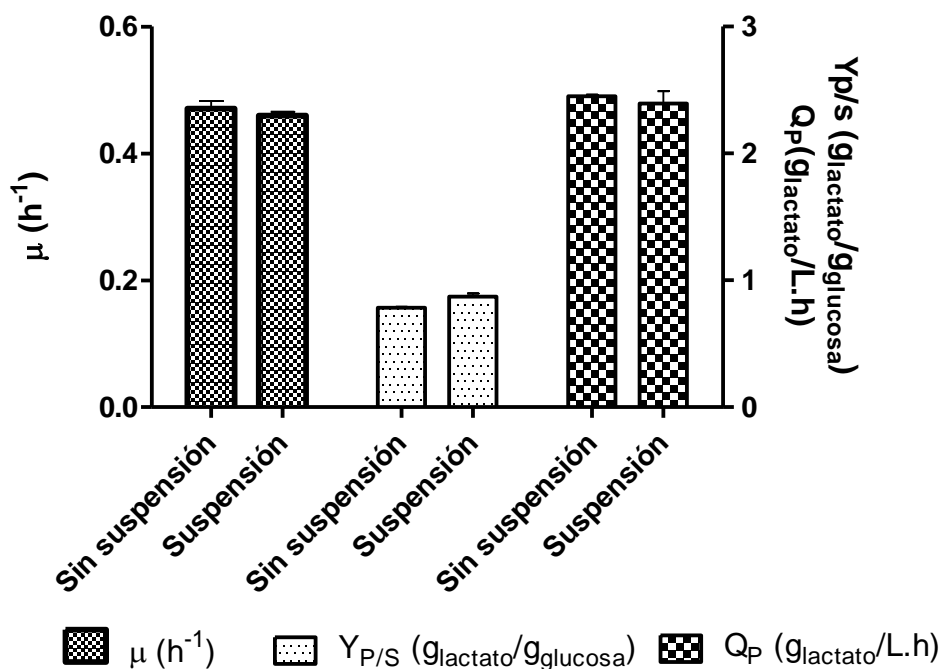


Figura 26. Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentaciones en 1 L suspendiendo y sin suspender aireación

8.11. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La})

Está reportado que los valores más comunes de k_{La} en la industria se encuentran en el rango de 60 a 240 h^{-1} (Quintero Ramírez, 1981; Ramírez Reivich, 2007), por tanto, el k_{La} de 10.9 h^{-1} utilizado como criterio de escalamiento en el presente trabajo corresponde a un valor de entre 1 y 2 órdenes de magnitud por debajo de este rango. Esto se debe principalmente a que los valores del rango mencionado corresponden a k_{La} de procesos completamente aerobios en donde las células no están limitadas por oxígeno; no es este el caso de la producción de lactatos donde se requiere una limitación de oxígeno por parte de las bacterias para que se sinteticen dichos metabolitos. En este sentido, el valor de k_{La} de 10.9 h^{-1} probablemente permite una transferencia de oxígeno similar a la que se obtendría por aireación superficial; método que ha sido exitosamente utilizado para la producción de etanol con *E. coli* (Nieves *et al.*, 2011), pero que sin embargo no permite un control adecuado de la cantidad de oxígeno transferida al medio, como si lo hace el uso del k_{La} , permitiendo obtener datos cuantitativos de las condiciones de cultivo y llevar así un proceso de escalamiento más robusto.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

- En el escalamiento de la producción de lactato con la cepa JU15A, es necesario el uso de un criterio que permita controlar la transferencia de oxígeno al medio de cultivo; emplear un k_{La} de 10.9 h^{-1} como criterio de escalamiento, constituye una buena opción para el escalamiento de la producción de D y L-lactato en fermentadores de 1 a 110 L operados en lote con 80 g/L de glucosa inicial.
- La anaerobiosis no constituye una buena opción para la producción de D-lactato con la cepa JU15A en fermentadores de 1 L, puesto que bajo esta condición la cepa presenta una larga fase de adaptación, disminuyendo el crecimiento y la productividad de lactato con respecto a lo reportado para dicha cepa.
- Transferir oxígeno al medio de cultivo en fermentadores de 1 L, manteniendo siempre condiciones de limitación, permite que la cepa JU15A aumente su velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa final, propiciando un rápido consumo de glucosa y producción de lactato, que se reflejan en un aumento en la productividad volumétrica de este metabolito.
- Al escalar de 11 a 85 L utilizando un k_{La} de 10.9 h^{-1} , variaciones de + o 3°C sobre la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* en el fermentador de 85 L, afectan considerablemente el crecimiento de JU15A y por ende su capacidad productora de lactato, en lo referente a parámetros como la μ y la productividad volumétrica con respecto a lo obtenido en 11 L.
- La fase de adaptación en el fermentador de 110 L, no disminuye parámetros como la μ y el rendimiento con respecto a lo obtenido para 11 L, puesto que se mantiene la tendencia de las diferentes cinéticas luego de superar dicha fase. Sin embargo, la productividad volumétrica de lactato si se ve afectada ya que depende del tiempo de cultivo.

PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

- Indagar más a fondo acerca de las causas y posibles soluciones a la fase de adaptación en el fermentador de 110 L.
- Realizar cultivos a escalas mayores con el fin de evaluar el criterio de escalamiento encontrado.
- Buscar diferentes estrategias de cultivo para obtener mayores concentraciones de lactato que permitan un proceso de purificación económicamente viable a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

Bearson, S.; Bearson, B.; Foster, J. W. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **1997**, 147, (2), 173-180.

Bicker M., Endres S., Ott L., Voge H. Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. *Journal of Molecular Catalysis* **2005**, 239, (1-2), 151-157.

CRU Forecasts, C. The Marketing Outlook for Ammonium Sulphate. 2005 <http://cruonline.crugroup.com/FertilizersChemicals/MarketForecasts/AmmoniumSulphateMarketOutlook/tabid/329/Default.aspx>

Dalian Boda Sciences & Technologies Co., L. Sulphate of Potash. <http://www.bodast.com/introduce.htm>

Datta, R.; Tsai, S.-P.; Bonsignore, P.; Moon, S.-H.; Frank, J. R., Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews* **1995**, 16, (2-3), 221-231.

Doran, P. Bioprocess Engineering Principles. *Academic Press*. 1995.

Fuchs, R.; Ryu, D. D. Y.; Humphrey, A. E. Effect of Surface Aeration on Scale-Up Procedures for Fermentation Processes. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **1971**, 10, (2), 190-196.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* **2009**, 27, (2), 153-176.

Garlotta, D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment* **2001**, 9, (2), 63-84.

Gätje, G.; Gottschalk, G., Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1991**, 34, (4), 446-449.

Gonçalves, L. M. D.; Ramos, A.; Almeida, J. S.; Xavier, A. M. R. B.; Carrondo, M. J. T. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1997**, 48, (3), 346-350.

Hasona A., Kim Y., Healy F.G., Ingram L. O., y Shanmugam K. T. Pyruvate Formate Lyase and Acetate Kinase Are Essential for Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Xylose. *Journal of Bacteriology* **2004**, 186, (22), 7593-7600.

Hengge-Aronis, R., The general stress response in *Escherichia coli*. In *Bacterial Stress Responses*. *American Society of Microbiology* **2000**. 161-179.

BIBLIOGRAFÍA

Ikada, Y., Jamshidi, K., Tsuji, H., Hyu S. H. Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides). *Macromolecules* **1987**, 20 (4), 904–906.

Inskeep G.C; Breitzke W.E. Lactic acid from corn sugar. *fud. Eng. Chem* **1952**, 44, (9), 1955-1966.

Joglekar, H. G.; Rahman, I.; Babu, S.; Kulkarni, B. D.; Joshi, A., Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. *Separation and Purification Technology* **2006**, 52, (1), 1-17.

Junker, B. H. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2004**, 97, (6), 347-364.

Karpel R., Alon T., Glaser G., Schuldiner S., y Padan E. Expression of a Sodium Proton Antiporter (NhaA) in *Escherichia coli* Is Induced by Na⁺ and Li⁺ Ions. *The Journal of biochemical Chemistry* **1991**, 266, (32), 21753-21759.

Kresta, E. L. *HANDBOOK OF INDUSTRIAL MIXING*. John Wiley & Sons, Inc: New York, **2004**.

Lara, A. R.; Leal, L.; Flores, N.; Gosset, G.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, 93, (2), 372-385.

Leal Reyes, L. Ingeniería Metabólica de *Escherichia coli* para la producción homofermentativa de L-lactato a partir de xilosa. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM. Cuernavaca, Mor. Marzo de **2010**.

Linek, V.; Vacek, V., Volumetric mass transfer coefficient in stirred reactors. *Chemical Engineering & Technology* **1988**, 11, (1), 249-251.

Lu, S.; Eiteman, M.; Altman, E. pH and base counterion affect succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2009**, 36, (8), 1101-1109.

