



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE FLUJO METABOLICO Y DE LA RELACIÓN DE LOS
COFACTORES NADH/NAD⁺ Y NADPH/NADP⁺ EN CULTIVOS
QUIMIOSTATO DE *Azotobacter vinelandii* BAJO CONDICIONES DE
LIMITACIÓN Y NO LIMITACIÓN DE OXÍGENO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ANDRÉS GARCÍA ROMERO

TUTOR PRINCIPAL

**DR. CARLOS F. PEÑA MALACARA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. GUILLERMO GOSSET LAGARADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM
DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Cuernavaca, Mor., Mayo de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Peña Malacara. Durante la realización del mismo se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) **28535**. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través de los proyectos **PAPIIT-UNAM IT-200216**

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xi
1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	5
2.2 Biosíntesis de alginato y P3HB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
2.2 Metabolismo de <i>Azotobacter vinelandii</i> en condiciones microaerofílicas de cultivo.....	7
2.2.1 Influencia del oxígeno disuelto y de la velocidad de transferencia de oxígeno.....	7
2.3 Dependencia de la biosíntesis de alginato y P3HB al poder reductor.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
4.1 Hipótesis.....	16
4.2 Objetivos.....	16
4.2.1 Objetivo general.....	16
4.2.2 Objetivos específicos.....	16
5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Cepa.....	20
6.2 Medio de cultivo.....	20
6.3 Desarrollo de los cultivos.....	21
6.3.1 Cultivos en matraces agitados.....	21
6.3.2 Cultivos en biorreactor.....	21
6.4 Métodos analíticos.....	22
6.4.1 Determinación de biomasa por peso seco.....	22
6.4.2 Determinación de proteína.....	23
6.4.3 Extracción y cuantificación de alginato.....	24
6.4.4 Cuantificación de glucosa.....	24
6.4.5 Cuantificación de P3HB.....	25

6.4.6	Cuantificación de amonio.....	25
6.4.7	Determinación de cofactores.....	26
6.4.8	Preparación de la muestra para análisis por GC-MS.....	27
6.5	Sistema de análisis de gases de O ₂ en la fase gaseosa.....	28
6.5.1	Estimación de la velocidad de transferencia de O ₂	28
6.5.2	Calculo de la velocidad de consumo de oxígeno.....	28
6.6	Índices estequiométricos en la ecuación de biomasa.....	29
6.6.1	Modelización matemática de sistema determinados.....	29
6.7	Análisis de flujo Metabólico.....	30
6.8	Análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real (RT-PCR).....	30
6.8.1	Extracción y purificación de RNA.....	30
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	
7.1	Cultivos desarrollados en quimiostato a diferentes VTO.....	33
7.2	Determinación de la relación de los cofactores NADH/NAD ⁺ y NADPH/NADP ⁺ a diferentes VTO.....	40
7.3	Análisis del Flujo Metabólico a diferentes VTO.....	42
7.4	Expresión relativa de genes que codifican para enzimas involucradas en reacciones de óxido-reducción en función de la VTO.....	44
8.	CONCLUSIÓN.....	50
9.	APORTACIONES Y PERSPECTIVAS.....	51
10.	REFERENCIAS.....	52
11.	ANEXOS.....	55
	ANEXO A. Productos generados.....	x

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 2.1	Micrografía de <i>Azotobacter vinelandii</i>	5
Figura 2.2	Rutas metabólicas de biosíntesis de alginato y P3HB en <i>A. vinelandii</i>	7
Figura 2.3	Influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno sobre el rendimiento de alginato y P3HB	9
Figura 2.4	Mapa del flujo metabólico en <i>A. vinelandii</i> ATCC9046. Con recuadros se marcan las vías de síntesis de alginato, P3HB y el ciclo de los ácido tricarbóxicos	11
Figura 5.1	Estrategia experimental general	18
Figura 5.2	Cultivos lote y quimiostato empleados en el presente trabajo	18
Figura 5.3	Estrategia experimental para el análisis de flujo metabólico (AFM)	19
Figura 6.1	Descripción del biorreactor <i>Applikon</i> utilizado en el presente trabajo.	22
Figura 6.2	Curva patrón para la cuantificación de proteína.	24
Figura 6.3	Curva patrón para la cuantificación de amonio	26
Figura 7.1	Perfiles de TOD (a) y VTO (b) en cultivos de <i>A. vinelandii</i> desarrollados en biorreactor bajo diferentes condiciones de agitación de 300, 500 y 700 rpm.	33
Figura 7.2	Perfiles de proteína celular (a), consumo de glucosa (b) y consumo de amonio (c) en cultivos quimiostato desarrollados a diferentes VTO. Etapa lote (L), Etapa continuo (Q).	35
Figura 7.3	Perfiles de producción de alginato (a) y P3HB (b) en cultivos quimiostato desarrollados a diferentes VTO. Etapa lote (L), Etapa continuo (Q).	36

Figura 7.4	Relación del crecimiento celular con base a proteína (a), consumo específico de glucosa (qG) (b), velocidad de producción de alginato ($qAlg$) (c) y P3HB ($qP3HB$) (d) y consumo de amonio (e) de los cultivos en estado estacionario bajo condiciones de limitación y no limitación de oxígeno.	38
Figura 7.5	Relación molar de los niveles intracelulares de NADH/NAD ⁺ y NADPH/NADP ⁺ en cultivos quimiostato desarrollados a una VTO de 2.4, 6.2 y 14.3 mmol L ⁻¹ h ⁻¹ .	41
Figura 7.6	Diagrama del análisis de flujo metabólico en el estado estable en cultivos de <i>A. vinelandii</i> a diferentes VTO.	43
Figura 7.7	Expresión relativa de los genes <i>algD</i> , <i>phbB</i> , <i>gapA</i> , <i>idh</i> , <i>akdh</i> , <i>zwf</i> , <i>cydA</i> , <i>ndh</i> y <i>nifH</i> en el estado estable en cultivos quimiostato de <i>A. vinelandii</i> a diferentes VTO.	46
Figura 7.8	Representación esquemática de diferentes respuestas moduladas por la VTO y su relación con el metabolismo de <i>A. vinelandii</i> . Los hexágonos representan los tres valores de VTO evaluados. Los datos se normalizaron con respecto a la condición de referencia (6.2 mmol L ⁻¹ h ⁻¹).	49

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
Tabla 2.1	Parámetros cinéticos de los cultivos en matraces agitados bajo diferentes condiciones de aireación	14
Tabla 6.1	Composición del MBM	20
Tabla 6.2	Primers utilizados para los análisis de PCR en tiempo real.	32
Tabla 8.1	Parámetros cinéticos en el estado estable en cultivos de <i>A. vinelandii</i> ATCC9046 en condiciones de limitación de oxígeno (300 y 500 rpm) y no limitación de oxígeno (700 rpm).	39

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado	Unidades
°C	Grado Celsius	---
ATCC	American Type Culture Collection	---
BS	Medio Burk-glucosa	---
g	Gramo	---
h	Hora	---
L	Litro	---
ml	Mililitro	---
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico	---
O ₂	Oxígeno gaseoso a la entrada del biorreactor	---
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno	(mmol O ₂ /L h)
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	(mmol O ₂ /L h)
PHA	Polihidroxialcanoatos	---
DEPC	Pirocarbonato de dietilo	---
q _{Glu}	Velocidad específica de consumo de glucosa	(gsac/gproteína h)
q _{O₂}	Velocidad específica de consumo de oxígeno	(mmol O ₂ /gproteína h)
Rpm	Revoluciones por minuto	(min ⁻¹)
D	Velocidad de dilución	(h ⁻¹)

F	Flujo	(L/min)
μ	Velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	(%)
V _L	Volumen de trabajo	(L)
Y x/s	Rendimiento de biomasa en base a sacarosa	(g _{biom} /g _{sac})
Y p/x	Rendimiento de producto en base a sacarosa	(g _{PHB} /g _{sac})
Y p/x	Rendimiento de producto en base a biomasa	(g _{PHB} /g _{biom})

Metabolismo

ACA	Acetil-CoA
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CoA	CoenzimaA
DHA	Dihidroxiacetona
E4P	Eritrosa 4-fosfato
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido
FUM	Fumarato
F-1,6-BP	Fructosa 1,6 bifosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
GOX	Glioxilato
GTP	Guanosín trifosfato
IC	Isocitrato
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
KDPG	Ceto-deoxi-fosfogluconato
α -KG	α -cetogluturato
α -KGDH	α -cetogluturato deshidrogenasa
M1P	Manosa 1-fosfato
M6P	Manosa 6-fosfato

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido reducido
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotido reducido
OAA	Oxalocetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PYR	Piruvato
3PG	3-Fosfoglicerato
P3HB	Poli-(3-hidroxi-butirato)
R5P	Ribosa 5-fosfato
S7P	Sedoheptulosa 7-fosfato
SUC	Succinato
VPP	Vía de las pentosas fosfato

1. RESUMEN

En *A. vinelandii* se ha observado que el control de oxígeno disuelto adquiere gran relevancia ya que determina el crecimiento celular así como la biosíntesis de alginato y P3HB. En condiciones microaerofílicas (< 1 % de TOD), la VTO y la VCO tienen un efecto sobre el rendimiento de alginato y P3HB, así como en las características fisicoquímicas del alginato. Sin embargo, en el metabolismo central, el oxígeno no está involucrado directamente en las actividades enzimáticas. La mayoría de las reacciones del metabolismo celular son de óxido-reducción, donde los cofactores NADH y NADPH juegan un papel importante en la transferencia de electrones. Cabe señalar que actualmente se desconoce el papel de las relaciones de estos cofactores en los flujos metabólicos de las vías de biosíntesis de alginato y P3HB. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar las relaciones de los cofactores NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ así como los flujos metabólicos involucrados en la biosíntesis de ambos polímeros bajo condiciones de limitación y no limitación de oxígeno.

Mediante cambios en la velocidad de agitación (300, 500 y 700 rpm) se realizaron cultivos quimiostato en los cuales se obtuvieron diferentes VCO (2.4 ± 0.03 , 6.2 ± 0.05 y 14.3 ± 0.3 mmol L⁻¹ h⁻¹). Los resultados revelaron que los cambios en la disponibilidad de oxígeno tuvieron un efecto importante sobre los flujos metabólicos y la relación intracelular de los cofactores NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺. Cuando la bacteria se creció bajo condiciones de limitación de oxígeno a una VCO de 2.4 ± 0.03 mmol L⁻¹ h⁻¹, el flujo de carbono hacia el CAT disminuyó 27.6 veces; sin embargo, el flujo de carbono hacia la biosíntesis de P3HB aumentó 6.6 veces, en comparación con los cultivos desarrollados bajo condiciones de no limitación de oxígeno (VTO = 14.6 ± 0.3 mmol L⁻¹ h⁻¹). Cabe señalar que esta respuesta fue consistente con el aumento en el nivel de transcripción del gen *phbB* y la biosíntesis de P3HB. Asimismo, bajo condiciones de no limitación de oxígeno, hubo un aumento en la tasa de consumo de carbono (2 veces), así como un aumento en el flujo de carbono hacia la VPP (4.8 veces), en comparación con el cultivo a 2.4 ± 0.03 mmol L⁻¹ h⁻¹.

Por otro lado, bajo la condición de 6.2 ± 0.5 mmol L⁻¹ h⁻¹, la relación intracelular NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ se incrementó 2.8 y 2.6 veces respectivamente, en

comparación con la condición de $2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A pesar de que se observó un mayor flujo de carbono hacia las vías de generación de NADH y NADPH cuando se incrementa el consumo de oxígeno a $14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, la relación molar de los cofactores disminuyó, dicho comportamiento podría estar relacionado con la capacidad del *A. vinelandii* para fijar nitrógeno en presencia de una mayor concentración de oxígeno, lo cual sugiere que los electrones de estos cofactores son consumidos por el mecanismo de protección respiratoria bajo condiciones diazotróficas. Este comportamiento se correlacionó con una alta expresión de los genes de la cadena respiratoria desacoplada (*ndhII* y *cydA*), así como la inducción de la expresión de los genes que codifican el complejo nitrogenasa (*nifH*). En este trabajo se demostró que los cambios en la disponibilidad de oxígeno afectaron tanto el estado redox interno de las células así como los flujos metabólicos de carbono, lo cual tuvo un impacto importante en el CAT y en la VPP, y en los flujos para la biosíntesis de alginato y P3HB.

ABSTRACT

In *A. vinelandii*, the control of dissolved oxygen tension (DOT) is an important parameter that have an effect on the cell growth and alginate and P3HB production. Under microaerophilic conditions (< 1 % de DOT), the oxygen transfer rate (OTR) or oxygen uptake rate (OUR) has a considerable effect on the alginate and P3HB yields, as well as physicochemical properties of the alginate. However, the oxygen is not directly involved in enzymatic activities in the central carbon metabolism. The NADH and NADPH are two of the important cofactors that play a very critical role in a wide range of cellular reactions; however, the role of NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios on the metabolic fluxes through biosynthesis pathways of these biopolymers, remains unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the relationship of the intracellular NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios and the metabolic fluxes involved in alginate and P3HB biosynthesis, under oxygen-limiting and non-limiting oxygen conditions.

Chemostat cultures were performed at different OTR through changes in the agitation speed (300, 500 and 700 rpm). The results of the present study reveal, that the oxygen availability has an important effect on the metabolic fluxes and intracellular NADPH/NADP⁺ ratio. When the bacterium was grown at the lowest OTR ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the flux through the tricarboxylic acid (TCA) cycle decreased 27.6-fold, but the flux through the P3HB biosynthesis increased 6.6-fold, in contrast to the cultures without oxygen limitation (OTR = $14.6 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). This response was consistent with the increase in the level of transcription of *phbB* and the P3HB biosynthesis. In addition, under conditions without oxygen limitation, there was an increase in the carbon uptake rate (2-fold), as well as in the flux through the pentose phosphate pathway (PPP) (4.8-fold), compared to the condition of $2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

On the other hand, under oxygen-limiting conditions ($6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) the NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ increased up to 2.8 and 2.6-fold, respectively compared to the cultivations developed at low OTR ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Although the carbon

fluxes through the TCA cycle, and therefore for NADH production, were higher in cultures at higher oxygen consumption ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) the cofactors ratios decreased. This behavior could be probably as a response to the high respiration rate induced by the respiratory protection of the nitrogenase under diazotrophic conditions, correlating with a high expression of the uncoupled respiratory chain genes (*ndhII* and *cydA*) and the expression of genes encoding the nitrogenase complex (*nifH*). In this study, we demonstrated that changes in oxygen availability affect the internal redox state of the cell and carbon metabolic fluxes. This also has a strong impact on the TCA cycle and PPP as well as on alginate and P3HB biosynthetic fluxes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* (Segura *et al.*, 2003). Esta bacteria posee una gran versatilidad metabólica que le permite sobrevivir y colonizar nichos ecológicos en condiciones poco favorables. Son microorganismos mucoides naturales del suelo, aerobios estrictos, pero pueden crecer a bajas concentraciones de oxígeno. Son móviles a través de flagelos peritricos y tienen la capacidad de fijar nitrógeno a través de tres sistemas nitrogenasas (Kenndy y Toukdarian, 1987). Son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro (figura 2.1). Además, presentan una morfología variada que va desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y comúnmente se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable (Espín, 2002).

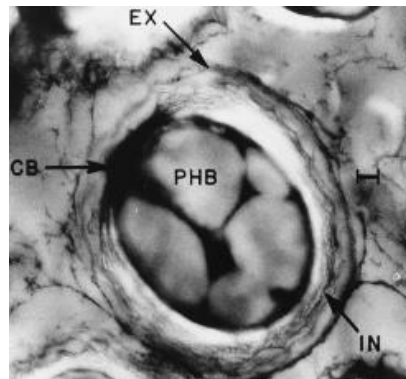


Figura 2.1. Micrografía de la morfología *A. vinelandii*. EX: exina; IN: intina; CB: cuerpo central (Tomada de Núñez *et al.*, 1999).

Por otro lado, la fijación biológica de nitrógeno por *A. vinelandii* depende de la actividad del complejo enzimático nitrogenasa, proceso que requiere una elevada cantidad de energía (se requieren 16 moléculas de ATP y 8 moléculas de NADH por cada molécula de N_2 fijada) (Igarashi *et al.*, 2004). Cabe señalar que, para la fijación de nitrógeno la bacteria posee mecanismos de protección para su sistema nitrogenasa, entre las cuales destacan la protección conformacional o inactivación reversible y la protección respiratoria.

Biosíntesis de alginato y P3HB en *Azotobacter vinelandii*

A. vinelandii tiene la capacidad de producir dos polímeros de interés comercial, el alginato y el P3HB. El primero es un polisacárido extracelular que es utilizado como agente gelificante y viscosificante en industrias como la farmacéutica y la alimenticia (Galindo *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011a). Por otra parte, el P3HB es un poliéster formado por unidades de 3-hidroxiácidos, el cual tiene un gran potencial industrial, pues presenta propiedades termoplásticas similares a los plásticos y elastómeros sintéticos derivados del petróleo, con la ventaja de ser completamente biodegradable y biocompatible (Steinbüchel y Lutke-Eversloh, 2003; Peña *et al.*, 2011a, García *et al.*, 2014). En el metabolismo de *A. vinelandii*, se ha establecido que el catabolismo de la glucosa (fuente de carbono) ocurre principalmente por la vía Entner-Doudoroff (Conway, 1992), en donde el sustrato puede ser utilizado para la generación de precursores biosintéticos (biomasa), para la generación de energía (oxidación junto con el CAT hasta CO₂), para la biosíntesis de alginato y para la biosíntesis de P3HB (Anderson y Dawes, 1990) (figura 2.2).

La ruta biosintética del alginato en *A. vinelandii* fue propuesta inicialmente por Pindar y Bucke (1975), esta se divide en cuatro etapas: la síntesis del sustrato precursor; el ácido GDP-manurónico, la polimerización, la acetilación y finalmente la exportación del alginato al exterior de la célula (Galindo *et al.*, 2007). En cuanto a la síntesis de P3HB, esta ocurre en tres pasos enzimáticos a partir del acetyl-CoA. El primer paso de la vía consiste en la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA por la β -cetotiolasa para generar acetoacetyl-CoA, el cual es reducido por una acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH para producir β -hidroxibutiril-CoA. Finalmente, las unidades de β -hidroxibutirato son polimerizadas por la P3HB sintasa, liberando CoA y obteniéndose P3HB (Anderson y Dawes, 1990).

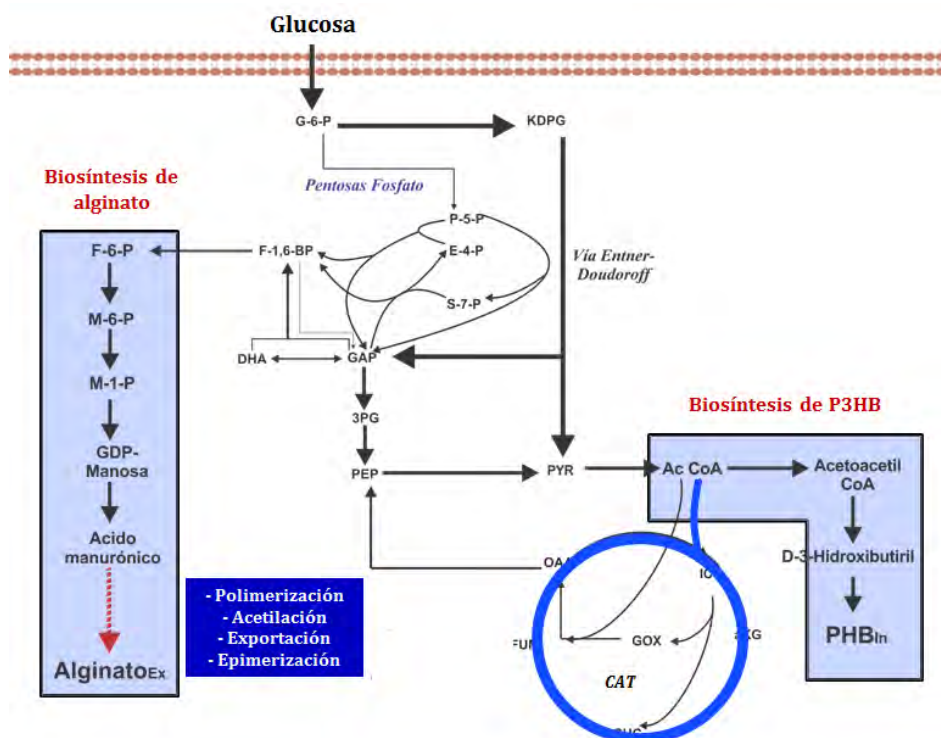


Figura 2.2. Rutas metabólicas de biosíntesis de alginato y P3HB en *A. vinelandii*. Adaptada de Castillo *et al.* (2013a).

2.2 Metabolismo de *A. vinelandii* en condiciones microaerófilas de cultivo

2.2.1 Influencia del oxígeno disuelto y la velocidad de transferencia de oxígeno

Una forma de controlar la biosíntesis de alginato y P3HB en *A. vinelandii* es a través de la manipulación de las condiciones de cultivo (Peña *et al.*, 2000). Se sabe que en condiciones de limitación de oxígeno (abajo del 5 % de TOD) la bacteria, además de producir eficientemente alginato, sintetiza P3HB. Mientras que, en condiciones de no limitación de oxígeno (> 5 % de TOD), *A. vinelandii* utiliza la fuente de carbono principalmente para la producción de biomasa (Sabra *et al.*, 1999).

Existen reportes en la literatura donde se ha estudiado la influencia de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) sobre la producción de alginato y P3HB. Una revisión completa sobre este tema puede encontrarse en Sabra *et al.*, (2001), Galindo *et al.*, (2007) y Peña *et al.*, (2011a).

En estudios recientes en nuestro grupo de investigación Flores *et al.*, (2013) reportaron que en cultivos en biorreactor con la cepa *A. vinelandii* ATCC9046 a 1 % de TOD, el flujo de carbono se dirige hacia la biosíntesis de P3HB. En cambio, cuando la TOD se aumenta a 5 %, la biosíntesis de P3HB resulta afectada negativamente. Por otra parte, Lozano *et al.*, (2011) en cultivos a 5 % de TOD empleando la misma cepa, reportaron un incremento significativo en la síntesis de alginato al aumentar la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) de 17 a 100 mmol L⁻¹ h⁻¹.