Madzingaidzo, L.; Danner, H.; Braun, R., Process development and optimisation of lactic acid purification using electrodialysis. *Journal of Biotechnology* **2002**, 96, (3), 223-239.

Maeda, T.; Yoshimura, T.; Shimazu, T.; Shirai, Y.; Ogawa, H. I. Enhanced production of lactic acid with reducing excess sludge by lactate fermentation. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, 168, (2-3), 656-663.

Malveda M., Blagoev M. y Kumamoto T. Lactic Acid, Its Salts and Esters. SRI Consultig. Disponible en: <http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/670.5000/>

BIBLIOGRAFÍA

Martinez, A.; Grabar, T.; Shanmugam, K.; Yomano, L.; York, S.; Ingram, L. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters* **2007**, 29, (3), 397-404.

Miura, S.; Arimura, T.; Hoshino, M.; Kojima, M.; Dwiarti, L.; Okabe, M. Optimization and scale-up of -lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2003**, 96, (1), 65-69.

Nieves, I.U., Geddes, C.C., Mullinnix, M.T., Hoffman, R.W., Tong, Z., Castro, E., Shanmugama, K.T., Ingram, L.O. Injection of air into the headspace improves fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by *Escherichia coli* MM170. *Bioresource Technology* **2011**, 102, 6959–6965.

Okano, K.; Zhang, Q.; Shinkawa, S.; Yoshida, S.; Tanaka, T.; Fukuda, H.; Kondo, A. Efficient Production of Optically Pure D-Lactic Acid from Raw Corn Starch by Using a Genetically Modified L-Lactate Dehydrogenase Gene-Deficient and $\{\alpha\}$ -Amylase-Secreting *Lactobacillus plantarum* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, (2), 462-467

Padan, E.; Zilberstein, D.; Rottenberg, H. The Proton Electrochemical Gradient in *Escherichia coli* Cells. *European Journal of Biochemistry* **1976**, 63, (2), 533-541.

Partridge J.D., Sanguinetti G., Dibden D.P., Roberts R.E., Poole R.K. y Green J. Transition of *Escherichia coli* from Aerobic to Micro-aerobic Conditions Involves Fast and Slow Reacting Regulatory Components. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, (282), 11230-11237.

Quintero Ramírez. Ingeniería Bioquímica: teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana, **1981**.

Ramírez Reivich O. T. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Capítulo IX. 2ª Edición. Bolívar Zapata F. G. (Editor), México, **2007**. 281-285

Ratkowsky, D.A.; Olley, J.; McMeekin, T. A.; Ball, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* **1982**, 149, (1), 1-5.

Sanders, J. W.; Venema, G.; Kok, J., Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, 23, (4), 483-501.

Sandoval-Basurto, E. A.; Gosset, G.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 89, (4), 453-463.

Schmidt, F. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, 68, (4), 425-435.

Shuler. A. F., Kargi, M. L. *Bioprocess Engineering*. Prentice Hall: Houston, **2002**.

BIBLIOGRAFÍA

Shukla, V. B.; Zhou, S.; Yomano, L. P.; Shanmugam, K. T.; Preston, J. F.; Ingram, L. O. Production of D(-)lactate from sucrose and molasses. *Biotechnology Letters* **2004**, 26, (9), 689-693.

Spiro, S.; Guest, J. R., Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences* **1991**, (16), 310-314.

Tao, H., R. González, A. Martínez, M.E. Rodríguez, L.O. Ingram, J.F. Preston, K.T. Shanmugam. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *Journal of Bacteriology* **2001**. 183 (10), 2979-2988.

Tarmy, E. M. y . Kaplan N.O. Kinetics of *Escherichia coli* B D-Lactate Dehydrogenase and Evidence for Pyruvate-controlled Change in Conformation. *The Journal of Biological Chemistry* **1968**, (243), 2587-2596.

Tokushiro, K.; Ishida, N.; Nagamori, E.; Saitoh, S.; Onishi, T.; Kondo, A.; Takahashi, H. Double mutation of the *PDC1* and *ADH1* genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, 82, (5), 883-890.

Trujillo Martínez, B. Producción de D-lactato por *Escherichia coli* recombinante a partir de hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz. Diciembre de **2008**.

Utrilla, J.; Gosset, G.; Martinez, A. ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2009**, (36),1057-1062.

Utrilla Carreri, J. Ingeniería metabólica en *Escherichia coli* para la conversión eficiente de xilosa a D-lactato. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM. Cuernavaca, Mor. **2010**.

West, I.C., Mitchell, P. Proton/Sodium Ion Antiport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **1974**, (144), 87-90

Yamada, M.; Matsumoto, K. i.; Nakai, T.; Taguchi, S. Microbial Production of Lactate-Enriched Poly[(R)-lactate-co-(R)-3-hydroxybutyrate] with Novel Thermal Properties. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (4), 677-681.

Zhou, S.; Causey, T. B.; Hasona, A.; Shanmugam, K. T.; Ingram, L. O. Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, (1), 399-407.

Zhu, J.; Shimizu, K. Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. *Metabolic Engineering* **2005**, 7, (2), 104-115.

BIBLIOGRAFÍA

Zhu, Y.; Eiteman, M. A.; DeWitt, K.; Altman, E., Homolactate Fermentation by Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, (2), 456-464.

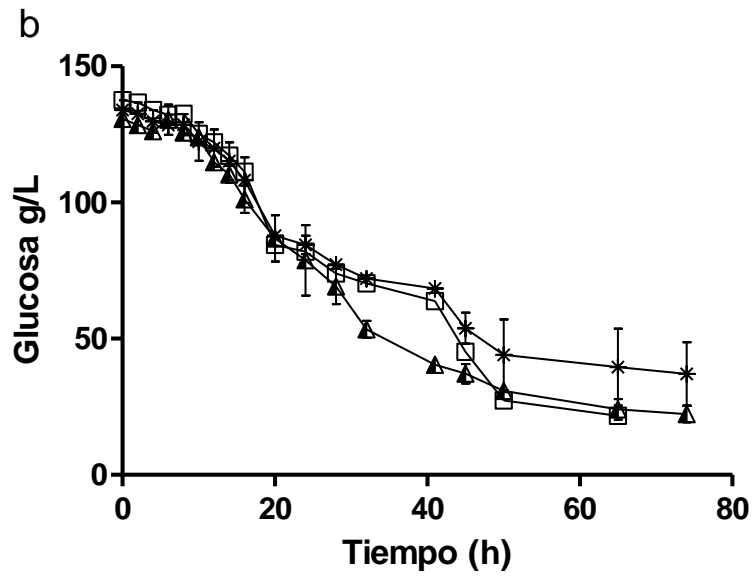
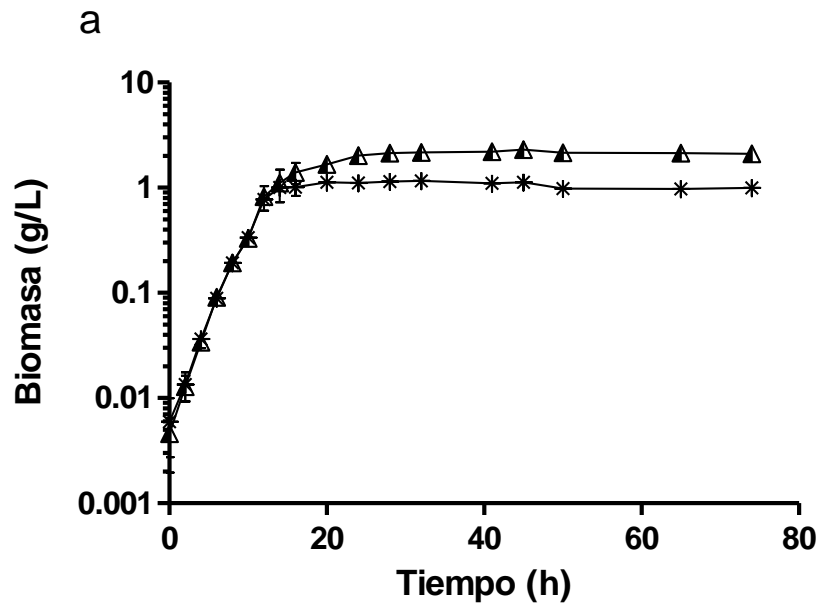
APÉNDICES

APÉNDICES

Apéndice A. Fermentación láctica en 11 L controlando pH con diferentes bases. Medio AM2-glucosa 120 g/L

Debido a los buenos resultados obtenidos en el escalamiento de 1 a 11 L, se realizaron ensayos en los fermentadores de 11 L, aumentando la concentración de glucosa inicial a 120 g/L y controlando el pH con diferentes bases. Por otra parte, se mantuvieron la demás condiciones de cultivo utilizadas en fermentadores de 1 L, esto es: temperatura 37°C, pH 6.6, velocidad de agitación a 180 rpm y velocidad de aireación 0.1 vvm. El aumento en la concentración inicial de glucosa se realizó con miras a la obtención de un título mayor de lactato, pues de esta manera se facilitarían la purificación debido a que con una concentración de glucosa inicial de 120 g/L, se podrían alcanzar concentraciones de lactato superiores a 100 g/L, si los rendimientos de producto calculados de 80 a 90% del máximo teórico para 1 y 11 L se conservan. Adicionalmente, se ensayaron NH_4OH , KOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para el control de pH, con el fin de determinar cuál se ajusta mejor a los resultados esperados para cultivos a gran escala, de acuerdo a su efecto en la producción de lactato y las características mencionadas en la sección 3.5.