Como se puede apreciar en lo mencionado anteriormente, la mayoría de los trabajos se han enfocado a estudiar el efecto del oxígeno disuelto sobre la síntesis de alginato y P3HB, en regiones de TOD > 1%. Sin embargo, un problema operacional que sucede en condiciones microaerofílicas, es que el oxígeno disuelto resulta difícil de medir, debido a que el monitoreo de la tensión de oxígeno en fermentadores es una tarea complicada cuando el oxígeno se encuentra en valores cercanos a cero. Un parámetro que ha permitido estudiar la región microaerofílica y por lo tanto de limitación de oxígeno, es la VTO o la VCO. A través de la determinación de la VTO o la VCO es posible inferir la condición de oxigenación que prevalece en condiciones microaerofílicas (< 1% de TOD). Actualmente existen varios reportes en la literatura relacionados con la determinación de la VTO y VCO durante la producción de polisacáridos y otros metabolitos (Richard y Margaritis, 2003; Anderlei *et al.*, 2004). Asimismo, en nuestro grupo de investigación se ha estudiado la influencia de la VTO sobre la síntesis de alginato y P3HB (Díaz-Barrera *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011b; Gómez-Pazarín, 2013).

En este contexto, Díaz-Barrera *et al.*, (2007) reportaron que, en cultivos limitados por oxígeno, la síntesis de alginato y P3HB son dependientes de la VTO del cultivo. En cultivos desarrollados a una VTO_{max} de 3 mmol L⁻¹ h⁻¹ (a 260 rpm) se obtuvieron 0.5 g/L de alginato después de las 23 h de cultivo. Al incrementar tres veces la VTO_{max} (9 mmol L⁻¹ h⁻¹, a 560 rpm), la producción de alginato se triplicó, llegando a 1.5 g/L a las 16 h de cultivo. La menor producción de alginato en los cultivos a una baja VTO podría estar relacionada con la disponibilidad energética de las células, considerando que la síntesis de polímeros

microbianos es altamente demandante de energía. De igual manera, se evaluó la influencia de la VTO sobre el rendimiento de alginato ($Y_{alg/s}$) y P3HB ($Y_{P3HB/s}$).

Al aumentar la VTO de 3 a 9 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ disminuyó once veces el $Y_{P3HB/s}$ y se incrementó al doble el $Y_{alg/s}$, demostrando que la distribución de carbono entre los polímeros alginato y P3HB fue afectada por la $VTO_{\text{máx}}$ (figura 2.3).

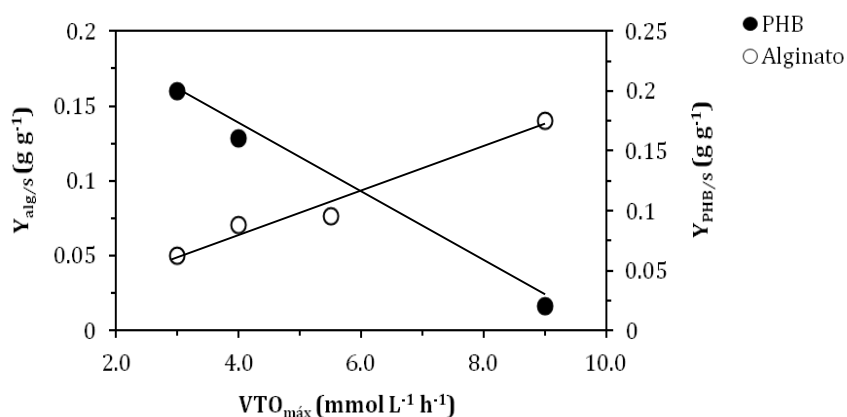


Figura 2.3. Influencia de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno sobre el rendimiento de alginato y P3HB (Tomada de Díaz-Barrera *et al.*, 2007).

Por otro lado, el incremento en la biosíntesis de alginato cuando la VTO es elevada ya ha sido observado en otros trabajos. En cultivos en matraces agitados Peña *et al.*, (2011b), observaron que el rendimiento de alginato con base a biomasa en peso seco ($Y_{alg/biom}$) fue de 1.16 g/gBPS a una $VTO_{\text{máx}}$ de 6 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. En cambio, al disminuir la $VTO_{\text{máx}}$ a 2.6 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, el rendimiento disminuyó a 0.83 g/gBPS . Recientemente, Gómez-Pazarín (2013), observó una tendencia similar al modificar la $VTO_{\text{máx}}$ por cambios en el volumen de llenado. En cultivos realizados a una VTO de 2.1 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (a 300 mL de volumen de llenado) el rendimiento de alginato fue de 0.83 g/gBPS . En cambio, al aumentar la VTO a 5.6 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (a 100 mL de volumen de llenado) el rendimiento de alginato se incrementó a 1.12 g/gBPS .

Cabe señalar que, en los cultivos aerobios, la actividad fisiológica está estrechamente ligada a la actividad respiratoria del microorganismo, por lo que la VCO es un parámetro que puede

indicar indirectamente la actividad metabólica de la bacteria. No obstante, en el metabolismo central, el oxígeno no está involucrado directamente en las actividades enzimáticas. Cabe señalar que en el metabolismo celular existen reacciones de óxido-reducción, donde los cofactores NADH y NADPH juegan un papel importante en la transferencia de electrones.

2.3 Dependencia de la biosíntesis de alginato y P3HB al poder reductor

En el metabolismo celular existen reacciones intracelulares que son del tipo óxido-reducción, donde la utilización de la fuente de carbono para el crecimiento celular, la biosíntesis de alginato y P3HB puede depender de la facilidad de ciertos compuestos para ganar o perder electrones. Estos procesos comprenden principalmente reacciones del metabolismo primario, como lo son las reacciones que generan precursores para el crecimiento celular y las reacciones de generación de energía (Mailloux *et al.*, 2010). En el metabolismo celular, el poder reductor es necesario para poder reducir moléculas oxidadas. Los compuestos que realizan esta función son los cofactores NADH y NADPH que ceden con facilidad H^+ y e^- . El cofactor NADH tiene un papel importante en el catabolismo microbiano, ya que funciona como cofactor en más de 300 reacciones de óxido-reducción (Foster *et al.*, 1990); asimismo, acarrea electrones para la generación de ATP durante la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Por otro lado, el cofactor NADPH está involucrado en reacciones de tipo anabólico. En el metabolismo microbiano, los dos cofactores no están normalmente en equilibrio y el cociente entre las formas reducidas y oxidadas es un indicador del estado redox celular (Fuhrer y Sauer, 2009).

En *Pseudomonas aeruginosa* una especie relacionada con *A. vinelandii*, se ha establecido que la etapa limitante y el punto de control en la biosíntesis de alginato es la actividad de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, la cual está involucrada en la oxidación irreversible del ácido GDP-manurónico (Tatnell *et al.*, 1994). Se sabe que la oxidación del monosacárido GDP-manosa para la síntesis del ácido GDP-manurónico, es dependiente de NAD^+ (Snook *et al.*, 2003). Esta enzima realiza una doble oxidación en la que se liberan dos moléculas de NADH. De tal manera que la síntesis del polímero podría ser afectada por cambios en el

poder reductor. Sin embargo, actualmente no existen reportes donde se describa un posible efecto del poder reductor en la biosíntesis del alginato.

En lo que se refiere al metabolismo de P3HB, existen diversos reportes donde se describe la función que ejercen los cofactores NADH y NADPH (Segura, *et al.*, 2003; Galindo *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011a). Cuando en la célula se presenta una baja concentración de oxígeno y existe una concentración alta de carbono, se favorece la acumulación de NADH y NADPH por una disminución del flujo en la cadena respiratoria. Estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del CAT, como la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa, lo que favorece la síntesis de P3HB (Segura *et al.*, 2003). Incluso, se ha propuesto que la síntesis de P3HB permite regular la concentración de la forma reducida NADPH, ya que almacena electrones durante su síntesis, previniendo la generación de una concentración alta de NADPH y permitiendo el funcionamiento de las vías oxidativas al regenerar NAD^+ (Senior *et al.*, 1972). Se sabe que la enzima acetoacetyl-CoA reductasa, clave en la síntesis del precursor del P3HB, es dependiente de NADPH. En la figura 2.4 se muestran los flujos metabólicos en *A. vinelandii* y la dependencia de éstos al poder reductor, se enumeran 2 rutas del metabolismo central (VPP y el CAT), así como las vías de síntesis de alginato y P3HB.

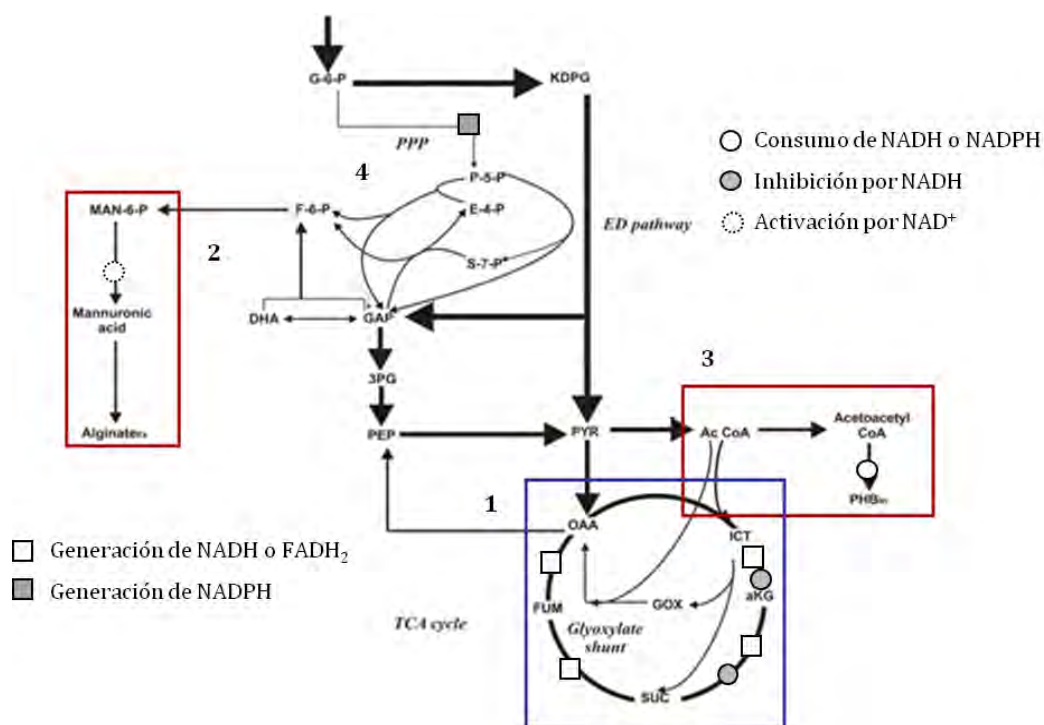


Figura 2.4 Mapa del flujo metabólico en *A. vinelandii* ATCC9046. Con recuadros se marcan las vías de biosíntesis de alginato, P3HB y el CAT (Tomada de Castillo *et al.*, 2013a).

1. CAT, vía donde se genera poder reductor (NADPH, NADH y FADH₂).
2. Síntesis del precursor del alginato por la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, la cual es dependiente de NAD⁺, por lo que esta vía podría contribuir a la generación de NADH.
3. Síntesis de P3HB, vía donde se consume NADPH por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa.
4. VPP, vía donde se produce NADPH por las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Como se comentó anteriormente, los cofactores NADH y NADPH podrían estar implicados en las actividades de las enzimas clave para la biosíntesis de alginato y P3HB. Recientemente, Castillo *et al.*, (2013a) realizaron un análisis de flujo de carbono en *A. vinelandii* bajo dos condiciones extremas de aireación, las cuales se establecieron modificando el tipo de matraz y el volumen de llenado. La primera condición denominada “alta aireación” se estableció mediante el uso de matraces bafleados (con mamparas) de 500

mL con 50 mL de volumen de llenado; la segunda condición denominada de “baja aireación” se logró empleando matraces convencionales con 100 mL de volumen de llenado. En dichas condiciones se puede establecer que la VTO_{max} fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (baja aireación) a $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (alta aireación).

En el estudio de Castillo *et al.*, (2013a) se observó que cambios en la aireación tuvieron un efecto en el crecimiento celular y el consumo de glucosa de la bacteria (Tabla 2.1). En la condición de baja aireación se presentó una disminución del 68 % en el flujo relativo de carbono hacia el CAT con respecto a los cultivos en alta aireación, lo cual resultó en la disminución de la velocidad específica de crecimiento (μ), esta fue de 0.08 h^{-1} para los cultivos en baja aireación y 0.17 h^{-1} para cultivos en alta aireación.

Por otro lado, en las condiciones evaluadas se observaron diferencias importantes en el flujo de carbono hacia la síntesis de alginato. Como se puede observar en la tabla 2.1 hubo un incremento de hasta 4 veces en el $Y_{Alg/biom}$ en los cultivos a baja aireación, en comparación de los cultivos en alta aireación. El flujo relativo de carbono hacia la vía de síntesis de P3HB se presentó sólo en la condición de baja aireación. Es importante señalar que, con el análisis de flujo metabólico fue posible comprobar que en condiciones de baja aireación el flujo de carbono hacia el CAT disminuye, y que adicionalmente los flujos de carbono relacionados con la biosíntesis de alginato y P3HB se incrementan.

Asimismo, en el trabajo de Castillo *et al.*, (2013a) se realizó una estimación del poder reductor, encontrándose claras diferencias bajo las condiciones realizadas. Por ejemplo, en la condición de baja aireación ($VTO_{max} = 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), donde se incrementa la biosíntesis de P3HB, se observó una disminución de hasta 5 veces en la concentración de NADPH en comparación con los cultivos desarrollados en alta aireación ($VTO_{max} = 20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). De igual manera, se observó una disminución de hasta dos veces del cofactor NADH. Es importante resaltar que la concentración de los cofactores en los cultivos desarrollados en condiciones de baja aireación sustenta estudios previos relacionados con la biosíntesis de P3HB. Como se mencionó anteriormente, cuando existe una disminución en la concentración

de oxígeno se favorece la biosíntesis de P3HB debido la desviación de Acetil-CoA hacia esa ruta, lo cual ocasiona una disminución de la poza de NADPH por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa.

Asimismo, en la condición de baja aireación, hay una disminución de la actividad del CAT, lo que origina una menor concentración de NADH y NADPH. En cuanto a la biosíntesis de alginato, hasta este momento no existen reportes de cómo el poder reductor puede afectar el flujo de carbono hacia su biosíntesis. Cabe señalar que en este trabajo fue posible demostrar que los cambios en el consumo de oxígeno (a diferentes condiciones de aireación) están relacionados con cambios observados en el flujo de carbono, así como en la estimación de los cofactores NADH y NADPH. Sin embargo, una desventaja de los cultivos en matraz es que no se tiene control de las condiciones de cultivo.

Tabla 2.1. Parámetros cinéticos de los cultivos en matraces agitados bajo diferentes condiciones de aireación (Castillo *et al.*, 2013a).

Condición de cultivo	μ [h ⁻¹]	$Y_{Alg/biom}$ [g g ⁻¹]	$Y_{P3HB/biom}$ [g g ⁻¹]	$NADPH_{est}$ mol mol _{Gluc} ⁻¹	$NADH_{est}$ mol mol _{Gluc} ⁻¹
Alta aireación	0.17 ± 0.01	0.13	ND	1.56	7.35
Baja aireación	0.08 ± 0.01	0.51	0.73	0.36	4.77

ND: No detectable

Por otro lado, es importante señalar que la relación de los cofactores en el metabolismo celular es de gran relevancia ya que diversos grupos de investigación han desarrollado estrategias de manipulación metabólica para mejorar la disponibilidad de los cofactores y con ello incrementar la producción de algunos metabolitos de interés. Por ejemplo, en *Escherichia coli* junto con las vías endógenas generadoras de NADPH, se han modificado enzimas para la producción heteróloga de P3HB. En ese sentido, Centeno-Leija (2003) incrementó el rendimiento de P3HB un 15 %, con respecto a la cepa parental en cultivos lote con glucosa como fuente de carbono mediante la sobre-expresión del gen que codifica para la transhidrogenasa soluble UdhA para favorecer la conversión de NADH a NADPH.

3. JUSTIFICACIÓN

En el metabolismo central de *A. vinelandii* gran cantidad de reacciones celulares son del tipo óxido-reducción (VPP y el CAT), así como la etapa limitante para la biosíntesis del precursor del alginato y P3HB, donde los cofactores NADH y NADPH son los principales cofactores que llevan a cabo la transferencia de electrones.

Se sabe que, en *A. vinelandii*, el control de oxígeno disuelto adquiere gran relevancia ya que determina en cierta medida el crecimiento celular, así como la síntesis de alginato y P3HB. Recientemente, en cultivos en matraces se observó que la modificación del consumo de oxígeno, mediante cambios en la aireación, tiene un efecto sobre la estimación de los cofactores NADPH y NADH. Asimismo, se han observado diferencias en el flujo de carbono hacia el CAT, así como a la vía de biosíntesis de alginato y P3HB. Debido a que, en el metabolismo celular, las reacciones de óxido reducción juegan un papel relevante en la regulación de las actividades enzimáticas, se propone que estos cofactores podrían afectar el flujo de carbono hacia las diferentes vías metabólicas. En el presente proyecto se propone estudiar, el efecto que tiene el consumo de oxígeno de la bacteria en la relación de los cofactores NADH y NADPH y a su vez en la distribución del flujo de carbono hacia el metabolismo celular.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

En cultivos de *Azotobacter vinelandii* desarrollados a una mayor velocidad de transferencia de oxígeno la relación de los cofactores NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ se incrementará debido a un incremento del flujo de carbono hacia el metabolismo central.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo general

Entender cómo las relaciones de los cofactores NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ se relaciona con el flujo metabólico y la expresión génica bajo condiciones de limitación y no limitación de oxígeno.

4.2.2 Objetivos específicos

- Estudiar, en cultivos en quimiostato, los cambios en la relación de los cofactores NADH y NADPH a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (VTO).
- Conocer cómo es la relación del poder reductor en el crecimiento celular, biosíntesis de alginato y P3HB en cultivos quimiostato bajo condiciones microaerófilas.
- Estudiar, en cultivos de *A. vinelandii* en quimiostato la distribución del flujo de carbono, mediante el análisis de flujo metabólico.
- Evaluar la expresión relativa de los genes que son dependientes del poder reductor (biosíntesis de alginato, P3HB, metabolismo central y respiratorio).

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Para comenzar a estudiar cómo es la relación del poder reductor (NADH y NADPH) en la ruta de biosíntesis de alginato y de P3HB, se propuso la siguiente estrategia general (figura 5.1). Se utilizó medio Burk modificado (MBM) con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Díaz-Barrera *et al.*, 2012). Los cultivos continuos se operaron a una tasa de dilución de 0.08 h^{-1} y fueron llevados a cabo bajo condiciones de limitación de oxígeno (<1 % de TOD) manipulando la velocidad de agitación de 300 a 500 rpm y en condiciones de no limitación de oxígeno (700 rpm), en cada una de las condiciones evaluadas se calculó la VTO. Se consideró un estado estacionario cuando la concentración de biomasa y de fuente de carbono fueron constantes (< 10 % de variación), al menos después de alcanzar 3 o 4 tiempos de residencia. Los cultivos se realizaron con la finalidad de determinar si existe una relación en la concentración de los cofactores con las respuestas metabólicas observadas (biosíntesis de alginato y de P3HB). Todos los cultivos se realizaron en fermentadores de 3 L. Asimismo, se realizó un análisis de flujo metabólico en el Departamento de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Barcelona.

En la primera parte de este trabajo, se seleccionó el medio de cultivo para el inóculo. Posteriormente, con la finalidad de seleccionar la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de cultivo para el comienzo de los cultivos en quimostato, se realizaron cultivos en a 300, 500 y 700 rpm con MBM (figura 5.2).

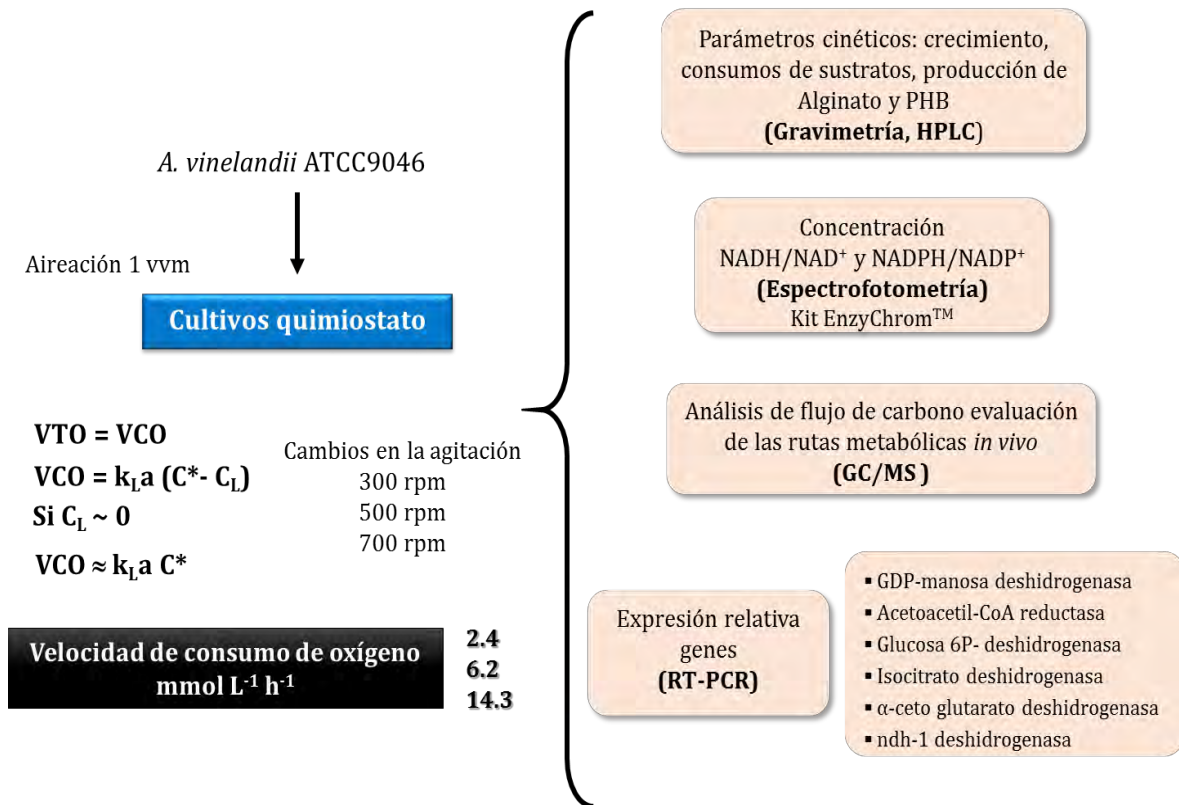


Figura 5.1 Estrategia experimental general propuesta para el estudio del presente trabajo.

Cultivos en lote a diferentes VTO_{max}



Cultivos en quimiostato a diferentes VTO y a una velocidad específica de crecimiento (μ)



Figura 5.2 Imágenes de los cultivos lote y quimiostato empleados en el presente trabajo

En la segunda parte del trabajo, se hizo un análisis de flujo metabólico (AFM) en el Departamento de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Pau Ferrer, en la figura 5.3 se presenta la metodología empleada para llevar a cabo el AFM; el proceso va desde la recopilación de información para el modelado metabólico, hasta el desarrollo matemático necesario para hacer las respectivas simulaciones y analizar la variación de los flujos en el interior de la célula como resultado de modificaciones o manipulaciones en el sistema. Por otro lado, mediante técnicas de PCR en tiempo real se evaluó los niveles de transcripción de los genes que son dependientes del poder reductor.

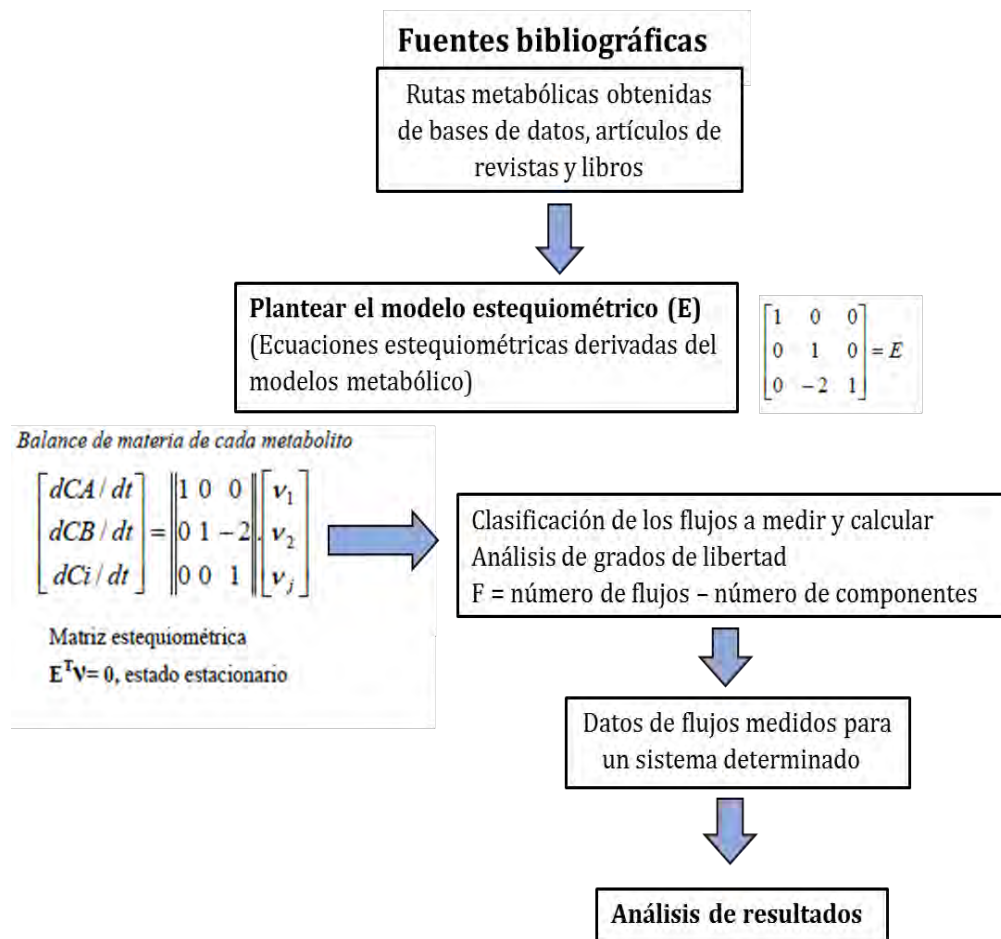


Figura 5.2 Estrategia experimental para el análisis de flujo metabólico (AFM)

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepa: Se utilizó la bacteria de *A. vinelandii* ATCC 9046. La cepa se preservó en cajas Petri con Medio Burk modificado (MBM Tabla 6.1), excepto que en el medio para la preservación de la cepa se excluyó la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) y se incluyó MOPS (ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico) y agar a una concentración de 1.42 y 18 g/L respectivamente. Se realizaron resiembras mensuales, incubándose 48 h a 29 °C. Para la preservación de la cepa esta se mantuvo a 4°C.

6.2. Medio de cultivo: Se utilizó MBM constituido de glucosa y sulfato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. El resto de los componentes que constituyen el medio se presentan en la tabla 6.1.

Tabla 6.1 Composición del MBM.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
Sulfato de amonio	0.8
K ₂ HPO ₄	0.66
KH ₂ PO ₄	0.16
CaSO ₄	0.05
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.2
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.0029
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.027

Para el MBM las sales de potasio, la glucosa y el sulfato de amonio se disolvieron en 900 ml de agua destilada y el pH se ajustó a 7.2 con NaOH (2N). A su vez, el sulfato de calcio se disolvió en 50 ml de agua destilada, al igual que las sales restantes. Con el objeto de evitar precipitaciones, las tres fracciones se esterilizaron por separado a 121°C durante 20 min y una vez estériles se mezclaron en la campana de flujo laminar.

6.3. Desarrollo de los cultivos

6.3.1. Cultivos en matraces agitados

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de volumen de trabajo, los cuales se incubaron a 29 °C y 200 rpm (diámetro de agitación de 25 mm), durante 24 h.

a) Pre-inóculo

El pre-inoculo se desarrolló en cajas Petri con medio Burk, solidificado con agar (18 g/L) y sin fuente de nitrógeno.

b) Preparación del inóculo para los cultivos en matraz

El inóculo para el matraz fue preparado en matraces de 500 mL con 100 mL de MBM. Los matraces se inocularon con 2 asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo) y se incubaron a 29°C y 200 rpm durante 24 h. Posteriormente se tomaron 10 mL para inocular los matraces a una relación 1/10.

6.3.2. Cultivos en biorreactor

Los cultivos en biorreactor se realizaron en un equipo Applikon (Schiedam, Netherlands) de 3.0 L de volumen nominal, con un volumen de trabajo de 2.0 L, equipado con 2 impulsores tipo turbina Rushton ($D_i/D_T = 0.35$ cm) y un difusor de aire con 7 orificios (figura 6.1). El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH marca Ingold, y se mantuvo constante en 7.2 mediante la adición automática de NaOH 2N. La TOD se determinó mediante un electrodo polarográfico de oxígeno (Ingold) y la señal fue transmitida a un amplificador y adquirida por una PC Compac deskpro. El control de espuma se realizó de forma manual utilizando una bomba peristáltica y con la adición de antiespumante silicona al 10 % (p/v). Los cultivos se realizaron a 29 °C, pH 7.2 y diferentes velocidades de agitación. El flujo de entrada de aire fue de 1.5 L/min.

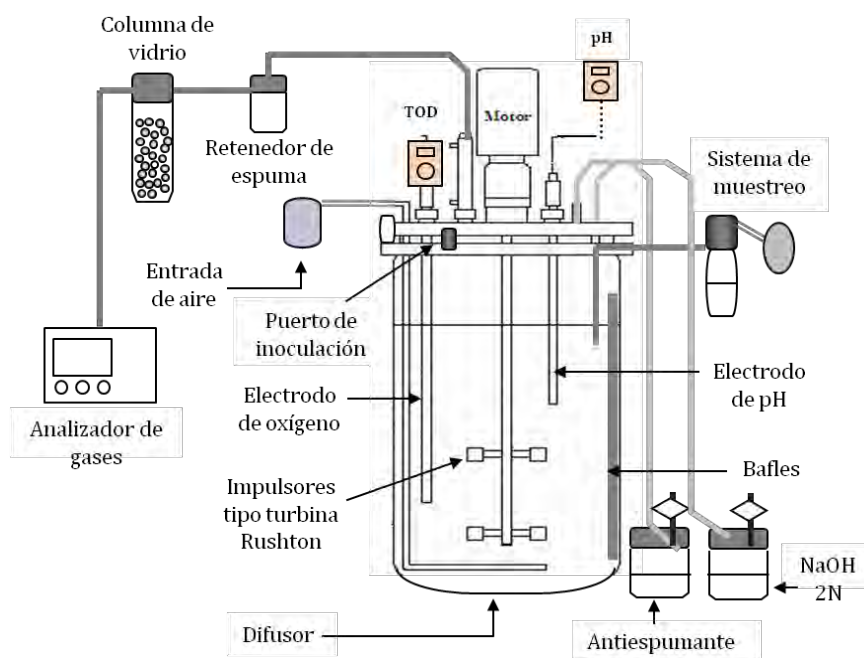


Figura 6.1 Descripción del biorreactor *Applikon* que se utiliza en el presente trabajo.

a) Preparación del inóculo para los cultivos en biorreactor

El inóculo para el biorreactor fue preparado en matraces de 500 mL con 100 mL de MBM. Los matraces se inocularon con 2 asadas de las células generadas en cajas Petri (pre-inóculo) y se incubaron a 29°C y 200 rpm durante 24 h. Bajo estas condiciones y mediante una dilución 1/50 de la muestra, se obtuvo una densidad óptica (D.O.) = 0.13 ± 0.02 . Las células obtenidas en el inóculo fueron centrifugadas a 11,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células se re-suspendieron en medio fresco. El volumen del inóculo correspondió al 10 % (v/v) del volumen total de trabajo.

6.4. Métodos analíticos

6.4.1. Determinación de biomasa por peso seco

La determinación de biomasa se llevó a cabo mediante el método gravimétrico de peso seco. Se tomaron 10 mL de caldo de cultivo y se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga marca Eppendorf (modelo 5804).

Se separó el sobrenadante y el paquete celular fue filtrado al vacío a través de membranas *Sartorius* de 0.22 μm de tamaño de poro, previamente taradas. Las membranas con muestra se secaron por 24 h a 70 °C en una estufa (Felisa), posteriormente se colocaron en un desecador durante 1.5 horas hasta llegar a una temperatura ambiente. Finalmente se pesaron y se obtuvo, por diferencia de peso, la cantidad de biomasa expresada en g/L de medio de cultivo (Peña *et al.*, 1997).

6.4.2. Cuantificación de Proteína

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

Soluciones: a) Na_2CO_3 2 % en NaOH 0.1 N; b) Tartrato de Na y K 2 % c) CuSO_4 1%

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

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

Se tomó 1.0 mL de la muestra del caldo de cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos. Se hicieron diluciones dependiendo de la cantidad de muestra. Posteriormente, se adicionó 1.0 mL de la solución reactiva, se agitó y se dejó reposar 10 minutos. Después se adicionó 100 μL del reactivo de Folin, se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en obscuridad. Las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5804) a 13,000 rpm durante 2 minutos para eliminar restos celulares. Finalmente, se determinó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Adicionalmente se corrió una curva patrón utilizando albúmina bovina (Sigma-Aldrich), con las siguientes concentraciones 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 0.8, 1.2 mg/mL (figura 6.2).

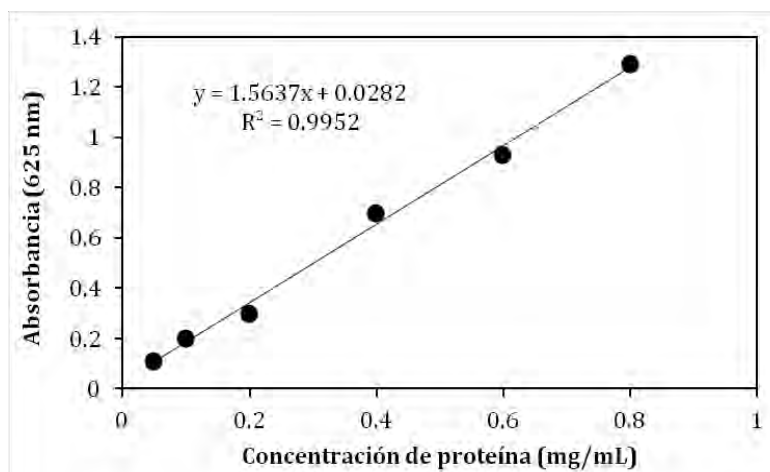


Figura 6.2 Curva patrón para la cuantificación de proteína.

6.4.3. Extracción y cuantificación del alginato

La técnica se basa en la precipitación de alginato con isopropanol y la cuantificación gravimétrica del mismo (Trujillo-Roldán 1999; Castillo *et al.*, 2013b). Se tomaron 10 mL de caldo de cultivo y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga marca Eppendorf (modelo 5804). Se separó el sobrenadante y se mezcló con 30 mL de isopropanol, dejando reposar al menos 10 minutos en frío para la precipitación del producto. El producto se filtró en membranas *Sartorius* de 0.22 μm , previamente taradas. La membrana se secó por 24 h a 70 °C en una estufa (Felisa). Finalmente, se pesó y por diferencia de peso se obtuvo la concentración de polisacárido.

6.4.4. Cuantificación de Glucosa

Para la cuantificación de glucosa se recuperó 1.0 mL de caldo de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL. La cuantificación de glucosa se realizó por HPLC empleando una columna aminex HPX-87H (300 y 7.8 mm) (Biorad, Hércules, CA, USA) y H_2SO_4 0.014 N como fase móvil a un flujo de 0.65 mL/min y una temperatura de análisis de 50 °C (Castillo *et al.*, 2013b). Las muestras se diluyeron en agua Mili Q para alcanzar concentraciones en la curva de calibración (2.5-20 mM). Se utilizaron como detectores un arreglo de diodos y un índice de refracción. Para la cuantificación de glucosa, se empleó la siguiente ecuación:

$$Glucosa \left(\frac{g}{L} \right) = \left[\frac{\left(\frac{Absorbancia - 3052}{34,638.84} \right) * Dilución}{1000} \right] * 180$$

6.4.5. Cuantificación de P3HB

La cuantificación de P3HB se determinó mediante la conversión a ácido crónico por tratamiento con H₂SO₄ concentrado (Castillo *et al.*, 2013b). Las muestras se analizaron por HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 0.014 N a un flujo de 0.65 mL/min y una temperatura de análisis de 50 °C. Se utilizó como detector un arreglo de diodos (Waters 2996).

Se tomó 1.0 mL del cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, se decantó la muestra, se dejó secar y posteriormente se le adicionó 1.0 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se incubó a 90 °C y 700 rpm durante 1 h en un *Thermomixer R*. Posteriormente se dejaron las muestras enfriar y se realizaron diluciones dependiendo de la cantidad de muestra. Se inyectaron 20 µL de cada muestra al HPLC. Los valores de las áreas obtenidas a 220 nm se extrapolan a la curva patrón, la cual se elaboró con P3HB comercial (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 g/L. Para el cálculo del porcentaje de P3HB, se empleó la siguiente ecuación:

$$PHB (\%) = \left[\frac{\left(\frac{Area\ bajo\ la\ curva + 7600}{158,848.710} \right) * Dilución}{Biomasa\ empleada} \right] * 100$$

6.4.6. Cuantificación de amonio

La concentración de amonio se cuantificó por el método de indofenol propuesto por Kaplan (1969). La reacción involucra la transformación del amonio a cloramina mediante la acción del hipoclorito. Posteriormente, la cloramina reacciona con el fenol originando el cromógeno

azul denominado p-hidroxifenil imino benzoquinona, que absorbe a 635 nm y cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de amonio.

El método utiliza las siguientes soluciones preparadas con agua destilada.

Solución A: Fenol 0.106 M, nitroferricianuro de sodio 0.17 mM

Solución B: Hidróxido de sodio 0.125 N, hipoclorito de sodio 11 mM

Se tomó 1.0 mL de la solución A en tubos *Eppendorf* de 2.0 mL y se le adicionaron 25 μ L de muestra estándar. Se agitó en un vortex (Maxi mix 11, modelo M37615). Posteriormente, se adicionó 1.0 mL de la solución B, se tapó y se agitó vigorosamente y se contaron 30 minutos de reacción. Durante ese tiempo, las muestras desarrollaron un color “azul Prusia”, característico de la reacción. Finalmente se determinó la absorbancia a 635 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 1E) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada. Adicionalmente se corrió una curva patrón utilizando sulfato de amonio (Sigma-Aldrich), con las siguientes concentraciones 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 0.8 mg/mL (figura 6.3).

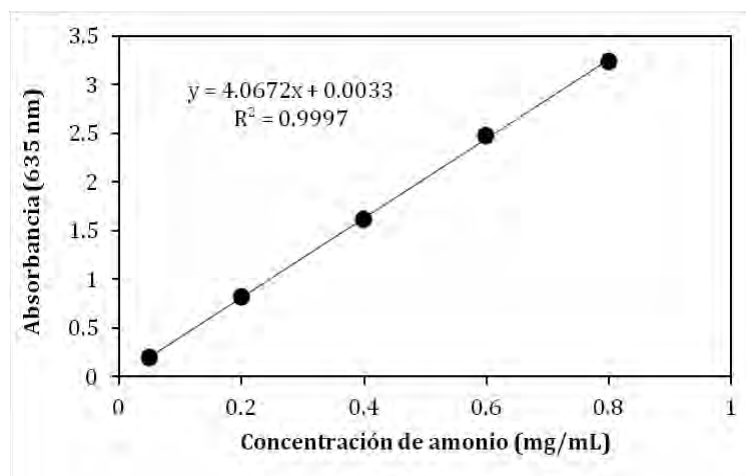


Figura 6.3 Curva patrón para la cuantificación de amonio.

6.4.7. Determinación de cofactores

La medición de los cofactores se realizó tomando muestras a DO_{600nm} durante la fase de crecimiento exponencial. Los cofactores intracelulares tales como, NAD^+ , $NADP^+$, $NADH$

y NADPH, fueron extraídos y ensañados utilizando el kit de extracción EnzyChrom™ (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para una rápida inactivación del metabolismo celular, 13 mg de células de cada cultivo fueron inmediatamente recibidas en metanol al 70% (v/v) a -50 °C. La pastilla celular fue lavada en frío con PBS y resuspendida en amortiguador ácido o básico (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) para extraer los pirimidin nucleótidos reducidos u oxidados. La concentración relativa de NAD⁺, NADP⁺, NADH y NADPH fue cuantificada por métodos enzimáticos, utilizando NADP⁺-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NAD⁺-lactato deshidrogenasa (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

6.4.8. Pasos de preparación de muestra para el análisis por GC-MS

- Hidrólisis de la proteína

Para cosechar las células se colectaron volúmenes de 1 mL de los cultivo en quimiostato a diferentes tiempos. Las células se centrifugaron durante 10 min a 6,000 rpm y 4 °C. La biomasa se recuperó y se lavó dos veces con agua Mili Q y posteriormente fueron secadas en un evaporador rotatorio (Concentrator 5301, Eppendorf AG) durante 12 h. Con el fin de hidrolizar la proteína celular presente para la obtención de aminoácidos, las pastillas secas se resuspendieron en 0.1 mL de HCl 6 N a 100 °C durante 24 h, la incubación se realizó en una estufa. Las muestras hidrolizadas se neutralizaron (pH 6-7) con NaOH 6N (el volumen de NaOH requerido para la neutralización es menor al volumen empleado de HCl, debido a la evaporación de este durante la hidrólisis). Por último, para eliminar los sólidos, las muestras se filtraron con filtros Millex HN de 0.45 µm y fueron liofilizadas (Delis, 2009; Meza *et al.*, 2012).

- Derivatización

Para determinar las condiciones de reacción óptimas que permitan la derivatización de los aminoácidos obtenidos en la hidrolisis previa y su posterior análisis por MS se realizaron pruebas con el hidrolizado empleando N-metil-N (terbutildimetilsilil)-trifluoroacetamida

(MTBSTFA). Las reacciones de derivatización se llevaron a cabo en tubos de vidrio de 5 mL en una proporción 1:3, derivatizante-solvente y se incubaron a 80 °C durante 1 h. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 min a °C para retirar las sales restantes de la neutralización y se transfirieron a viales para el análisis de GC-MS (Wittmann and Heinzle, 2002; Delis, 2009).

6.5. Sistema de análisis de O₂ en la fase gaseosa

Se utilizó un analizador de gases (Teledyne Analytical Instruments, USA Mod. 7500) para medir el O₂ en el flujo gaseoso de la salida del biorreactor. Se acondicionó un frasco receptor de espuma a la salida del biorreactor y una columna de vidrio con silica después del frasco receptor de espuma, para la remoción de la humedad del gas antes de entrar al analizador (Figura 6.1).

6.5.1. Estimación de la velocidad de transferencia de O₂

La velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se estimó a partir del análisis en línea del nivel de oxígeno gaseoso a la salida del biorreactor, utilizando la ecuación propuesta por Zeng *et al.*, (1994):

$$VTO = \frac{V_G}{V_L V_N} (X_{in} - X_{out}) \quad \text{Ec. 6.1}$$

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

6.5.2. Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno

La velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O₂}) fue calculada a partir de los datos experimentales de la VTO_{max} y a concentración de biomasa (X), utilizando para ello la siguiente ecuación:

$$q_{O_2} = \frac{VTO_{\max}}{X_{\max}} \quad \text{Ec. 6.2}$$

6.6. Índices estequiométricos en la ecuación de la biomasa

Los índices estequiométricos de las macromoléculas en la biomasa se realizaron en el Instituto de Química/UNAM. La fórmula elemental consistió en medir con un analizador elemental por combustión, la proporción másica porcentual de C, H y N ($g_{\text{elemento}}/g_{\text{biomasa}}$). Como producto de la incineración se obtuvo el porcentaje de cenizas de la muestra. La proporción de oxígeno se calculó por el diferencial entre la masa total de la muestra y la contribución de las distintas fracciones medidas. De esta manera se obtuvo la siguiente fórmula de la composición elemental: $CH_{1.94}O_{0.57}N_{0.09}$, siendo el C siempre uno al ser normalizado con base a sus proporciones en moles.

Una vez establecidas las reacciones bioquímicas más representativas, se realiza un balance de materia o un balance molar para cada uno de los metabolitos intermediarios, generando una matriz estequiométrica, denominada como E, un vector de flujos v y se asume que el sistema está en estado estacionario. Asimismo, se calculó la masa de los aminoácidos proteínogénicos por GC/MS (Anexo I).