En la figura 26 se ilustran las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato para los 3 cultivos por duplicado. En el caso del cultivo controlado con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, no se presenta la curva de crecimiento celular ya que éste no pudo ser medido debido a la turbidez del medio por la adición de cal. En la figura 27 se muestran los diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos para el control de pH con las 3 bases, y en la figura 28 se ilustra una comparación del rendimiento y la productividad a las 30 horas de cultivo, con respecto a lo obtenido con 80 g/L de glucosa inicial en el fermentador de 11 L.



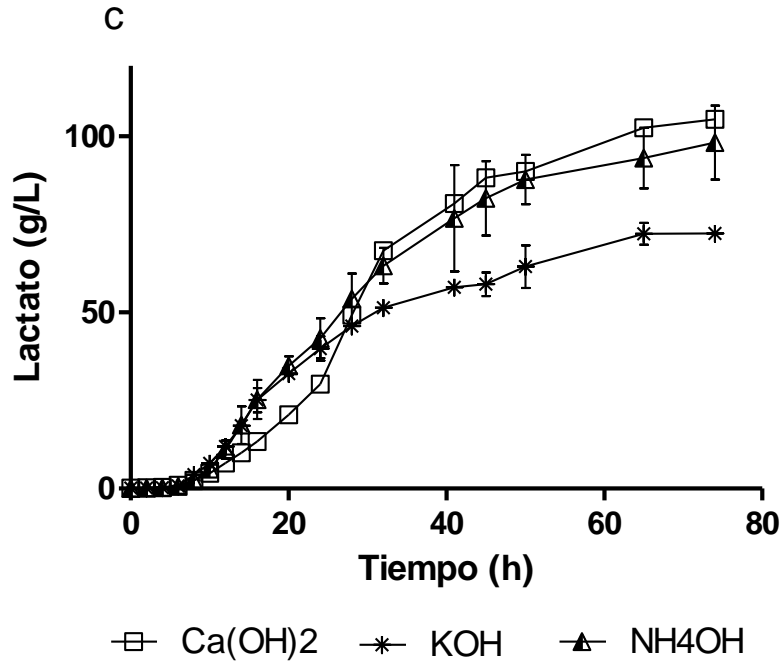


Figura 27. Cinéticas de crecimiento (a), consumo de glucosa (b) y producción de lactato (c) para fermentadores de 11 L con 120 g/L de glucosa inicial y control de pH con diferentes bases

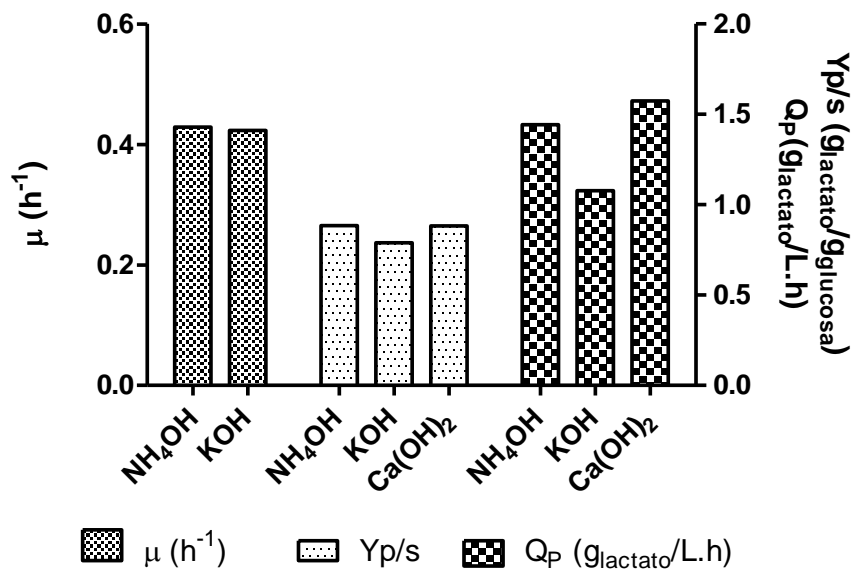


Figura 27. Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentadores de 11 L con 120 g/L de glucosa inicial y control de pH con diferentes bases