6.7.1 Modelización matemática

El análisis de flujo metabólico es realizado empleando un modelo estequiométrico en el que se incluyen las reacciones bioquímicas más representativas para la biosíntesis de un producto de interés. En caso de no tener suficiente información acerca del microorganismo de estudio, se pueden agregar datos de otros microorganismos que presenten rutas bioquímicas similares. El AFM se realiza mediante un balance de materia alrededor de los metabolitos presentes en el modelo estequiométrico propuesto y se asume un estado estacionario, lo cual permite obtener un sistema de ecuaciones algebraicas lineales, como se presentan en:

$$Ev = dC/dt = 0$$

Siendo E la matriz estequiométrica de dimensiones $(e \times n)$, donde las e filas representan cada uno de los metabolitos y las n columnas representan las reacciones en las que estos participan. El vector v de dimensión $(n \times 1)$, es el vector de flujos de todas las reacciones. Los valores en casa columna corresponden a los coeficientes estequiométricos de los metabolitos que participan en la reacción. Hay un coeficiente negativo para cada metabolito consumido y positivo para cada metabolito producido. Un coeficiente estequiométrico de cero se usa para metabolitos que no participan en la reacción considerada. Se asume un estado estacionario para las concentraciones todos los metabolitos intracelulares (C_i), con lo cual la velocidad de acumulación de todos ellos es cero.

Para resolver este sistema de ecuaciones lineales $(e \times n)$, se deben establecer los grados de libertad (F) que indican si el sistema es determinado, indeterminado o sobre especificado; estos corresponden a la diferencia entre el número de reacciones presentes (n) y el total de compuestos (e) empleados para los balances de materia. En caso de poder medir el número de flujos dado por F , el sistema se considera determinado. Otra situación que puede presentarse es que el número de flujos medidos sea inferior a F , lo que implica que el sistema es insuficiente para obtener una única solución, en tal caso se obtiene un sistema subdeterminado.

6.8 Análisis de Flujo Metabólico

El análisis de flujo metabólico se realizó empleando el programa OptFlux 3.3. En el Anexo II, se presentan las reacciones empleadas para el análisis de flujo metabólico.

6.9 Análisis de transcripción génica mediante PCR en tiempo real (RT-PCR)

5.9.1 Recuperación de células: 15 mL de caldo de cultivo, tomados en los últimos dos tiempos de residencia, fueron centrifugados a 4 000 rpm, 20 min, a 4°C. El paquete celular fue congelado a -20°C, hasta realizar la extracción de RNA.

SOLUCIONES

DEPC 0.1%. En un frasco de vidrio y con un magneto en su interior, se esterilizaron 50 mL de agua Milli-Q. Una vez a temperatura ambiente, se adicionaron 50 μ L de DEPC, (Sigma-Aldrich D5758). Dejando en agitación al menos 4 horas para la completa disolución del DEPC. Finalmente se mantuvo en refrigeración.

DEPC 0.5%. En un frasco de vidrio y con un magneto en su interior, se esterilizaron 50 mL de agua Milli-Q. Una vez a temperatura ambiente, se adicionaron 250 μ L de DEPC, (Sigma-Aldrich D5758). Dejando en agitando al menos 4 horas para la completa disolución del DEPC. Finalmente se mantuvo en refrigeración.

Extracción y purificación de RNA

a) Extracción del RNA. Se realizó de acuerdo al método descrito por Barry *et al.*, (1992). La descripción de la técnica para la extracción y cuantificación del RNA, así como el tratamiento del RNA con DNAsa se presentan en el Anexo III.

b) Síntesis de cDNA. Para la transcripción reversa se utilizaron 200 ng de RNA de cada condición y se utilizó un Kit Revert AidTM H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Science), según la metodología recomendada por el proveedor. Los detalles del desarrollo de la técnica se presentan en el anexo2.

c) PCR de tiempo real. Se realizó con un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas Life Science), de acuerdo al procedimiento descrito en el anexo 2. La secuencia de los primers para cada uno de los genes analizados se presenta en la tabla 6.2.

Table 6.2 Primers utilizados para los análisis de PCR en tiempo real.

Gene	Forward primers (5' to 3')	Reverse primers (5' to 3')
<i>gyrA</i>	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT
<i>algD</i>	ACGTGGAGTTGTAGTCCTTG	GCGGGAAGTTGTAGTCCTTG
<i>phbB</i>	GGAAAACCTTCACCGTGATCG	CGTGTTTCGCAGACTTCAAAA
<i>IDH</i>	CCCCTGTCCGTCAAGAACTA	GCCGTAGAAATCACCGTTGT
<i>AKDH</i>	TCAAGCATGTGGTCTGGTGT	GGAACAGCTCCTTCTTGIGC
<i>zwf-1</i>	ATGATCCAGAACCACCTGCT	CCTTGAGCACCTTGACCTTC
<i>ndh</i>	GTAACCTGATGGGCAACCT	GTGCGGAAGGTACCGTAGAG
<i>gap</i>	TACCTATAGGACCAGTACGC	CCCGTAGCCTACGTAATAAT
<i>cydA</i>	GCGCTAGCTAGCCTGACATG	GGCATAACCCTAGAGGTCCT
<i>nifH</i>	TGGGTAAACTGGATCTGAA	TGAAACCGGTAATTTAGGCC

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cultivos en quimiostato a diferentes VTO

Diversos autores han demostrado que la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) tiene un impacto importante sobre la biosíntesis de alginato y P3HB, afectando los rendimientos de ambos polímeros, y en el caso del alginato teniendo un efecto en su composición química (Díaz-Barrera *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2011b). En el presente estudio se planteó evaluar diferentes velocidades de agitación y, por lo tanto, diferentes velocidades de transferencia de oxígeno. En la figura 7.1, se muestran los perfiles de TOD y VTO en cultivos realizados a 300, 500 y 700 rpm. En las primeras dos condiciones, el oxígeno disuelto se mantuvo cercano a cero lo cual es debido a la alta velocidad de consumo de oxígeno que presenta *Azotobacter* (Oelze, 2000).

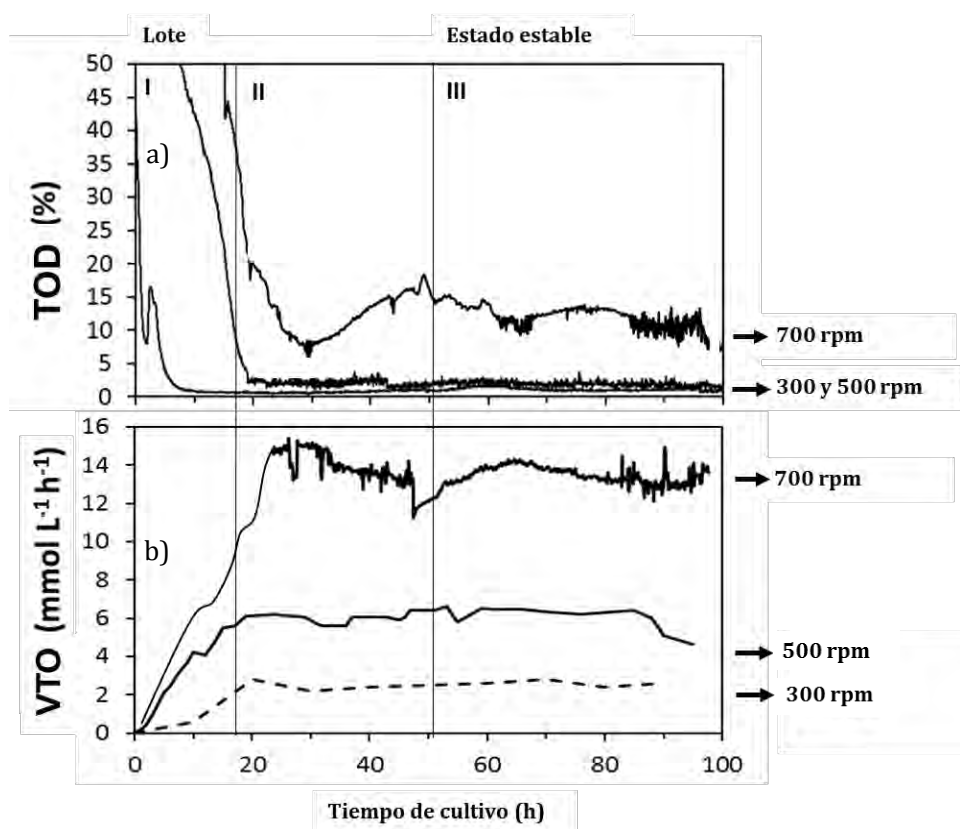


Figura 7.1 Perfiles de TOD (a) y VTO (b) en cultivos de *A. vinelandii* desarrollados en biorreactor bajo diferentes condiciones de agitación de 300, 500 y 700 rpm.

De tal manera que estos cultivos se desarrollaron bajo condiciones de limitación de oxígeno, la VTO medida en estos cultivos fue de 2.4 ± 0.03 y 6.2 ± 0.05 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 300 y 500 rpm, respectivamente. El perfil de TOD que se muestra en la figura 7.1a ya ha sido anteriormente documentado en cultivos sin control de oxígeno (Díaz-Barrera *et al.*, 2007) lo cual sugiere que durante el crecimiento exponencial de la bacteria, no existe acumulación de oxígeno ($dO_2/dt \approx 0$) y por lo tanto en esa etapa del cultivo, se puede considerar que la VTO es igual a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO). Así, bajo estas condiciones, el metabolismo celular es influenciado directamente por la VCO. Para los cultivos a 700 rpm la VTO determinada fue de 14.3 ± 0.3 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ de tal manera que los cultivos no se encontraron limitados por oxígeno.

a) Influencia de la VTO sobre el crecimiento celular, consumos de sustratos y producción de alginato y P3HB

En la figura 7.2a se presentan los perfiles de concentración de proteína en el estado estable. Cada uno de los puntos de las gráficas representa el promedio de tres cultivos independientes. Las figuras incluyen barras de desviación estándar para mostrar la reproducibilidad de los datos. En las tres condiciones evaluadas se obtuvieron concentraciones similares de proteína celular (alrededor de 0.71 ± 0.06 g/L). Aunque las concentraciones fueron similares, los rendimientos de proteína con respecto a la glucosa consumida fueron diferentes. El rendimiento proteico más alto ($0.15 \text{ g}_{\text{proteína}} \text{ g}_{\text{glucosa}}$) se obtuvo en los cultivos desarrollados a la VTO más baja ($2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Por el contrario, el rendimiento de proteína fue un 46 % menor bajo condiciones de no limitación de oxígeno ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Tabla 7.1). Cabe señalar que la concentración de proteína no se incrementó conforme aumentó la VTO. Esto puede ser explicado a que cuando la bacteria presenta un mayor consumo de oxígeno, se sintetizan complejos proteínicos como NADH oxidorreductasas que tienen mayor afinidad por el oxígeno pero sin producción neta de ATP, por lo que el carbono oxidado a una alta VCO se libera en forma de CO_2 sin la producción de energía suficiente para el crecimiento celular (Linkerhägner y Oelze, 1996).

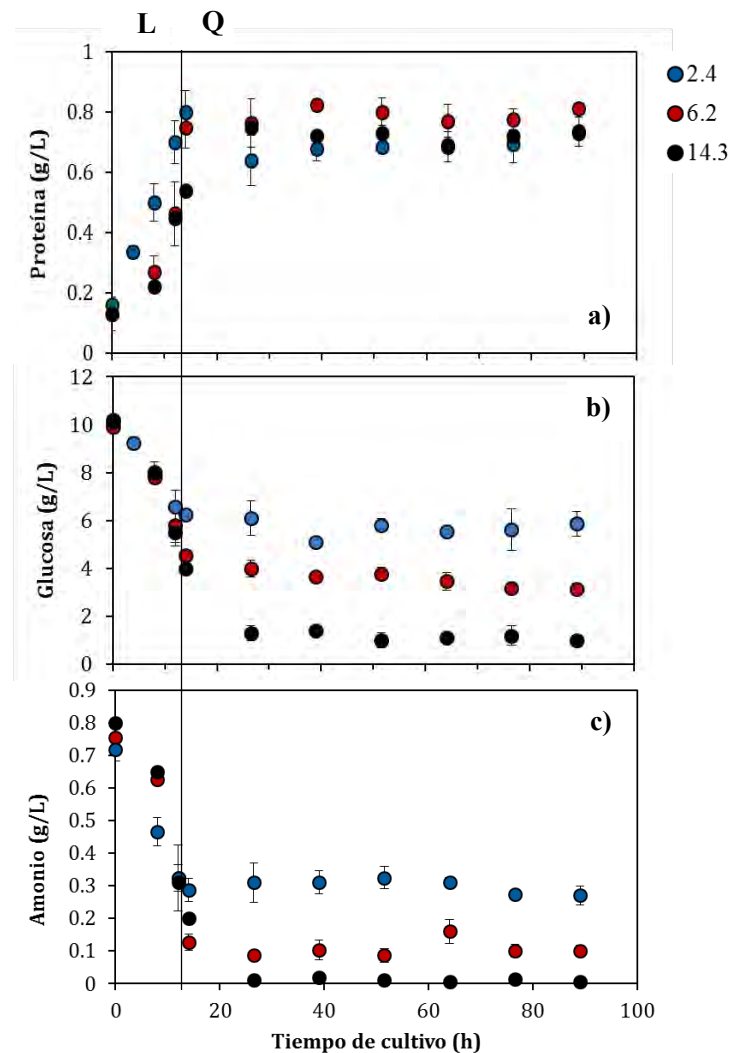


Figura 7.2 Perfiles de proteína celular (a), consumo de glucosa (b) y consumo de amonio (c) en cultivos quimiostato desarrollados a diferentes VTO. Etapa lote (L), Etapa continuo (Q).

Por otro lado, las concentraciones de glucosa residual en el estado estacionario fueron 5.5 ± 0.35 , 3.5 ± 0.3 y 1.3 ± 0.2 g/L para los cultivos a una VTO de 2.4, 6.2 y $14.3 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (figura 7.2b). En las tres condiciones evaluadas la concentración fue mayor en comparación con otros tipos de azúcares reportados. Por ejemplo, en condiciones similares, Díaz-Barrera *et al.*, (2012) reportaron una constante de afinidad (K_s) para sacarosa de 0.1 g/L. De tal manera, se puede inferir que los cultivos no estuvieron limitados por la

fente de carbono. En cuanto al consumo de la fuente de nitrógeno, en los cultivos que se realizaron bajo condiciones de limitación de oxígeno (2.4 ± 0.03 y 6.2 ± 0.05 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) la concentración de amonio en el estado estacionario fue mayor (6.2 y 3.8 veces, respectivamente) con respecto a los cultivos a 14.3 ± 0.3 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (figura 7.2c). Cabe señalar que el K_s reportado para amonio en *A. vinelandii* es de 0.11 g/L (Díaz-Barrera *et al.*, 2012). Sin embargo, en los cultivos desarrollados a 14.3 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, la concentración de amonio fue cercana a cero (figura 7.2c), es posible que bajo estas condiciones la bacteria este expresando su cadena respiratoria desacoplada. En este caso, cuando existe una alta TOD y el sistema nitrogenasa está activo debido al proceso de fijación de nitrógeno, se sintetizan complejos proteínicos como NADH oxidorreductasas que tienen mayor afinidad por el oxígeno, pero sin producción neta de ATP (Linkerhägner y Oelze, 1996).

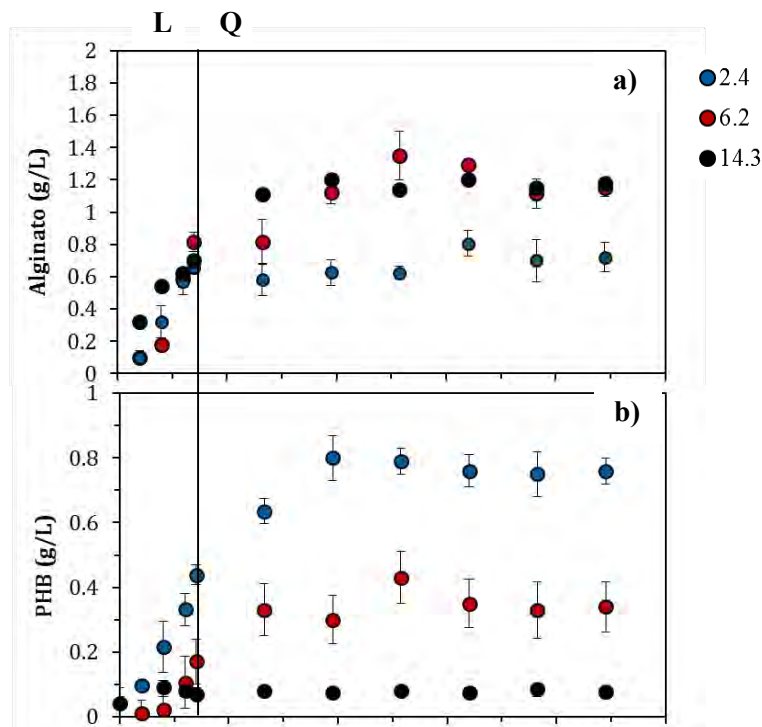


Figura 7.3 Perfiles de producción de alginato (a) y P3HB (b) en cultivos quimiostato desarrollados a diferentes VTO. Etapa lote (L), Etapa continuo (Q).

La producción de alginato se muestra en la figura 7.3a. Las concentraciones alcanzadas bajo condiciones de limitación de oxígeno fueron de 0.7 ± 0.08 y 1.18 ± 0.18 g/L para los cultivos desarrollados a 2.4 y 6.2 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Cabe señalar que este comportamiento ya ha sido anteriormente reportado por Díaz-Barrera y colaboradores (2012), quienes observaron que en cultivos continuos con *A. vinelandii* limitados por oxígeno y con sacarosa como fuente de carbono, el incremento en la velocidad de consumo de oxígeno resultó en un aumento en la biosíntesis de alginato. De igual manera, Gómez-Pazarín y colaboradores (2016) reportaron que en matraces agitados al incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno de 2.8 a 5.5 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, mediante cambios en el volumen de trabajo, la producción y el rendimiento de alginato con base a biomasa se incrementaba. Asimismo, la menor producción de alginato a bajas VTO podría estar relacionada con la disponibilidad energética de las células. Se sabe que la biosíntesis de polisacáridos microbianos es altamente demandante de energía, por lo que los niveles celulares de ATP pueden ser regulados por cambios en la velocidad de consumo de oxígeno. Por otro lado, en condiciones de no limitación de oxígeno (14.3 ± 0.3 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) se observó que la bacteria sintetizó 1.07 ± 0.15 g/L, esta concentración fue similar a lo obtenido en los cultivos desarrollados a 6.2 ± 0.05 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, donde la producción de alginato fue ligeramente mayor (1.18 ± 0.18).

En cuanto a la producción de P3HB, en la figura 7.3b se observó que en los cultivos desarrollados a 2.4 ± 0.03 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ la fuente de carbono se dirigió preferentemente hacia la biosíntesis del polímero, generándose 0.75 ± 0.04 g/L; mientras que, en los cultivos a 6.2 ± 0.05 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, la concentración de P3HB llegó a 0.34 ± 0.05 g/L. El incremento en la biosíntesis de P3HB a bajas velocidades de consumo de oxígeno ha sido reportado por otros autores (Sabra *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2011). Este comportamiento es debido a que, bajo condiciones limitantes de oxígeno, la actividad de la NADH oxidasa disminuye, originando un aumento en la concentración de NADH, el cual inhibe la citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, ocasionando la disminución del flujo de carbono hacia el CAT, lo que favorece la desviación de acetil-CoA hacia la síntesis de P3HB (Galindo *et al.*, 2007). En contraste, al incrementarse el consumo de oxígeno de la bacteria (14.3 ± 0.3 $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$),

la producción del polímero fue despreciable, alcanzándose 0.05 ± 0.002 g/L. Como era de esperarse cuando la bacteria se crece a una mayor concentración de oxígeno, la producción de P3HB disminuye debido a que la fuente de carbono se dirige preferentemente hacia el CAT. En la figura 7.4 se muestra la relación de los parámetros evaluados bajo condiciones de limitación y no limitación de oxígeno.

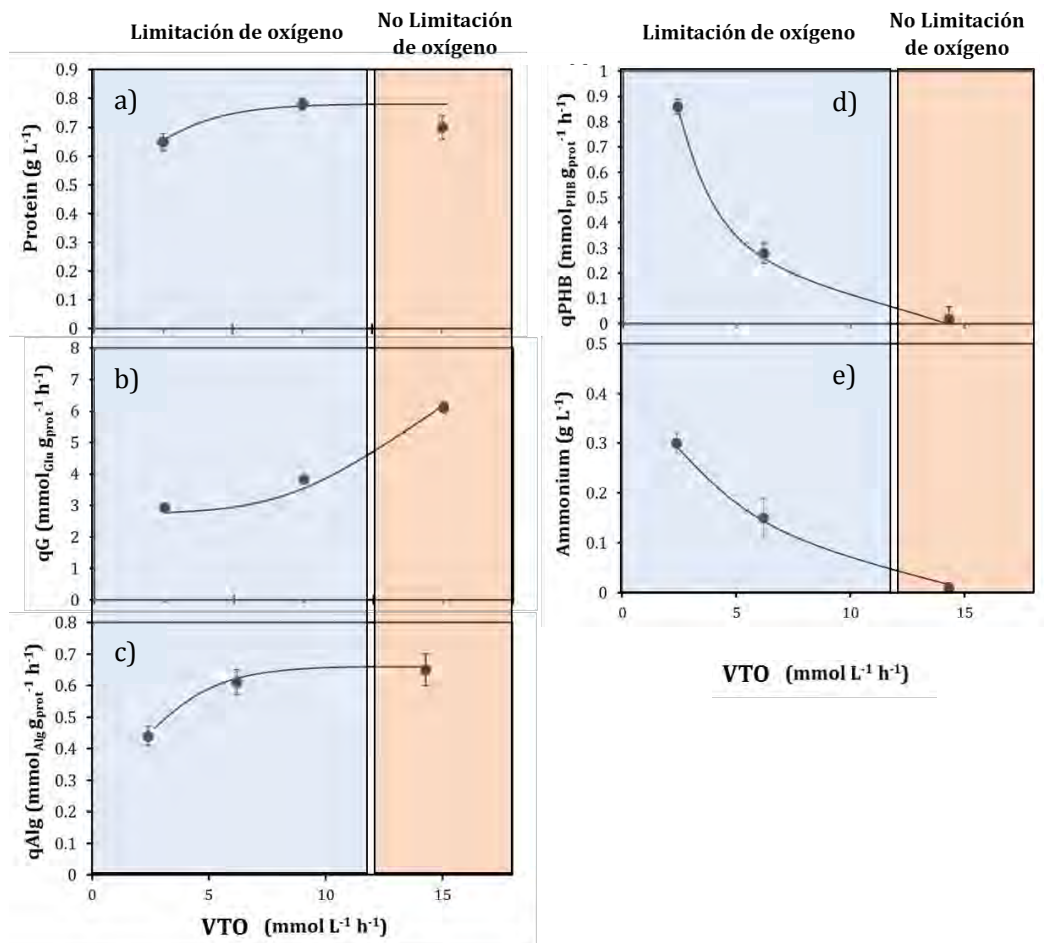


Figura 7.4 Relación del crecimiento celular con base a proteína (a), consumo específico de glucosa (qG) (b), velocidad de producción de alginato ($qAlg$) (c) y P3HB ($qP3HB$) (d) y consumo de amonio (e) de los cultivos en estado estacionario bajo condiciones de limitación y no limitación de oxígeno.

Cuando la VTO fue más alta ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), el qG aumentó (2 veces) a $6.12 \pm 0.35 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$; mientras que, en la condición más baja de VTO el qG fue de $2.9 \pm 0.2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ lo cual muestra una estrecha correlación con los valores de qO_2 (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Parámetros cinéticos en el estado estable en cultivos de *A. vinelandii* ATCC9046 en condiciones de limitación de oxígeno (2.4 ± 0.03 y $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y no limitación de oxígeno ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Agitación (rpm)	VCO_{\max} (mmol $L^{-1}h^{-1}$)	qO_2 (mmol $g_{\text{pro}}^{-1} h^{-1}$)	qG (mmol _{Glu} $g_{\text{pro}}^{-1} h^{-1}$)	Producción de alginato		Producción de PHB	
				Alg (g L^{-1})	$Y_{\text{alg/p}}$ (g g^{-1})	PHB (g L^{-1})	$Y_{\text{PHB/p}}$ (g g^{-1})
300	2.4	3.7	2.94	0.7 ± 0.08	1.01	0.75 ± 0.04	1.15
500	6.2	8.26	3.83	1.18 ± 0.18	1.52	0.34 ± 0.05	0.43
700	14.3	20	6.12	1.07 ± 0.15	1.50	0.05 ± 0.002	0.07

A pesar de que se obtuvo una mayor qG y qO_2 en la condición de mayor disponibilidad de oxígeno ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Tabla 7.1), esto no se vio reflejado en una mayor síntesis de proteína celular. Como se comentó anteriormente cuando *A. vinelandii* crece en concentraciones altas de oxígeno y condiciones diazotróficas, la bacteria activa algunos componentes proteicos, como NADH oxidorreductasa II y citocromo bd oxidasas que forman parte de su cadena respiratoria desacoplada permitiendo la protección del complejo nitrogenasa (Bertsova *et al.*, 2001).

La producción de alginato y P3HB se muestran en la Tabla 7.1. En condiciones de limitación de oxígeno, la producción de alginato aumentó cuando la VTO fue de $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y en condiciones de no limitación de oxígeno ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se mantuvo constante (Tabla 7.1). Asimismo, la velocidad de producción de alginato (q_{Alg}) fue similar ($0.61 \pm 0.04 \text{ mmol g}_{\text{proteína}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a valores altos de VTO (6.2 ± 0.05 y $14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que fue 35 % más alto en comparación con los cultivos a $2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por otro lado, el

incremento en la biosíntesis de P3HB a bajas velocidades de consumo de oxígeno ha sido reportado por otros autores (Sabra *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2011). En contraste, en los cultivos no limitados por oxígeno ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) la acumulación de P3HB no fue mayor al 5 % del peso seco. En este estudio la velocidad de producción de P3HB ($qP3HB$) se correlacionó negativamente con el aumento de la VTO (figura 7.4d). Dicho fenómeno se debe a que cuando existe un mayor consumo de oxígeno, la fuente de carbono se dirige preferentemente al CAT provocando un abatimiento en la biosíntesis de P3HB.

7.2 Determinación de la relación de los cofactores NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ en el estado estable a diferentes VTO

En la figura 7.5 se muestran la relación molar de los cofactores NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ para las tres condiciones evaluadas de VTO. En las tres condiciones se observó que la relación NADPH/NADP⁺ es significativamente superior a la relación NADH/NAD⁺. Posiblemente esto se debe a que el cofactor NADH es consumido rápidamente en cadena respiratoria, y debido a esto su concentración intracelular sea baja. En cuanto a la relación molar NADH/NAD⁺ ésta incrementa de 0.08 ± 0.02 a 0.23 ± 0.04 mol/mol cuando la bacteria se crece a una VTO de $6.2 \pm 0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se sabe que cuando la bacteria incrementa su velocidad de consumo de oxígeno, el cofactor NADH generado durante la oxidación de la glucosa es consumido por la ubiquinona oxidoreductasa o complejo I de la cadena respiratoria; por lo tanto, la relación de este cofactor debería ser más baja en comparación con la condición de $2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Sin embargo, es importante mencionar que en la condición de $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se presenta una mayor biosíntesis de alginato (Tabla 7.1), por lo que bajo esta condición se está generando una mayor cantidad de NADH que contribuiría a lo cuantificado intracelularmente. En contraste, cuando la bacteria incrementa su consumo de oxígeno a $14.3 \pm 0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, la relación molar NADH/NAD⁺ disminuye a 0.15 ± 0.02 , lo cual sugiere que a pesar de que se podría estar produciendo más NADH por el mayor consumo de la fuente de carbono bajo esta condición, este es consumido rápidamente en la cadena respiratoria.

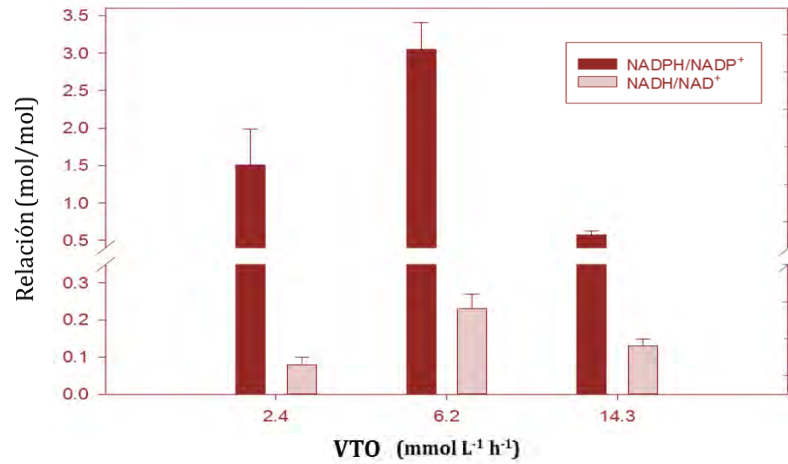


Figura 7.5 Relación molar de los niveles intracelulares de NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ en cultivos quimiostato desarrollados a una VTO de 2.4 ± 0.03 , 6.2 ± 0.05 y 14.3 ± 0.3 mmol L⁻¹ h⁻¹.

En cuanto a la relación NADPH/NADP⁺ (figura 7.5), se observó un incremento de 1.5 ± 0.48 a 2.9 ± 0.36 mol/mol al aumentar la VTO de la bacteria. Como se mencionó previamente, cuando *A. vinelandii* se cultiva a bajas velocidades de consumo de oxígeno, existe un desvío de acetil-CoA hacia la biosíntesis de P3HB agotando la poza intracelular de NADPH. Sin embargo, cuando se incrementa aún más el consumo de oxígeno a 14.3 ± 0.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, la relación molar disminuye a 0.5 ± 0.05 , dicho comportamiento podría estar relacionado con la capacidad del *A. vinelandii* para fijar nitrógeno en presencia de una mayor concentración de oxígeno. Como se mencionó anteriormente, la fuente de amonio se vuelve indetectable en el estado estable (figura 7.4e), por lo que bajo esta condición el sistema nitrogenasa se encuentra activo. Se ha demostrado en diversas investigaciones que la fijación biológica de nitrógeno realizado por el sistema nitrogenasa es un proceso que requiere un alto gasto energético (Espín, 2002). La fijación de una molécula de nitrógeno bajo condiciones fisiológicas normales requiere de 16 a 20 moléculas de Mg-ATP, de tal manera que la fijación de nitrógeno puede consumir una fracción significativa de la poza celular de ATP. Dicho proceso también implica el consumo de poder reductor (8 electrones por cada molécula reducida). Asimismo, es importante señalar que la fijación de nitrógeno requiere altos

requerimientos de energía debido a la protección respiratoria que requiere la bacteria (Inomura *et al.*, 2017).

La fuente inmediata de electrones para reducir la dinitrogenasa es variable, pudiéndose utilizar ferredoxina reducida, flavodoxina reducida o en algunos casos la fuente inicial de electrones es el poder reductor proveniente de los cofactores reducidos. El nitrógeno atmosférico (N_2) reducido en forma de amonio (NH_4^+) puede asimilarse en principio como componente de los aminoácidos, donde el cofactor NADPH proporciona el poder reductor necesario para poder realizar estas reacciones biosintéticas. No obstante, este último es consumido en mayor cantidad por la NADH-deshidrogenasa de la cadena respiratoria.

7.3 Análisis de flujo metabólico en el estado estable a diferentes VTO

En esta etapa del trabajo se realizó un AFM bajo las condiciones evaluadas (figura 7.6). Las vías metabólicas donde se observaron un mayor impacto del consumo de oxígeno, fueron: el CAT, los puntos de generación de piruvato y acetyl-CoA, así como la VPP. Asimismo, se observaron diferencias en la vía de síntesis del P3HB y alginato. Cuando la bacteria se crece a una mayor disponibilidad de oxígeno se incrementa el flujo de carbono hacia la VPP, siendo hasta 6 veces mayor en comparación con los cultivos desarrollados a un bajo consumo de oxígeno ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Esta vía provee a la célula de precursores metabólicos como la R5-P, así como de NADPH, siendo este utilizado en las reacciones de biosíntesis.

En el CAT se observaron cambios en las tres condiciones evaluadas, esta vía es la principal fuente de generación de poder reductor (NADH y $FADH_2$). De igual manera, contribuye a la regeneración de NADPH por la isocitrato deshidrogenasa. Cabe mencionar que en esta vía se observó una disminución del flujo de carbono en la condición de menor consumo de oxígeno ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en comparación con los cultivos desarrollados a 6.2 ± 0.05 y $14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Estos resultados tienen sentido a lo observado con el crecimiento celular, donde se observó un menor concentración de proteína en los cultivos realizados a un menor consumo de oxígeno.

Es importante señalar que en el cultivo que presenta un mayor consumo de oxígeno ($14.3 \pm 0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) no se observó un mayor crecimiento con respecto a la proteína intracelular, posiblemente esto se deba a que bajo esa condición el poder reductor generado en el CAT es consumido por la deshidrogenasa II, la cual se activa cuando la bacteria se encuentra en una condición elevada de oxígeno y en condiciones de fijación de nitrógeno. De tal manera que esta enzima tiene mayor afinidad por el oxígeno pero sin producción neta de ATP, por lo que el carbono oxidado a un mayor consumo de oxígeno se libera en forma de CO_2 sin producción de energía suficiente para el crecimiento celular.

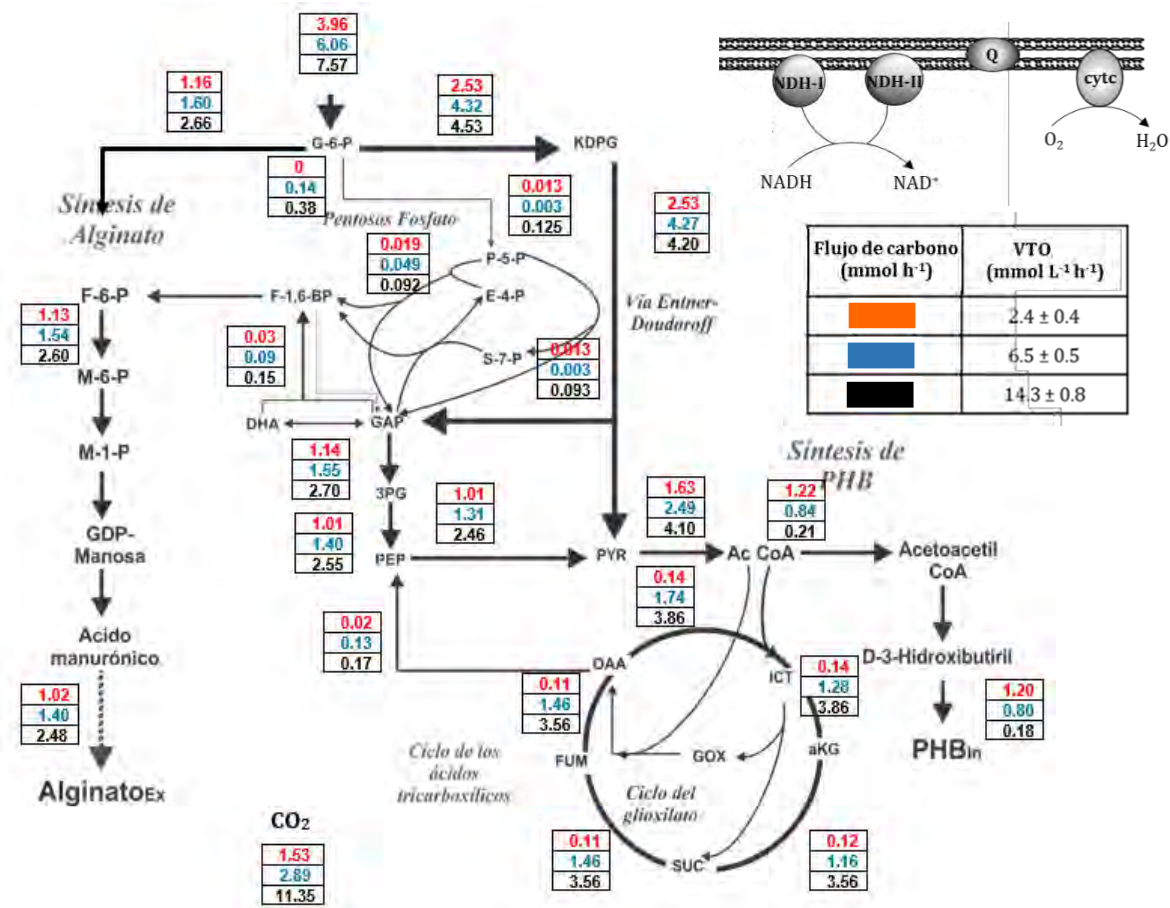


Figura 7.6 Diagrama del análisis de flujo metabólico en el estado estable en cultivos de *A. vinelandii* a diferentes VTO.

En este sentido, la producción de CO₂ que se produce principalmente en el CAT, así como en la vía pentosa fosfato, se ven favorecidas con el aumento del flujo de carbono cuando la bacteria se crece a una mayor VTO ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), siendo 7 veces mayor en comparación con los cultivos desarrollados a una menor VTO ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Otras vías donde se observaron diferencias notables, fueron en los nodos de generación del piruvato y acetil-CoA. El piruvato es un nodo metabólico importante entre las reacciones para la generación de energía y la biosíntesis de otros compuestos metabólicos. En los cultivos a un bajo consumo de oxígeno ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se observó que el flujo de carbono hacia la generación de piruvato fue 2.5 veces menor en comparación con el cultivo a mayor consumo de oxígeno ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). De igual manera, para el nodo que comprende la generación de acetil-CoA, el flujo de carbono bajo dicha condición fue menor.

Como se describió anteriormente, la producción de P3HB se favorece cuando la bacteria se crece a una menor velocidad consumo de oxígeno, de tal manera que el flujo de carbono bajo esa condición se incrementó hacia la ruta de biosíntesis del polímero, siendo esta de 1.5 y 6.5 veces mayor en comparación con los cultivos a 6.2 ± 0.05 y $14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Por otro lado, el flujo de carbono hacia la biosíntesis de alginato fue 1.7 veces mayor en la condición de $14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en comparación con el cultivo a $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Sin embargo, como se mostró anteriormente (Tabla 7.1) en la condición de $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ la producción de alginato fue mayor ($1.18 \pm 0. \text{ g/L}$). Anteriormente, Inomura *et al.*, (2017) observaron que los costos energéticos de la fuente de carbono consumida en condiciones de un alto consumo de oxígeno se emplean principalmente para la protección respiratoria; mientras que, los costos para la fijación de nitrógeno y otras respuestas fisiológicas, como la biosíntesis de alginato son proporcionalmente más bajos.

7.4 Expresión relativa de genes que codifican enzimas involucradas en las reacciones de óxido-reducción en función de la VTO

Es importante mencionar que las diferencias observadas en el flujo metabólico podrían estar relacionadas con la expresión génica. Para tener un panorama global de lo que está ocurriendo en el metabolismo de la bacteria, se analizó la expresión de los genes que codifican para las proteínas involucradas en las reacciones de óxido-reducción, y que además son claves en la regulación de las diferentes vías metabólicas. Para ello, se seleccionaron los genes *algD* y *phbB*, los cuales codifican para las enzimas GDP-manosa deshidrogenasa y acetoacetil-CoA reductasa, involucradas en la biosíntesis de alginato y P3HB, respectivamente. Asimismo, los genes que codifican para las enzimas involucradas en metabolismo central (*IDH*, *AKDH*, *zwf-1*). Finalmente se decidió estudiar el gen *idh*, el cual codifica para la NADH-deshidrogenasa, enzima clave en la respiración celular y el gen *nifH* que codifica para el sistema nitrogenasa.

Los resultados de la expresión génica en los cultivos fueron normalizados tomando como referencia la expresión génica de los cultivos desarrollados a $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (cultivo en condiciones de limitación de oxígeno). Como se observa en la figura 7.5, no hubo diferencia significativa en la expresión de los genes del metabolismo central (*gapA*, *IDH*, *AKDH*, *zwf*) bajo las tres condiciones evaluadas. No obstante, en el análisis de flujo de carbono (figura 7.6) se puede observar que el incremento en el consumo de oxígeno de la bacteria coincide con un aumento en el flujo de carbono hacia la VPP y el CAT. Lo anterior permite suponer que, en *A. vinelandii*, podría existir una regulación postrancricional de los genes involucrados en el metabolismo central, o bien que la regulación de estos genes y sus productos finales resulta ser más compleja. Por otro lado, es importante señalar que *A. vinelandii* tiene múltiples copias de su genoma lo cual podría tener un efecto en los resultados obtenidos.

En lo que se refiere a la expresión relativa del gen *algD*, se sabe que su regulación genética es dependiente del sistema de dos componentes GacS/A (Castañeda *et al.*, 2001). En donde

se ha observado que este sistema regula de manera postranscripcional la expresión del gen *algD* a través del sistema Rsm (Manzo *et al.*, 2011). El nivel de expresión de este gen fue significativamente menor (2.5 veces) en cultivos desarrollados a $2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, en comparación con los cultivos desarrollados a $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (condición referencia) (figura 7.7). Estos resultados se correlacionaron con la disminución en la producción de alginato que fue de $1.18 \pm 0.18 \text{ g/L}$ a $0.7 \pm 0.08 \text{ g/L}$ (Tabla 7.1). Por el contrario, la expresión del gen *algD* disminuyó 1.3 veces en la condición de no limitación de oxígeno ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) no obstante la producción de alginato fue similar a lo obtenido en la condición de $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabla 7.1). La discrepancia entre la transcripción y el producto final puede explicarse por una posible regulación postranscripcional, como ha sido reportado previamente para *algD* en *A. vinelandii* (Manzo *et al.*, 2011).

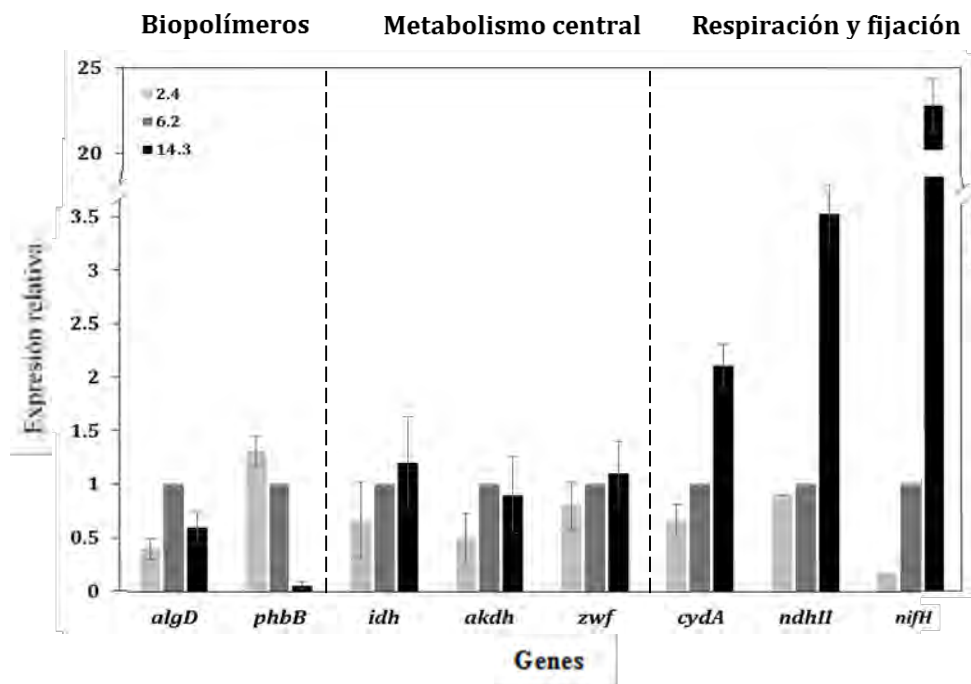


Figura 7.7 Expresión relativa de los genes *algD*, *phbB*, *gapA*, *idh*, *akdh*, *zwf*, *cydA*, *ndh* y *nifH* en el estado estable en cultivos quimiostato de *A. vinelandii* a diferentes VTO.

En cuanto a la transcripción del gen *phbB*, este se encuentra localizado en el operón *phbBAC*, conformado por los genes *phbB*, que codifica para acetoacetil-CoA reductasa; *phbA* que

codifica la β -cetotiolasa; y finalmente, el *phbC* que codifica la P3HB sintasa. En la figura 7.5 se puede observar que los niveles de expresión del gen *phbB* disminuyeron en aproximadamente 1.4 y 13.3 veces (en relación a lo observado bajo la condición a 2.4 ± 0.03 mmol L⁻¹ h⁻¹) para los cultivos desarrollados a 6.2 ± 0.05 y 14.3 ± 0.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, lo cual estuvo relacionado con la producción de P3HB (Tabla 7.1). En trabajos anteriores se ha reportado que durante la fase estacionaria la proteína RpoS permite un aumento en la concentración de PhbR, el cual a su vez es un activador transcripcional del operon *phbBAC*, de tal manera que la biosíntesis de P3HB resulta favorecida (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011). Cabe señalar, que cuando la bacteria se encuentra a bajos consumos de oxígeno, es posible que la proteína RpoS este activando la transcripción del gen *phbB* por lo que el flujo de acetil-CoA se dirige hacia la biosíntesis de P3HB (Senior *et al.*, 1972).