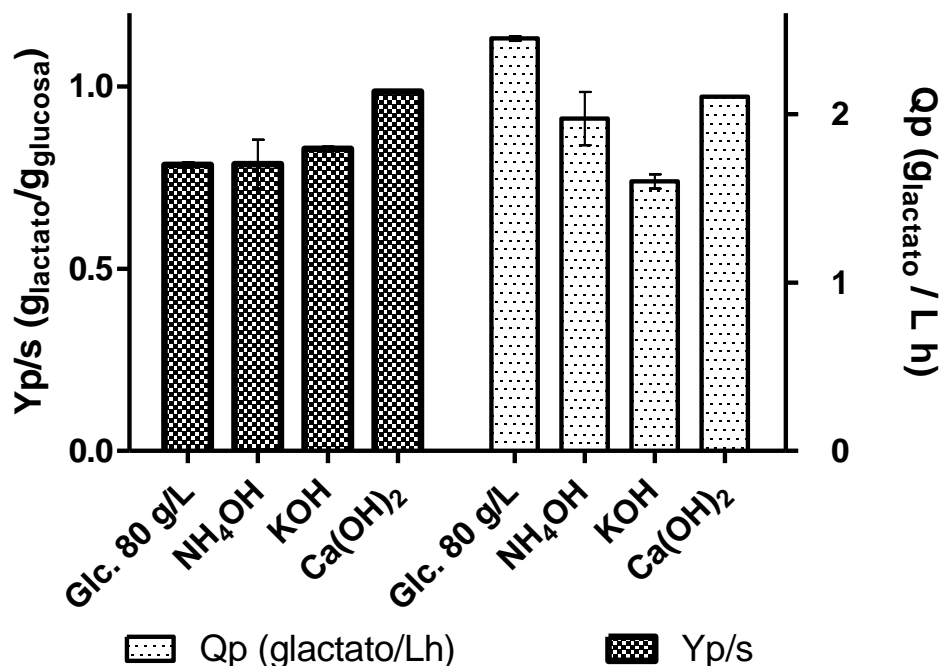


Figura 29. Parámetros cinéticos y estequiométricos para fermentadores de 11 L con 80 y 120 g/L de glucosa inicial y control de pH con diferentes bases t=30 h

Con respecto a lo obtenido en escala de 11 L con 80 g/L de glucosa, hubo una reducción entre 35 y 50% en la productividad para los fermentadores con 120 g/L de glucosa, presentando la mayor disminución el fermentador titulado con KOH (figura 27); por su parte, la μ y el rendimiento no se vieron afectados. La similitud en la μ para los cultivos comparados y la ausencia de una fase de crecimiento retardado, indican que el aumento en la concertación inicial de glucosa y la base empleada para el control de pH, no tienen un efecto adverso en las primeras etapas del crecimiento celular.

En cuanto al consumo de glucosa (figura 26b) y la producción de lactato (figura 26c), se puede observar que estos ocurren en dos etapas no necesariamente asociadas con la fase de crecimiento en la que se encuentra la bacteria: una primera fase, entre las 5 y 24 horas aproximadamente, en la que se consume glucosa y se produce lactato rápidamente; este rango de tiempo equivale al crecimiento exponencial y parte de la fase estacionaria; a

APÉNDICES

partir de las 24 horas se nota una segunda fase caracterizada por la creciente disminución en el consumo de glucosa y producción de lactato. Durante la primera fase de producción se alcanza una concentración de lactato alrededor de 60 g/L para los cultivos titulados con NH_4OH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$; cómo puede notarse en la figura 15, el cultivo en fermentador de 11 L con 80 g/L de glucosa llegó a una concentración similar de lactato a las 30 horas, tiempo en el cual se agotó la glucosa. Para el cultivo en el que se utilizó KOH la concentración alcanzada en esta etapa es aproximadamente de 50 g/L. En la figura 28 puede notarse que alrededor de las 30 horas de fermentación, no hay una diferencia tan marcada en la productividad volumétrica, es decir, que a este tiempo se alcanzó una concentración similar de lactato para los cultivos con 80 y 120 g/L de glucosa y que a partir de ésta, el consumo de glucosa y la producción comenzaron disminuir su velocidad.