Existen cuatro NADH-ubiquinona oxidoreductasas que están presentes en las cadenas respiratorias de *A. vinelandii* incluyendo una NADH oxidoreductasa acoplada de tipo Nou (NDH-I) y tres desacopladas (Ndh o NDH-II y dos enzimas asociadas a membrana implicadas en el transporte de cationes, del tipo Nqr y Sha) (Setubal *et al.*, 2009). En este sentido las proteínas NDH-I y NDH-II son las principales deshidrogenasas de NADH. Mientras que, la actividad de la NDH-I está presente a bajas concentraciones de oxígeno, la actividad de la NDH-II se ve favorecida a altas concentraciones de oxígeno y agotamiento de nitrógeno (Bertsova *et al.*, 1998). De tal manera, que en *A. vinelandii* la cadena respiratoria conformada por la NDH-II y el citocromo bd ha sido reconocida como la cadena respiratoria desacoplada responsable de la protección respiratoria (Bertsova *et al.*, 1998), la cual se caracteriza por un bajo rendimiento de translocación de H⁺ (H⁺/e⁻ =1) en lugar de los cinco electrones transportados por las cadenas respiratorias acopladas. En los cultivos a 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, donde el rendimiento de proteína fue menor, el *qG* se incrementó y la concentración de amonio fue cercana a cero, los niveles de transcripción de los genes que codifican los componentes de la cadena respiratoria desacoplada (*cydA* y *ndhII*) se indujeron significativamente con respecto a los cultivos desarrollados bajo condiciones de limitación de oxígeno (2.4 y 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹). La expresión relativa del gen *cydA* aumentó 30 % cuando la VTO fue de 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ con respecto al cultivo desarrollado a 2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹; sin

embargo, se observó una inducción aún mayor en el cultivo a $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (2.3 veces). En cuanto al gen *ndhII*, la expresión relativa también se indujo considerablemente (3.5 veces) a una VTO de $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en comparación con los cultivos desarrollados a $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (condición referencia). Los resultados sugieren que a una mayor VTO ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la cadena respiratoria alternativa involucrada en la protección respiratoria de la nitrogenasa está altamente expresada, estos resultados concuerdan con la baja concentración de amonio en dicha condición (figura 7.4e). Para comprobar este fenómeno, se determinó el nivel de transcripción del gen *nifH*, el cual forma parte del operón *nifHDK* que contiene genes estructurales del complejo nitrogenasa, este gen se indujo 23 veces en los cultivos a $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en comparación con los cultivos desarrollados a $6.2 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Los resultados demuestran que a un mayor consumo de oxígeno la bacteria se encuentra en condiciones de fijación de nitrógeno. En este caso, cuando existe una alta concentración de oxígeno y el sistema nitrogenasa está activo debido al proceso de fijación de nitrógeno, se sintetizan complejos proteínicos como NADH oxidoreductasas que tienen mayor afinidad por el oxígeno, pero sin producción neta de ATP (Poole y Hill, 1997; Linkerhägner y Oelze, 1996).

En la Figura 7.8 se muestra un esquema que integra los resultados obtenidos en el presente trabajo. En condiciones de limitación de oxígeno ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la relación del par de cofactores NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+ disminuyó en comparación con la condición de $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ esto debido a un menor flujo de carbono hacia el metabolismo central (CAT y VPP), lo cual resultó en un menor crecimiento celular y en un aumento en la biosíntesis de P3HB (principal vía de consumo de NADPH). Cabe señalar que estos datos correlacionaron con el incremento en el nivel de expresión del gen *phbB*. Por otro lado, cuando se aumentó la VTO a $14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, la bacteria se encontró en condiciones de no limitación de oxígeno; sin embargo, los cultivos estuvieron limitados por nitrógeno. Aunque bajo esta condición los flujos de carbono hacia el metabolismo central y por lo tanto hacia la producción de NADH y NADPH aumentaron, en comparación con las otras condiciones evaluadas (2.4 ± 0.03 y $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la relación del par de cofactores NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+ fue menor, lo cual sugiere que los electrones de los cofactores (NADH y NADPH) podrían consumirse rápidamente en las cadenas

respiratorias de *A. vinelandii* (acoplada y desacoplada), como parte de protección de su sistema nitrogenasa para la fijación de nitrógeno bajo altas concentraciones de oxígeno. En este sentido, Inomura *et al.*, (2017) realizaron un modelo para determinar los costos energéticos para la fijación de nitrógeno, bajo altas concentraciones de oxígeno demostraron que los carbohidratos consumidos se emplean principalmente para la protección respiratoria; mientras que, los costos de fijación de nitrógeno y otras respuestas fisiológicas, como la biosíntesis de alginato son proporcionalmente más bajos. Cabe señalar que esto último se comprobó con el incremento en los niveles de transcripción de los genes que codifican para los componentes de la cadena respiratoria (*cydA* y *ndhII*) y del sistema nitrogenasa (*nifH*) de la bacteria.

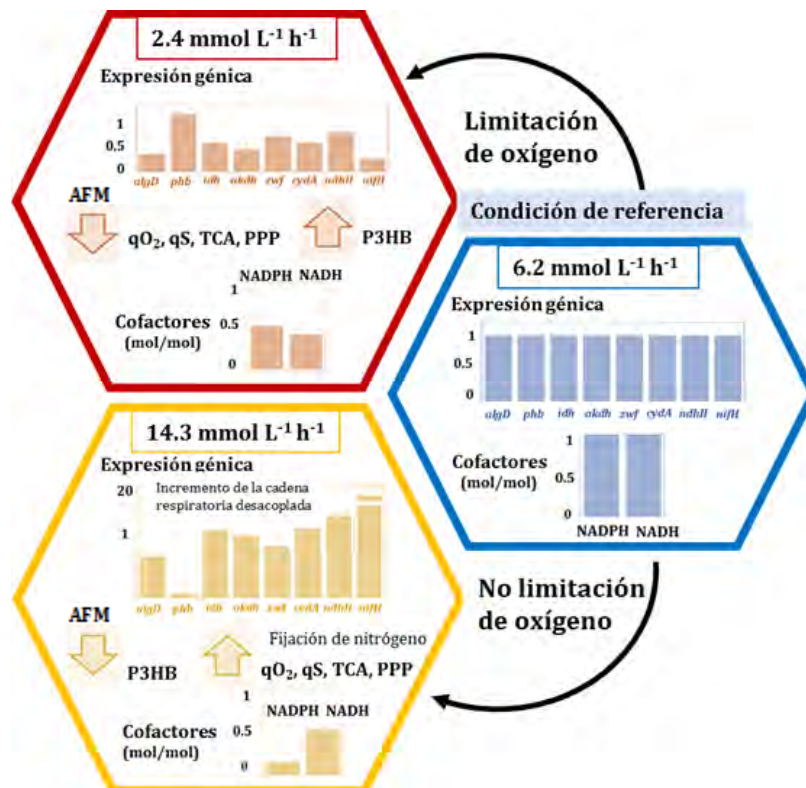


Figura 7.8 Representación esquemática de diferentes respuestas moduladas por la VTO y su relación con el metabolismo de *A. vinelandii*. Los hexágonos representan los tres valores de VTO evaluados. Los datos se normalizaron con respecto a la condición de referencia ($6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que los cambios en la disponibilidad de oxígeno tuvieron un efecto importante en el flujo metabólico de la bacteria. En condiciones de limitación de oxígeno ($2.4 \pm 0.03 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la relación de los cofactores NADPH/NADP⁺ fueron menores en comparación con el cultivo desarrollado a $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, debido a una disminución en la distribución del flujo de carbono hacia el metabolismo central (VPP y el CAT) y un aumento hacia la biosíntesis de P3HB. Sin embargo, en la condición de no limitación de oxígeno ($14.3 \pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se observó una mayor disminución de estos pares de cofactores reducidos en comparación con el cultivo a $6.2 \pm 0.05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, esto podría deberse al proceso de fijación de nitrógeno y protección respiratoria de la bacteria que se induce a una mayor disponibilidad de oxígeno, lo cual se asoció a una limitación de nitrógeno en dicha condición.

9. APORTACIONES Y PERSPECTIVAS

9.1 Aportaciones

-Artículos

- García, A. Segura, D. Castillo, T. Ferrer, P. Albiol, J and Peña C. (2018). *Microbial Cell Factories*
- Castillo, T. López, I. Flores, C. Segrura, D. García, A and Peña C (2018) *Journal Applied Microbiology (Sometido)*
- Peña, C. Castillo, T. Garcia, A. Millan, M. Segura, D (2014) *Microbial Biotechnology*, 7, 278-293.
- Peña, C. Lopez, S. Garcia, A. Espin, G. Romo-Uribe, A. Segura, D. 2014. *Annals of Microbiology*, 64, 39-47.

- Capítulo de libro

Peña, C., **García, A.**, Millán, M., Castillo, T. 2015. En: *Microbial factories: biodiversity, biopolymers, bioactive molecules*. Vol. 2. Editorial: Springer, editor: Kalia Vipin Chandra.

9.2 Perspectivas

- Realizar un análisis transcriptómico de *Azotobacter vinelandii* RNAscc
- Estudiar el efecto del potencial redox extracelular (PRE) en el metabolismo celular de *A. vinelandii*

10. REFERENCIAS

- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M. and Buchs, J. (2004). Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J.* 17: 187-194.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 54: 450- 472.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V. and Skulachev, V.P. (1998) Two NADH:ubiquinone reductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. *Biochim Biophys Acta.* 1363, 125-133.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V. and Skulachev, V. P. (2001). Noncoupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *J Bacteriol* 183: 6869–6874.
- Castillo, M. T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K. and Peña, C. (2013a). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochem.* 48: 995-1003.
- Castillo, T. Galindo, E. and Peña, C. (2013). The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by dissolved oxygen and specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40: 715-723.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: History, physiology and molecular biology. *FEMS Microb Rev.* 9: 1-27.
- Delis, V. (2009). Physiological studies and metabolic flux analysis of *Corynebacterium glutamicu* mutant strains. Master Thesis, Saarland University.
- Díaz-Barrera, A., Peña, C. and Galindo, E. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microb Biotech.* 76: 903–910.
- Díaz-Barrera, A., Soto, E. and Altamirano, C. (2012). Alginate production and alg8 gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *J Ind Microb Biotech.* 39(4):613-21.
- Espín, G. (2002). *Biología de Azotobacter vinelandii* En: *Microbios en línea.* <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios> Editores: Martínez-Romero E. y Martínez Romero J.L. ISBN 968-36-8879-9.
- Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C. and Galindo, E. (2013). Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Tech.* 53: 85-91.
- Foster, J., W. Park, Y. K., Penfound, T., Fenger, T. and Spector, M. P. (1990). Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: Molecular sequence analysis of the bifunctional nadR regulator and the nadA-pnuC operon. *J. Bacteriol.* 172: 4187–4196.
- Fuhrer, T. and Sauer, U. (2009). Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J. Bacteriol.* 191:2112-21.

- Galindo, E., Peña, C., Nuñez, C., Segura, D. and Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact.* 6:7.
- García, A., Segura, D., Espin, G., Galindo, E., Castillo, T. and Pena, C. (2014) High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochem Eng J* 82: 117-123.
- Gómez-Pazarín, K., Flores, C., Castillo, T., Buchs, J., Galindo, E and Peña C (2016). Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *J Chem Technol Biotechnol* 91:1485–1492
- Igarashi, R., Dos Santos, P. C., Niehaus, W. G., Dance, I. G., Dean, D. R. and Seefeldt, L. C. (2004) Localization of a catalytic intermediate bound to the FeMo-cofactor of nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 34: 770–775.
- Inomura, K., Jason, B., and Follows, M. J. (2017) A quantitative analysis of the direct and indirect costs of nitrogen fixation: a model based on *Azotobacter vinelandii*. *The ISME J* 11: 166–175.
- Kaplan, A. (1969). The determination of urea, ammonia and urease. *Method Biochem Anal.* 17: 311-324.
- Kennedy, C. and Toukdarian, A. (1987). Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann Rev Microbiol.* 41: 227-258.
- Linkerhägner, K. and J. Oelze. (1996). Nitrogenase activity and regeneration of the cellular ATP pool in *Azotobacter vinelandii* adapted to different oxygen concentrations. *J. Bacteriol.* 179: 1362-1367.
- Lowry, O. H., Rosenbrough A. L., Farr A. L. and Randall R.L. (1951). Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lozano, E., Galindo, E. and Peña, C. (2011). The quantity and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions are determined by the maximal oxygen transfer rate (OTR_{max}). *Microb Cell Fact.* 10: 1-13.
- Mailloux, R., Lemire, J. and Appanna, V. (2010). Metabolic networks to combat oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *A Van Leeuw.* 3: 433-42.
- Manzo, J. Cocotl-Yanez, M. Tzontecomani, T. Martinez, V.M. Bustillos, R. Velasquez, C. Goiz, Y. Solis, Y. Lopez, L.Fuentes, L.E. Nunez, C. Segura, D. Espin, G. and Castañeda, M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene algD by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 21: 147–159.
- Núñez, C., S. Moreno, G. Soberón y G. Espín. (1999). The *Azotobacter vinelandii*: Response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* 181: 141-148
- Oelze J (2000) Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence. *FEMS Microbiol Rev* 24: 321-333.
- Peña, C., Trujillo-Roldán, M. A. and Galindo, E. (2000). Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol.* 27: 390-398.

-
- Peña, C., Castillo, T., Nuñez, C. and Segura D. (2011a). Bioprocess desing: fermentation strategies for improving the production of alginate and poly-3 hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Tech.* 27: 390-398.
- Peña, C., Galindo, E. and Büchs, J. (2011b). The viscosifying power, degree acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochem.* 46: 290-297.
- Pindar, D. F. and Bucke, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J.* 152(3): 617–622.
- Richard, A. and Margaritis, A. (2003). Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett.* 25: 465–468.
- Sabra, W., Zeng A. P., Sabry, S., Omar, S. and Deckwer, W. D. (1999). Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biot.* 52: 773–780.
- Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 315–325.
- Segura, D., Cruz. T. and Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-b-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol.* 179:437–443.
- Senior, P. J., Beech, G. A., Richie, G. A. and Dawes, E. A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J.* 128: 1193-1201.
- Snook, C. F., Tipton, P. A. and Beamer, L. J. (2003). Crystal structure of GDP-mannose deshydrogenase: A key enzyme of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 42: 4658-4668.
- Steinbüchel, A. and Lutke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J.* 16: 81–96.
- Setubal, J.C., Dos Santos, P., Goldman, B.S., Ertesvag, H., Espín, G., Rubio, L.M., Valla, S., Almeida, N.F., *et al.* (2009) The genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol.* 191: 4534-4545.
- Tatnell, P., Russell, N. and Gacesa, P. (1994). GDP-mannose dehydrogenase in the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence form metabolite studies. *Microbiol.* 140: 1745-1754.
- Trujillo-Roldán, M.A. (1999). Efecto de las oscilaciones de oxígeno disuelto sobre la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría de Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología-UNAM.

Wittmann C. and Heinze E. (2002) Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: Metabolic flux genealogy of several generations of Lysine producing *Corynebacteria*. Appl Environ Microbiol. 68 (12): 5843-5859.

ANEXO I

Porcentaje molar de los aminoácidos proteinogénicos evaluados en el Análisis de Flujo Metabólico

Aa	C	H	N	O	S	MW	nmol	% mol
ASP	4	7	1	4	0	133	148.04	9.19573727
THR	4	9	1	3	0	119	82.65	5.13393465
SER	3	7	1	3	0	105	88.9	5.52216322
GLU	5	9	1	4	0	147	282.71	17.560976
PRO	5	9	1	2	0	115	65.29	4.05559096
GLY	2	5	1	2	0	75	139.68	8.67644273
ALA	3	7	1	2	0	89	213.73	13.2761749
VAL	5	11	1	2	0	117	97.06	6.02903444
CYST	6	12	2	3	2	233	n.d.	0
MET	5	11	1	2	1	149	n.d.	0
ILE	6	13	1	2	0	131	65.23	4.05186397
LEU	6	13	1	2	0	131	149.92	9.31251642
TYR	9	11	1	3	0	181	24.1	1.49700938
PHE	9	11	1	2	0	165	49.7	3.08719361
LYS	6	14	2	2	0	146	65.23	4.05186397
HIS	6	9	3	2	0	155	31.83	1.97717048
TRP	11	12	2	2	0	204	n.d.	0
ARG	6	14	4	2	0	155	105.80	6.57232808

ANEXO II

Reacciones y balances empleados para el análisis de flujo metabólico

v1a	GLC	----->	G6P
v1b	G6P	----->	F6P
v1c	F6P	----->	GAP + DHA
v2	DHA	----->	GAP
v3	GAP	----->	c3PG
v4	c3PG	----->	PEP
v5	PEP	----->	PYR
v6	PYR	----->	ACCOA + CO2
v7	PYR + CO2	----->	OAA
v8	OAA	----->	PEP + CO2
v9	G6P	----->	P5P + CO2
v10	P5P	----->	GAP + S7P
v10r	GAP + S7P	----->	P5P
v11	GAP + S7P	----->	cE4P + F6P
v11r	cE4P + F6P	----->	GAP + S7P
v12	cE4P + P5P	----->	GAP + F6P
v12r	GAP + F6P	----->	cE4P + P5P
v13	OAA + ACCOA	----->	ICT
v14	ICT	----->	CO2 + aKG
v15	aKG	----->	SUC + CO2
v16	SUC	----->	FUM
v16r	FUM	----->	SUC
v17	FUM	----->	OAA
v18	ICT	----->	SUC + GOX
v19	ACCOA + GOX	----->	OAA
v20	G6P	----->	KDPG
v21	KDPG	----->	PYR + GAP
v22	F6P	----->	MAN6P
v1ext	MAN6P	----->	Alginate
v2in	ACCOA	----->	PHB_bio
vB_G6P	G6P	----->	G6P_bio
vB_F6P	F6P	----->	F6P_bio
vB_GAP	GAP	----->	GAP_bio
vB_c3PG	c3PG	----->	c3PG_bio
vB_PEP	PEP	----->	PEP_bio
vB_PYR	PYR	----->	PYR_bio

vB_ACCO A	ACCOA	----->	ACCOA_bio
vB_OAA	OAA	----->	OAA_bio
vB_AKG	Akg	----->	aKG_bio
vB_P5P	P5P	----->	P5P_bio
vB_cE4P	cE4P	----->	cE4P_bio
vB_Biomas s	0.0228*c3PG_bio + 0.0024*PEP_bio + 0.0012*cE4P_bio + 7.0E- 4*G6P_bio + 0.0194*OAA_bio + 0.2768*ACCOA_bio + 0.0062*P5P_bio + 0.0512*PYR_bio + 0.0267*aKG_bio	----->	Biomass
vB_Biomas s_ex	Biomass	----->	Biomass_ex
vGlcinp	GLC	<----->	GLC_ex
vAlgex	Alginate	<----->	alginate_ex
vexCO2	CO2	----->	CO2_ex

PYR	$v5 + v21 - v7 - v6 - vB_PYR = 0$
PEP	$-v5 + v4 - vB_PEP + v8 = 0$
c3PG	$-v4 + v3 - vB_c3PG = 0$
GAP	$-v3 + v2 - v12r - v11 + v12 + v10 + v11r + v21 + v1c - vB_GAP - v10r = 0$
DHA	$-v2 + v1c = 0$
cE4P	$v12r + v11 - v12 - v11r - vB_cE4P = 0$
P5P	$v12r - v12 - v10 - vB_P5P + v10r + v9 = 0$
F6P	$-v12r + v11 + v12 - v11r - v22 - v1c + v1b - vB_F6P = 0$
c3PG_bio	$vB_c3PG - 0.0228*vB_Biomass = 0$
CO2_ex	$-R_EX_CO2_ex_ + vexCO2 = 0$
SUC	$v16r + v18 + v15 - v16 = 0$
FUM	$-v16r - v17 + v16 = 0$
OAA	$v19 + v17 - v13 - vB_OAA + v7 - v8 = 0$
ACCOA	$-v19 - v13 - vB_ACCOA - v2in + v6 = 0$
GOX	$-v19 + v18 = 0$
alginate	$v1ext - vAlgex = 0$
MAN6P	$-v1ext + v22 = 0$
ICT	$-v18 + v13 - v14 = 0$
CO2	$v15 + v14 - vexCO2 - v7 + v6 + v9 + v8 = 0$
aKG	$-v15 + v14 - vB_AKG = 0$
S7P	$-v11 + v10 + v11r - v10r = 0$
alginate_ex	$-R_EX_alginate_ex_ + vAlgex = 0$
PEP_bio	$vB_PEP - 0.0024*vB_Biomass = 0$

cE4P_bio	$vB_cE4P - 0.0012*vB_Biomass = 0$
KDPG	$v20 - v21 = 0$
G6P	$-v20 - vB_G6P - v1b + v1a - v9 = 0$
GLC_ex	$vGlcinp - R_EX_GLC_ex_ = 0$
GLC	$-vGlcinp - v1a = 0$
G6P_bio	$vB_G6P - 7.0E-4*vB_Biomass = 0$
OAA_bio	$vB_OAA - 0.0194*vB_Biomass = 0$
ACCOA_bio	$vB_ACCOA - 0.2768*vB_Biomass = 0$
P5P_bio	$vB_P5P - 0.0062*vB_Biomass = 0$
Biomass_ex	$vB_Biomass_ex - R_EX_Biomass_ex_ = 0$
Biomass	$-vB_Biomass_ex + vB_Biomass = 0$
GAP_bio	$vB_GAP = 0$
F6P_bio	$vB_F6P = 0$
PHB_bio	$v2in = 0$
PYR_bio	$vB_PYR - 0.0512*vB_Biomass = 0$
aKG_bio	$-0.0267*vB_Biomass + vB_AKG = 0$

ANEXO III

Extracción, purificación de RNA y análisis por PCR en tiempo real (RT-PCR)

- El paquete celular se resuspendió en 2 mL de MgSO₄ 10 mM (para eliminar el alginato de las células) y se centrifugaron a 8 000 rpm, 4°C, 20 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 60 µL de DEPC 0.1 % (v/v)
- Adicionar 6 µL de DEPC 0.5 % (v/v)
- Adicionar 200 µL de acetona helada (debe mantenerse en congelador). Mezclar manualmente, centrifugar 10000 rpm, 2 min, 5°C. Desechar el sobrenadante con cuidado (con una punta)
- Resuspender la pastilla en 60 µL de DEPC 0.1 % (con la punta, subiendo y bajando el líquido)
- Agregar 20 µL de lisozima, (10 mg/mL en DEPC 0.5 %), agitar manualmente (hacia arriba y hacia abajo el tubo, 1 min). Incubar a 37°C, 10 minutos (sin agitación)
- Adicionar 2 µL de Proteinasa K (100 µg/mL en DEPC 0.5 %). Agitar manualmente (hacia arriba y hacia abajo el tubo, 1 min). Incubar en hielo 10 minutos
- Agregar 7 µL de DEPC 0.5 %, 300 µL de Fenol (precalentado a 70°C). Adicionar 200 µL de Cloroformo y mezclar manualmente (con la punta). Adicionar 250 µL de DEPC 0.1 %. Centrifugar a 12 000 rpm, 4°C, 5 minutos
- Extraer el sobrenadante, fase superior, sin tocar la membrana (células) que se forma en la parte intermedia del tubo) y transferir a otro tubo Eppendorf. Repetir el paso anterior a partir de la adición de fenol, a la fase extraída adicionar 1 mL de etanol absoluto. Precipitar a -20°C, al menos 24 h.
- Centrifugar a 12 000 rpm, a 10°C, 5 minutos, eliminar el etanol por decantación. Colocar en hielo los tubos y resuspender en 50 µL de DEPC 0.1 %. Dejar hidratar al menos dos horas, si no se continúa con el proceso, almacenar el RNA a -20°C.

Cuantificación del RNA La cuantificación se realizó en Nanodrop a 240 nm. Además, se verificó la integridad del RNA mediante un gel.

Síntesis de cDNA Para la transcripción reversa se utilizaron 200 ng de RNA de cada condición y se utilizó un kit un Kit Revert Aid™ H minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Life Science), según la metodología recomendada por el proveedor. El RNA

se diluyó a 100 ng/ μ L en agua con DEPC. Se tomaron 2 μ L de RNA (200 ng) y se agregaron 2 pmoles de cada primer (reverso), tanto de los genes cuya expresión se deseaba cuantificar, como del gen control (*gyrA*). Para el diseño se utilizó el programa disponible para tal efecto en http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi. La secuencia de los primers se presenta en la tabla 6.2

El volumen de la reacción se llevó a 12 μ L con agua con DEPC 1 %. Se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se añadió: Buffer de reacción 5X 4 μ L Inhibidor de nucleasas RiboLock de 20u/ μ l 1 μ L Mezcla de dNTPs 10 mM 2 μ L Se incubó a 37°C por 5 minutos, se adicionó 1 μ L de la enzima reverso transcriptasa RevertAidTM (200 u/ μ L), quedando un volumen final de 20 μ L. La mezcla se incubó a 42°C por 60 min. La reacción se detuvo calentando a 70°C por 10 min. PCR de tiempo real. La PCR de tiempo real se realizó con un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Para estas reacciones, los cDNAs resultantes de la reverso transcripción de 200 ng de RNA de cada condición se diluyeron 1:10 en agua estéril y se tomó 1 μ L. Se añadieron 10 μ l de la mezcla maestra SYBR Green, 7 μ L de agua estéril y 2 μ L de los oligos “forward” y “reverse” correspondientes al gen cuyo cDNA se deseaba cuantificar (concentración final de los oligos 250 nM). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 10 min a 95°C, y 40 ciclos de dos pasos, a 95°C por 15 s y a 60°C por 60 s. El tamaño de todos los amplímeros fue de 100-101 bp. Todas las reacciones de RT PCR se realizaron por duplicado para cada gen y para cada condición de VTO_{max}. Adicionalmente, para cada gen la cuantificación se realizó utilizando dos amplificaciones independientes usando dos pares de oligos diferentes. La cantidad de mRNA del gen *gyrA* (que codifica para una subunidad de la DNA girasa) se usó como control interno para normalizar los resultados obtenidos para los mRNAs de los genes analizados en el cultivo referencia (700 rpm) y los correspondientes a 300 y 500 rpm (cultivos en condiciones microarofilias). El análisis de datos se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Shmittgen (2001).

RESEARCH

Open Access



Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*

Andres García¹, Pau Ferrer², Joan Albiol², Tania Castillo¹, Daniel Segura³ and Carlos Peña^{1*}

Abstract

Background: *Azotobacter vinelandii* is a bacterium that produces alginate and polyhydroxybutyrate (P3HB); however, the role of NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios on the metabolic fluxes through biosynthesis pathways of these biopolymers remains unknown. The aim of this study was to evaluate the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios and the metabolic fluxes involved in alginate and P3HB biosynthesis, under oxygen-limiting and non-limiting oxygen conditions.

Results: The results reveal that changes in the oxygen availability have an important effect on the metabolic fluxes and intracellular NADPH/NADP⁺ ratio, showing that at the lowest OTR (2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹), the flux through the tricarboxylic acid (TCA) cycle decreased 27.6-fold, but the flux through the P3HB biosynthesis increased 6.6-fold in contrast to the cultures without oxygen limitation (OTR = 14.6 mmol L⁻¹ h⁻¹). This was consistent with the increase in the level of transcription of *phbB* and the P3HB biosynthesis. In addition, under conditions without oxygen limitation, there was an increase in the carbon uptake rate (twofold), as well as in the flux through the pentose phosphate (PP) pathway (4.8-fold), compared to the condition of 2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹. At the highest OTR condition, a decrease in the NADPH/NADP⁺ ratio of threefold was observed, probably as a response to the high respiration rate induced by the respiratory protection of the nitrogenase under diazotrophic conditions, correlating with a high expression of the uncoupled respiratory chain genes (*ndhII* and *cydA*) and induction of the expression of the genes encoding the nitrogenase complex (*nifH*).

Conclusions: We have demonstrated that changes in oxygen availability affect the internal redox state of the cell and carbon metabolic fluxes. This also has a strong impact on the TCA cycle and PP pathway as well as on alginate and P3HB biosynthetic fluxes.

Keywords: NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios, Metabolic flux analysis, Oxygen availability, *Azotobacter vinelandii*

Background

Azotobacter vinelandii is a Gram negative bacterium that produces two polymers of biotechnological importance, poly-3-hydroxybutyrate (P3HB), an intracellular polyester of the polyhydroxyalkanoates (PHAs) family, and alginate, an extracellular polysaccharide [1, 2]. This bacterium fixes nitrogen under aerobic conditions, being

able to protect its oxygen sensitive nitrogenase complex from damage by respiratory protection [3]. Due to this characteristic, *A. vinelandii* exhibits a high respiratory activity, especially when exposed to high oxygen concentrations [4]. Therefore, when it is grown without control of the dissolved oxygen tension (DOT), the cultures operate at a DOT close to zero (microaerophilic conditions). Under this condition, the maximum oxygen transfer rate (OTR_{max}) and/or the maximum oxygen uptake rate (OUR_{max}) have been used to evaluate the respiratory metabolism of *A. vinelandii* [5, 6]. Several studies been focused on how the agitation rate and the OTR_{max} affect alginate and P3HB production [7–10], showing that the

*Correspondence: carlosf@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa Cuernavaca, Apdo. Post. 510-3, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

OTR_{max} is positively correlated with alginate biosynthesis, whereas P3HB biosynthesis follows an inverse relation.

Several studies have reported the relationship between the NAD(P)H⁺/NAD(P) cofactor levels and the metabolic flux distributions in aerobic cultures. For example, genetic manipulations aiming at perturbing NADH cofactor levels and/or regeneration rates were employed as a tool for the metabolic engineering of *Escherichia coli* [11–13], *Lactococcus lactis* [14], *Bacillus subtilis* [15, 16] and *Saccharomyces cerevisiae* [17]. These studies showed that changes in the ratio of NADH/NAD⁺ determined the metabolic products. Other studies have shown that strategies increasing the NADPH cofactor levels improved, for example, penicillin formation [18], methylenomycin biosynthesis [19] and P3HB biosynthesis [20–23].

To our knowledge, there have been no studies about the relationship between NADH and NADPH levels and the metabolic behavior of *A. vinelandii*. However, it is well known that the NADPH is consumed during PHB biosynthesis and the alginate biosynthesis produces NADH in this bacterium. For example, the limiting step and the control point for alginate biosynthesis is the activity of the GDP-mannose dehydrogenase enzyme, which is involved in the irreversible oxidation of GDP-mannose to GDP-mannuronic acid [24], and is NAD⁺-dependent [25]. This enzyme performs a double oxidation, in which two molecules of NADH are released for each GDP-mannuronic acid synthesized; therefore, the biosynthesis of alginate could be affected by changes in the intracellular redox state. So far, there is no evidence pointing at a possible effect of the reduction power on the production of this polymer. On the other hand, the accumulation of reducing power (NADH and NADPH) in cells growing under oxygen-limiting conditions is probably involved in the allosteric down-regulation of some TCA cycle enzymes such as citrate synthase and isocitrate dehydrogenase, decreasing the flux of acetyl-CoA into this cycle, thereby increasing its availability for P3HB biosynthesis [26]. This is because a molecule of NADHP being required for each monomer of 3-hydroxybutyryl formed during P3HB biosynthesis.

Recently, in *A. vinelandii* growing in shake flasks it was demonstrated through metabolic flux analysis [27] that changes in oxygen availability have an important impact on the metabolic fluxes, which was also reflected on the alginate and P3HB yields. However, the NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ ratios were not quantified, therefore preventing dissection of the interplay between the rate of redox cofactor regeneration, the intracellular carbon flux distribution and the rate of carbon substrate uptake. In the present study, the relationship of the

intracellular NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios and metabolic flux analysis through the central carbon metabolism were analyzed in *A. vinelandii* cultures grown under oxygen-limiting and non-limiting conditions.

Results

DOT and OTR under oxygen-limiting and non-limiting conditions

The main purpose of this study was to understand the effect of the oxygen transfer rate (OTR) on the distribution of metabolic fluxes and the intracellular redox state (i.e. NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ ratios) in *A. vinelandii* growing under oxygen-limiting and non-limiting conditions. The dissolved oxygen tension (DOT) (a) and OTR (b) at 300, 500 and 700 rpm agitation rates in continuous cultivations at a dilution rate of 0.08 h⁻¹ are shown in Fig. 1. Due to the high oxygen consumption rate of *A. vinelandii*, under oxygen-limiting conditions (300 and 500 rpm), DOT levels remained close to zero during the steady-state growth (Fig. 1a). For the cultures conducted at 700 rpm, the average DOT was 11.4 ± 2.3% during the steady-state (between 50 and 96 h of cultivation). These results show that the cultures performed at 300 and 500 rpm resulted to be oxygen-limiting, whereas the cultures run at 700 rpm were not oxygen-limited.

The effect of agitation rate on the OTR profiles of chemostat cultures is shown in Fig. 1b. During the steady-state there is no oxygen accumulation ($dO_2/dt \approx 0$); therefore, the OTR is equal to the oxygen uptake rate (OUR). For all tested conditions, a maximum OTR value was reached at the steady-state, representing the maximum gas-liquid mass transfer capacity of the bioreactor system [28]. Specifically, the OTRs reached maximum values of 2.4 ± 0.03, 6.2 ± 0.05 and 14.3 ± 0.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ for 300, 500 and 700 rpm, respectively. This had an important effect on the specific oxygen uptake rate (q_{O_2}) (Table 1), which was up to 4.7-fold higher for the highest OTR condition with respect to that of the lowest OTR.

Glucose consumption, biomass, alginate and P3HB production

Cellular protein concentrations, residual biomass (CDW-P3HB), q_G , q_{Alg} and q_{P3HB} of cells growing at the steady-state under oxygen-limiting and non-limiting conditions are shown in Fig. 2. Similar cellular protein concentrations were obtained under the different OTR conditions (around 0.71 ± 0.06 g L⁻¹), as shown in Fig. 2a. Although the protein concentrations reached were very similar, the yields of protein with respect to the glucose consumed were different. The highest protein yield (0.15 g_{protein} g_{glucose}⁻¹) was obtained in the cultures developed under the lowest OTR (2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹). In contrast, the protein yield was 46% lower under non-limiting oxygen

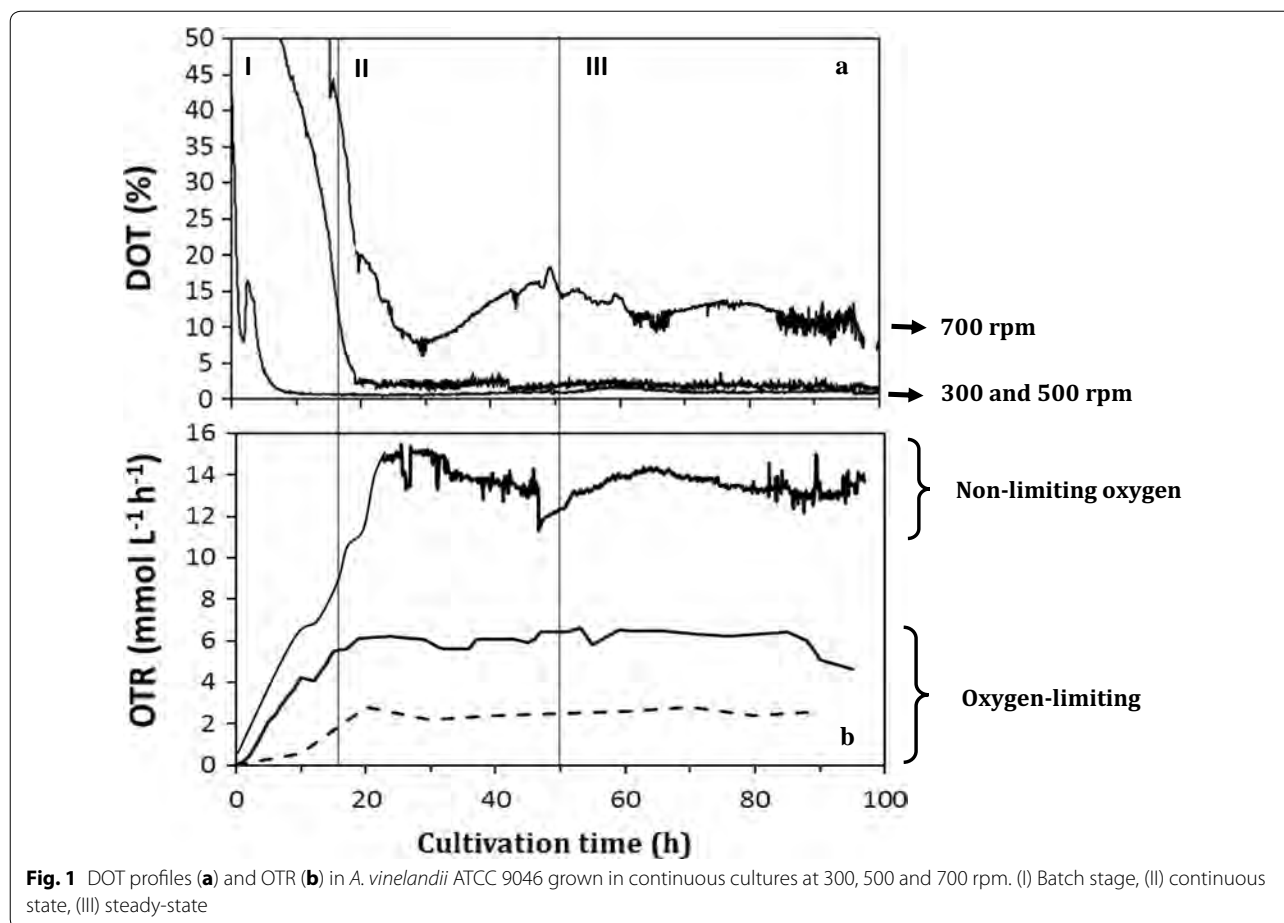


Table 1 Kinetic parameters during steady-state of *A. vinelandii* ATCC 9046, grown in continuous cultures ($D = 0.08 \text{ h}^{-1}$) under oxygen-limiting (300, 500 rpm) and non-limiting oxygen (700 rpm) conditions

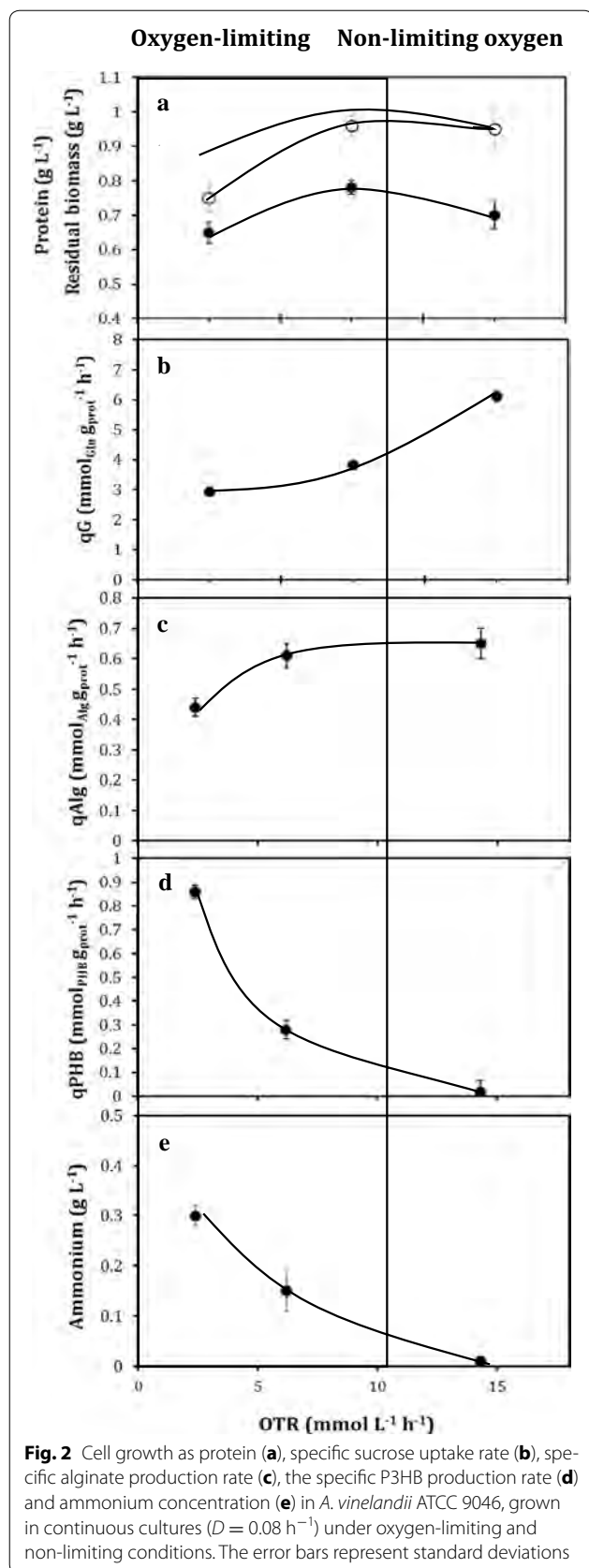
Agitation rate (rpm)	OTR _{max} (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{protein/glucose} (g g ⁻¹)	qO ₂ (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Alginate production		P3HB production	
				(g L ⁻¹)	Y _{Alg/prot}	(g L ⁻¹)	Y _{P3HB/prot}
300	2.4 ± 0.32	0.15 ± 0.02	3.7 ± 0.16	0.7 ± 0.08	1.01	0.75 ± 0.04	1.15
500	6.2 ± 0.57	0.11 ± 0.01	8.26 ± 0.24	1.18 ± 0.18	1.52	0.34 ± 0.05	0.43
700	14.3 ± 1.2	0.08 ± 0.02	20 ± 0.34	1.07 ± 0.15	1.50	0.05 ± 0.002	0.07

The biomass (X) corresponds to the residual

conditions (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹) (Table 1). This behavior was also observed for the yields based on residual biomass (Table 1).

The residual glucose concentrations in the steady-state were 3.5 ± 0.3, 5.5 ± 0.35 and 1.3 ± 0.2 g L⁻¹, for the OTR of 2.4, 6.2 and 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, respectively. Under similar conditions, Díaz-Barrera et al. [29] reported an affinity constant (K_s) for sucrose of 0.1 g L⁻¹. Therefore, the cultures were not limited by the carbon source. In addition, the ammonium concentration

in the steady-state under oxygen-limiting conditions (2.4 and 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹) was higher (Fig. 2e) than the K_s described for ammonium in *A. vinelandii* (0.11 g L⁻¹) [29]. Nevertheless, in cultures developed at 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, the ammonium concentration was close to zero (Fig. 2e), suggesting that these cultures were probably fixing atmospheric nitrogen. As shown in Fig. 2b, when the OTR was higher (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹), the q_G increased (twofold) to 6.12 ± 0.35 mmol g⁻¹ h⁻¹, while the q_G at the lowest OTR condition was



$2.9 \pm 0.2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, showing a close correlation with the values of qO_2 (Table 1).

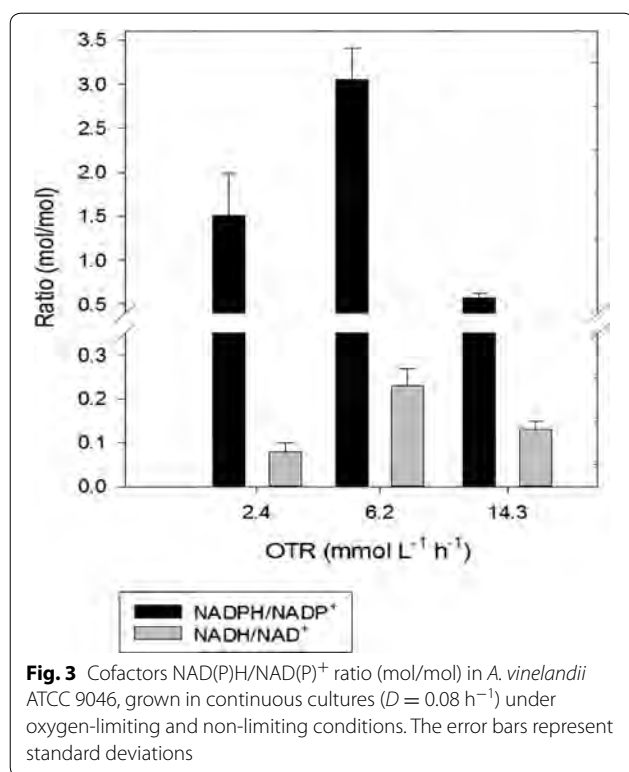
The alginate and P3HB productions under the steady-state at the different OTR tested are shown in Table 1. Under oxygen-limiting conditions, the alginate production increased when the OTR was higher, from $0.7 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$ at an OTR of $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, to $1.18 \pm 0.18 \text{ g L}^{-1}$ when the cultures were conducted at $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A further increase in the OTR under non-limiting oxygen conditions ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) did not increase alginate production (Table 1). Interestingly, the specific alginate production rate (q_{Alg}) was similar ($0.61 \pm 0.04 \text{ mmol g}_{\text{protein}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at the high OTR values (6.2 and 14.3); and this value was 35% higher than that achieved in cultures at $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($0.44 \pm 0.03 \text{ mol g}_{\text{protein}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

The P3HB production in *A. vinelandii* has been reported to be accumulated mainly under oxygen-limiting conditions [2, 30, 31]. Consistently, in this study the P3HB production was negatively correlated by the increase in OTR, as shown in Table 1. The highest P3HB concentration ($0.75 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$) was obtained in cultures developed at $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, whereas a value of $0.05 \pm 0.002 \text{ g L}^{-1}$ was obtained at the highest OTR ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Internal redox state, metabolic flux distribution and its corresponding gene expression

The NADH/NAD⁺ ratio in cells growing under steady state conditions was significantly lower (4- to 20-fold) than the NADPH/NADP⁺ ratio under all of the conditions tested (Fig. 3). In the cultures under oxygen-limiting conditions, the intracellular NADH/NAD⁺ molar ratio, increased from 0.08 (at an OTR of $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) to 0.23 mol/mol in cells grown at an OTR of $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Conversely, in cells grown at $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, the NADH/NAD⁺ decreased by 35%, in relation to the $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ condition. For the NADPH/NADP⁺ ratios, a similar response was obtained (Fig. 3). Under oxygen-limiting conditions, the ratio increased (83%) at $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, with respect to the NADPH/NADP⁺ ratio achieved at $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. For the steady-state under the non-limiting oxygen condition ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the NADPH ratio was 5.5- and 2.8-fold lower than that achieved in the cultures at 6.2 and $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively.