Con base en estos resultados, puede sugerirse que el consumo de glucosa y la producción de lactato están siendo afectados por la concentración de lactato presente. En trabajos anteriores se ha estudiado la inhibición del crecimiento y la producción debida al lactato acumulado (Gonçalves et al., 1997; Gätje y Gottschalk, 1991); sin embargo, en estos estudios dicha inhibición es debida a la disminución del pH en el medio; no es éste el caso de los cultivos estudiados puesto que el pH se está controlando en un valor de 6.6 por adición de base. Teniendo en cuenta que el pK_a del ácido láctico es de 3.6 y haciendo uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, se tiene que la relación lactato/ácido láctico es de 1000 a este pH, por lo que puede descartarse un efecto significativo de la concentración de ácido no disociado en el medio. En este caso el efecto negativo de la presencia de altas concentraciones de lactato es debido al estrés osmótico causado por la glucosa aún presente y la acumulación de iones en el medio de cultivo, estos iones corresponden al anión lactato y al catión proveniente de la base con la que se está titulado. En este sentido cabe notar que el efecto del metal proveniente de la base varía respecto a la naturaleza de éste, por lo que aparte del estrés osmótico la presencia del catión está teniendo otros efectos en el funcionamiento celular. En el caso del potasio, se nota una mayor inhibición que para el amonio y el calcio, resultado que concuerda con lo

APÉNDICES

obtenido por otros autores en donde se compara la titulación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y KOH en cultivos para la producción de ácido láctico y succínico, obteniéndose mejores resultados para el calcio (Zu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009).

Aún no se han determinado los mecanismos por los cuales la acumulación de potasio en el medio influye el metabolismo celular, sin embargo esto podría deberse a que el pH intracelular se regula por medio de transportadores iónicos que pueden utilizar potasio, y que en presencia de altas concentraciones de este ion se inhiben. Estos transportadores regulan el pH intracelular manteniéndolo ligeramente básico, por lo que a un pH neutro en el medio de cultivo, se genera un gradiente que permite la estabilidad energética de la membrana (Pedan *et al.*, 1976). Siendo el calcio un ion divalente parece ser que no afecta la producción de la forma que lo hace el potasio, en lo relacionado con los transportadores y el potencial de membrana; el efecto de este ion parece deberse meramente al estrés osmótico que causa su acumulación. Adicionalmente, al controlar el pH con calcio parte del lactato de calcio formado se precipita, disminuyendo así la cantidad de iones presentes en el medio y por tanto la presión osmótica a la que se encuentra sometido el microorganismo (Zhu *et al.*, 2007). Para el caso del amonio, aunque este es un anión monovalente al igual que el potasio, puede ser consumido por el microorganismo como fuente de nitrógeno, además de que no es utilizado por transportadores iónicos, por tanto su efecto en la producción no es tan drástico como el del potasio.

Adicionalmente, se ha reportado que bajo condiciones de limitación de oxígeno, el potencial de membrana también puede verse afectado (Pedan *et al.*, 1976), al igual que la capacidad de las células para responder a condiciones de estrés osmótico, dado que el factor σ^S (*RpoS*), responsable de la respuesta celular a circunstancias de estrés requiere de condiciones energéticas favorables para su expresión (Hengge-Aronis, 200), las cuales son difíciles de tener en un ambiente limitado en oxígeno.

APÉNDICES

Los resultados anteriores sugieren que al trabajar con una concentración inicial de glucosa de 120 g/L, la estrategia de cultivo utilizada no es la más adecuada y habría que buscar otras estrategias con el fin de mejorar la productividad. Esto sin embargo, se sale de los objetivos de este trabajo y se deja a investigaciones posteriores.

Apéndice B. Curvas de oxígeno disuelto para las fermentaciones en 11, 85 y 110 L

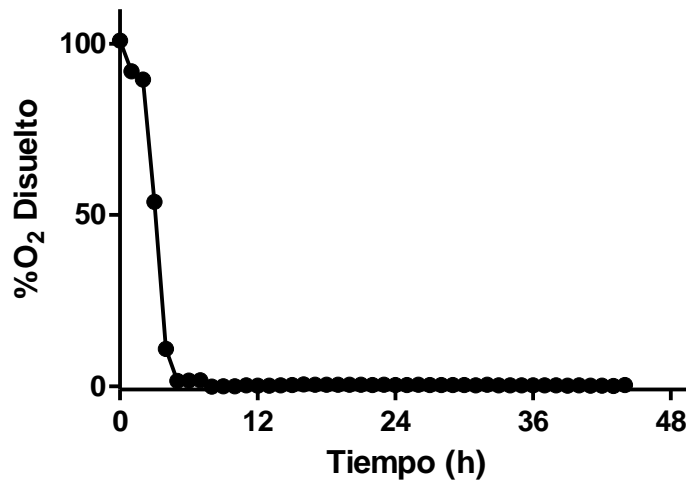


Figura 30. Curva de oxígeno disuelto en los fermentadores de 11 L

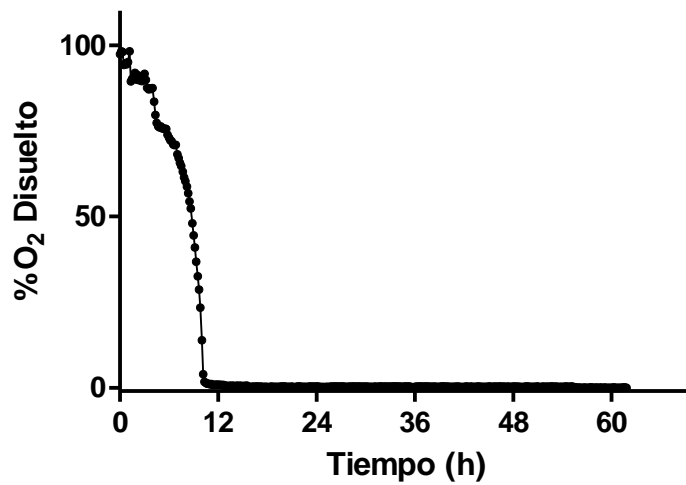


Figura 31. Curva de oxígeno disuelto en los fermentadores de 85 L

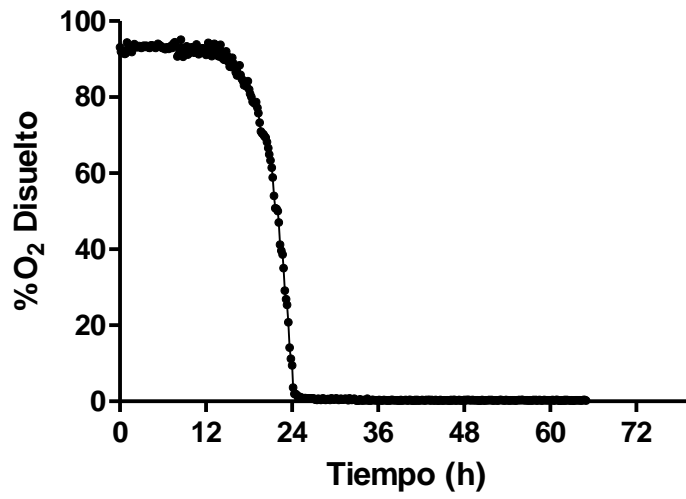


Figura 32. Curva de oxígeno disuelto en los fermentadores de 110 L

APÉNDICES

Apéndice C. Perfil de temperatura en el fermentador de 110 L

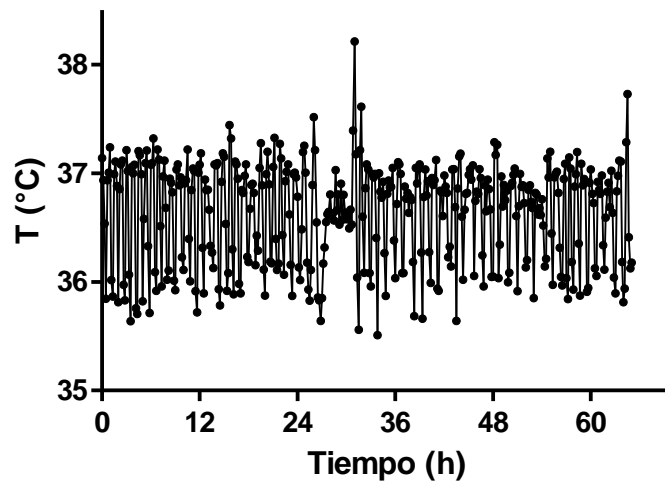


Figura 33. Perfil de temperatura en el fermentador de 110 L

APÉNDICES

Apéndice D. Interdependencia de los criterios de escalamiento más ampliamente utilizados

Parámetro	Escala piloto (80 L)		Escala industrial (10000 L)		
P/V	1	1	25	0.2	0.0016
P	1	125	3125	25	0.2
N	1	0.34	1	0.2	0.04
Q	1	45.2	125	25	5
Q/V	1	0.34	1	0.2	0.04
πND_i	1	1.7	5	1	0.2
Re	1	8.5	25	5	1
$k_L a$	1	1		0.45	0.04