The metabolic flux distribution of cells growing at steady-state under the three oxygenation conditions was evaluated (Fig. 4). In the cultures carried out at an OTR of $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, the low consumption rate of the carbon source was reflected as a reduction in the relative flux of carbon towards central metabolism (ED, PP



pathway and TCA cycle) compared to the relative fluxes achieved under OTR of 6.2 and 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹. For example, for the lower OTR, the relative fluxes through P3HB biosynthesis were sixfold higher than at the highest OTR (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹). In contrast, when *A. vinelandii* was grown under the non-limiting oxygen conditions (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹), fluxes towards the PP pathway and TCA cycle increased, being 4.84- and 30-fold higher than in the cultures conducted at the lowest OTR (2.3 mmol L⁻¹ h⁻¹). Such an increase was further reflected in a higher flux to CO₂ production, which increased 7.4-fold at the highest OTR conditions. The distribution of the carbon usage in all of the evaluated conditions is shown in Table 2.

Figure 5 shows the influence of OTR on the transcription of genes coding for representative enzymes involved in central carbon metabolism (*akdh*, *idh* and *zwf*), the uncoupled respiratory chain (*ndhII* and *cydA*), alginate and P3HB biosynthesis (*algD* and *phbB*, respectively) and nitrogen fixation (*nifH*). No differences were observed in the expression levels of genes in central metabolism when comparing the cultures at OTRs of 2.4 and 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, but their expression was around twofold lower and 1.3-fold higher, respectively, than the reference condition (6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹). The expression level of *algD* was significantly lower (2.5-fold) in cultures developed at 2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹, compared to the cultures

developed at 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ (reference condition), according to the decrease in alginate production, which was from 1.18 ± 0.18 to $0.7 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$. The expression of this gene decreased 1.3-fold at the highest OTR (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹), although the alginate production was similar with respect to 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ (Table 1). To determine whether there was a relationship between the P3HB production and relative expression, the level of *phbB* transcript was evaluated. Figure 5 shows that under non-limiting oxygen conditions, the *phbB* transcription levels decreased by about 1.4- and 13.3-fold for the OTR of 6.2 and 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, respectively, in accordance with the decrease in P3HB production.

In the cultures at 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, where the protein yield was lower, the q_G was higher and the ammonium concentration was close to zero, the transcription levels of genes coding for components of the uncoupled respiratory chain (*cydA* and *ndhII*) were significantly induced with respect to the cultures developed under oxygen-limiting conditions. The *cydA* relative expression increased 30% when the OTR was 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ with respect to 2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹; however, an even higher induction was observed at 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ (2.3-fold). For the *ndhII* gene, the relative expression was also considerably induced (3.5-fold) at the highest OTR of 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ compared to the cultures developed at 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ (reference condition). The results suggest that at the highest OTR (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹), the alternative respiratory chain involved in the respiratory protection of the nitrogenase is highly expressed, in agreement with the very low ammonium concentration (nitrogen limitation). Therefore, the expression of the nitrogenase was determined. The transcription level of *nifH*, the first gene of the *nifHDK* operon, containing structural genes of the nitrogenase complex, was induced 23-fold in the cultures at 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹ (where the oxygen consumption was increased), in comparison with 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹. This behavior is schematically represented in Fig. 6.

Discussion

The results of the present study show, for the first time, that the OTR affects metabolic fluxes through the central carbon metabolism network and the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios, thereby pointing at a relationship of the redox state with the alginate and P3HB production in chemostat cultures of *A. vinelandii*. Previous studies with this bacterium conducted in shaken flasks, under high and low aeration conditions, showed that changes in oxygen availability had a considerable impact on the growth profiles, the alginate and P3HB yields and metabolic fluxes [27]. However, shaken flasks are not the most suitable growth system for the evaluation of metabolic fluxes,

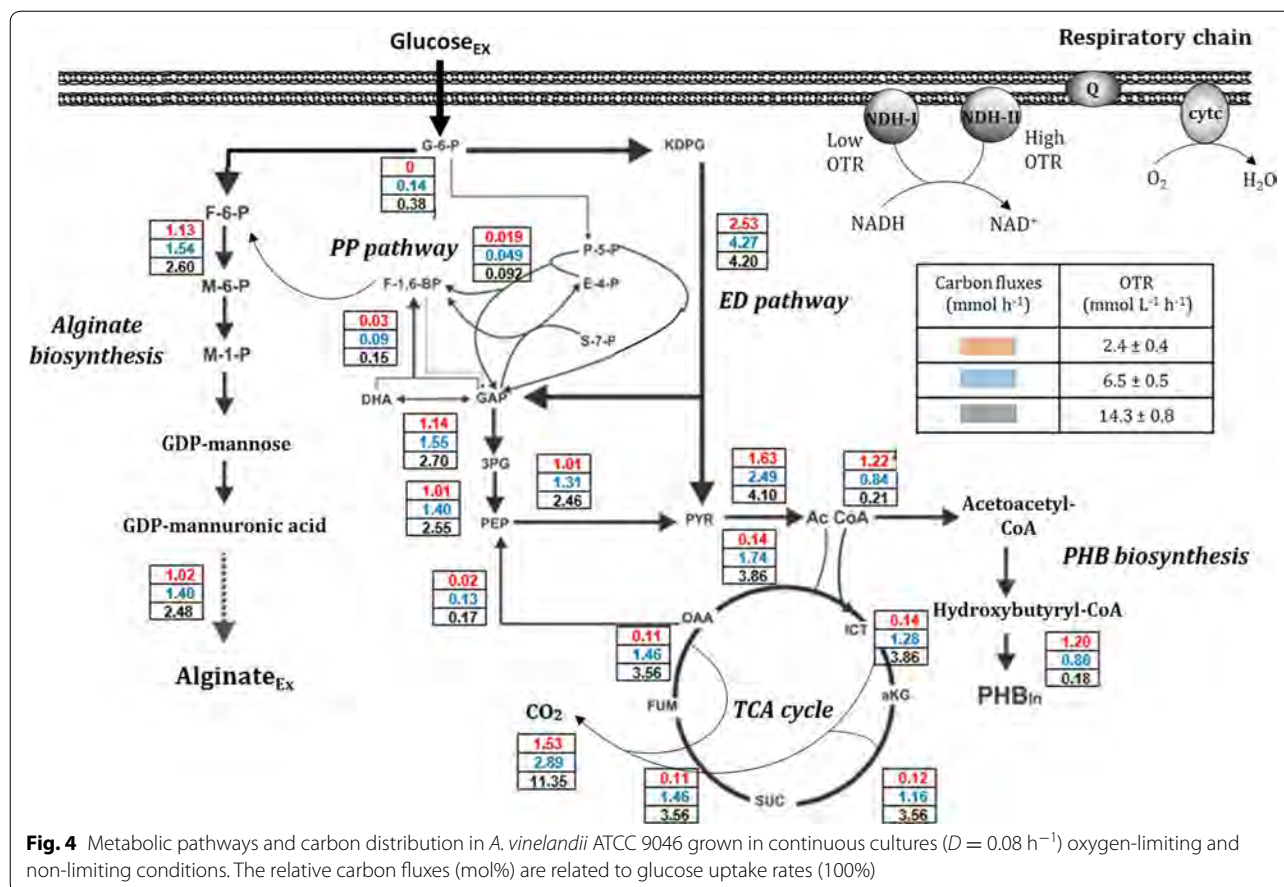


Table 2 % C-mole usage in *A. vinelandii* ATCC 9046, grown in continuous cultures ($D = 0.08 \text{ h}^{-1}$) under oxygen-limiting (2.4 and 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹) and non-limiting oxygen (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹) conditions

OTR _{max} (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	% C-mol biomass	% C-mol alginate	% C-mol P3HB	% C-mol CO ₂
2.4 ± 0.32	14.3	17.2	15.1	53.2
6.2 ± 0.57	11.7	18.4	4.3	65.6
14.3 ± 1.2	8.6	13.2	0.5	77.7

because several non-controlled culture parameters (e.g. pH, DOT) and most of the relevant variables, substrate, product, or biomass concentrations continuously vary. Therefore, in this study, the continuous culture mode was chosen, because it allows the specific growth rate to be fixed, allowing a strict comparison among different conditions at the steady-state and also to evaluate the concentrations of NADH, NADPH and metabolic fluxes.

The cellular protein yield was twofold higher in those cultures conducted under oxygen limitation (2.4 and 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹) compared to the cultivations conducted at the highest (non-limiting) OTR (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹), although the highest q_G and q_{O_2}

were obtained under this last condition (Table 1). These differences might be related to the protein synthesis (under high OTR) of the alternative uncoupled respiratory chain of *A. vinelandii*, which has been reported to be active under high oxygen concentrations [32] and in diazotrophic conditions, allowing the oxygen sensitive nitrogenase complex to be protected. The results of the present study are in agreement with the functioning of the uncoupled respiratory chain of *A. vinelandii* [32], because under the highest OTR condition, some of its protein components, such as NADH oxidoreductase II and cytochrome bd oxidases were clearly induced (Fig. 5), probably as a response to the high oxygen concentration.

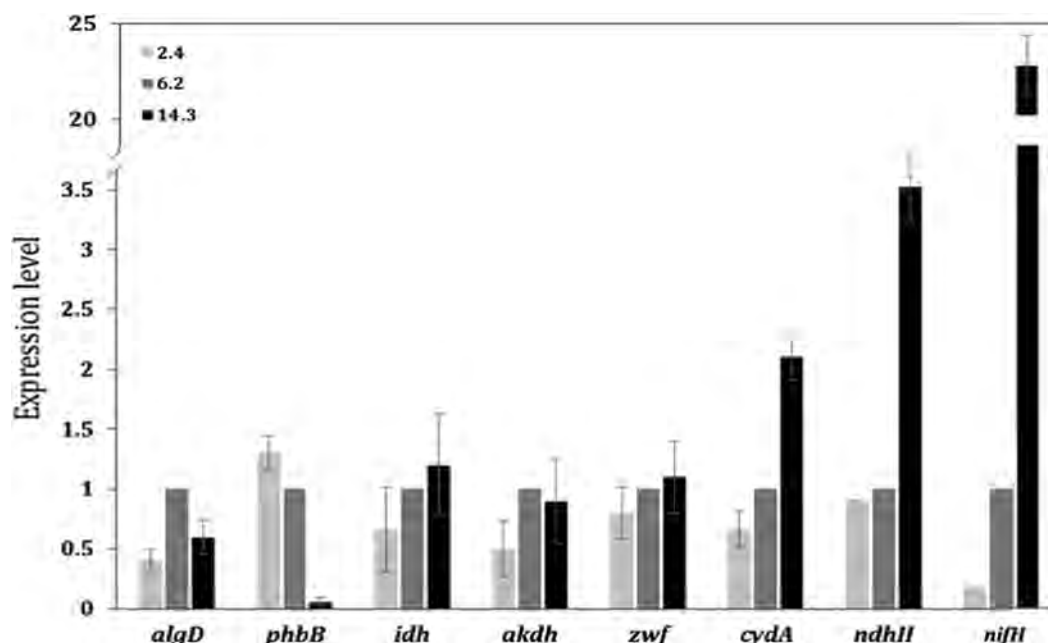
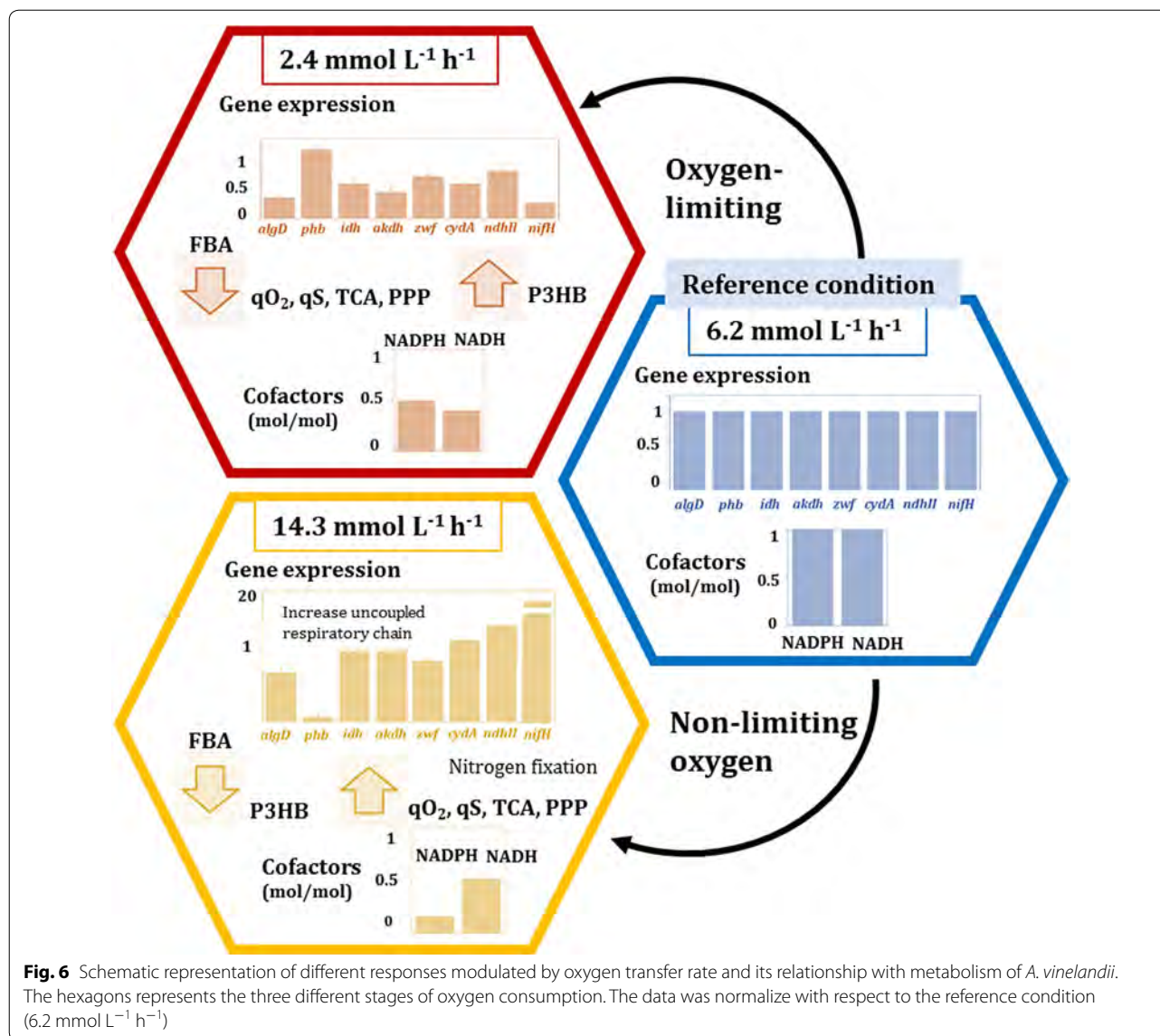


Fig. 5 Expression level of *algD* (encoding alginate biosynthesis), *phbB* (encoding P3HB biosynthesis), *idh*, *akdh* and *zwf* (genes involved in central carbon metabolism), *cydA* and *ndhII* (genes involved in alternative respiratory chain) and *nifH* (encoding nitrogenase) in *A. vinelandii* ATCC 9046, grown in continuous cultures ($D = 0.08 \text{ h}^{-1}$) oxygen-limiting and non-limiting conditions

This alternative respiratory chain has a high affinity for oxygen, but a low net ATP production [33]. These results, together with the analysis of carbon usage (% C-mol), suggest that the carbon source oxidized at higher oxygen consumption would be released as CO_2 (Table 2), consume less energy for cell growth, in agreement with our results for q_{O_2} , $Y_{\text{Protein/Glucose}}$ (Table 1) and q_G (Fig. 2b). On the other hand, this respiratory path is required under conditions of nitrogen fixation. This is in agreement with the requirement imposed by the NH_3 limitation observed in the cultures under no oxygen-limited conditions at $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ OTR (Fig. 2e) where the ammonium concentration was close to zero (Fig. 2e), suggesting that these cultures were probably fixing atmospheric nitrogen. Moreover, under this OTR condition, the transcription level of *nifH*, which is part of the *nifHDK* operon that encodes structural components of the nitrogenase system, was induced up to 60-fold with respect to its expression level at the lowest OTR condition. These results support the fact that *A. vinelandii* responds rapidly to nitrogen depletion under this condition by inducing the expression of nitrogenase; this is also related to the observed increase in the expression of the alternative uncoupled respiratory electron transport system that allows the nitrogenase to be protected under high oxygen transfer rates. As shown in Fig. 5, the relative transcription levels of *cydA* and *ndhII* (genes that encode the proteins cytochrome b and NADH dehydrogenase II of the

uncoupled respiratory chain) increased up to threefold at $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ compared to the cultivations developed at low OTR. It is also important to highlight that the enzymatic reduction of molecular nitrogen to ammonia requires high amounts of energy and reducing power (ATP and NADH) [34]. This explanation is supported by the fact that a higher relative metabolic flux through the TCA cycle and CO_2 production was determined in the cultivations conducted at $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4).

In addition, as shown in Fig. 4, other metabolic pathways affected by the availability of oxygen were: the pyruvate and acetyl-CoA generation points, and the pentose phosphate (PP) pathway. Moreover, these differences were further reflected on the fluxes through the alginate and P3HB biosynthesis pathways. However, we found that the expression of genes encoding central metabolism (*idh*, *akdh* and *zwf*) were similar under all of the conditions evaluated (Fig. 5). These results were inconsistent with the differences in carbon flux towards the central metabolism (PP pathway and TCA cycle). In the cultures at higher oxygen consumption ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the relative flux through the PP pathway was nearly 1.8- and 4.8-fold higher than the flux achieved in cultures at 6.2 and $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. A similar increase was observed in the metabolic fluxes towards alginate production when this bacterium was grown at high OTR (6.2 and $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) reaching the highest fluxes at $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Previous studies have shown that



when *A. vinelandii* is grown in continuous cultures, without DOT control (oxygen-limited), the alginate concentration can also be increased by increasing qO_2 [29, 35]. When the OTR, and therefore, the qO_2 increased, the carbon fluxes through alginate biosynthesis pathway also increased, from 1.1 at 2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹ to 2.6 when the OTR was 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹. These changes at the metabolic flux level are associated with the increase in q_{Alg} values, which increased from 0.45 mmol g⁻¹ h⁻¹ in cultures developed at the lowest OTR, to 0.6 mmol g⁻¹ h⁻¹ when the OTR was 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹. However, this value is the same in the cultures developed at 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ (Fig. 2c). These results suggest that changes in the cellular respiration (in the range from 6.2 to 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹) did not affect alginate biosynthesis. In contrast, Sabra

et al. [34] reported that the alginate could serve as a barrier to protect the nitrogenase system at high OTR and under diazotrophic conditions. One possible explanation for this behavior could be that, under non-limiting oxygen conditions (14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹), the energy demand (in the form of ATP) increased, for nitrogen fixation purposes, as well for the mechanism known as respiratory protection instead of being used to increase alginate biosynthesis [36]. The induction of *algD* gene transcription is a key point in regulation of the alginate synthesis pathway and is mediated by alginate switching and regulatory genes. In this study, we found that the transcription of the *algD* gene was higher at 6.2 mmol L⁻¹ h⁻¹ (Fig. 5) and these results were consistent with the higher alginate production under this condition. However, the alginate

production was similar in cultures at higher oxygen consumption ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) when the *algD* transcription level decreased.

On the other hand, the carbon fluxes towards P3HB production were considerably higher (sixfold) at the lowest OTR condition, in contrast to the flux through this pathway observed for those cultivations conducted at $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. These findings correlate with the q_{P3HB} which was 49-fold higher in those cultures conducted with an OTR of $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ compared to those developed at the highest OTR. Our results are consistent with previous studies showing that P3HB biosynthesis in *A. vinelandii* is a response to oxygen limitation and carbon excess [27]. As shown in Fig. 5, the *phbB* transcription levels increased at $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in correspondence with the higher production of P3HB observed under that condition. Several authors have proposed that NADPH concentration increases under oxygen-limiting conditions, thereby inhibiting the activities of the tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes, citrate synthase and isocitrate dehydrogenase. Subsequently, the inhibition of these TCA enzymes would cause an increase in the acetyl-CoA available to flux through the P3HB synthesis pathway [2, 37]. On the other hand, as shown schematically in Fig. 6, we observed a slight decrease in gene expression levels of the TCA enzymes ICTDH and α KGDH, in those cultivations conducted at the lowest OTR, as compared to these genes transcription levels at high OTR in agreement with the fluxes discussed.

In the present study, we observed that the internal redox state (reflected by the NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ ratios) was affected by changes in the OTR (Fig. 3). Additionally, it was observed that independently of the OTR tested, the NADH/NAD⁺ ratio was always significantly lower than the NADPH/NADP⁺ ratio. Under oxygen-limiting conditions (OTR = of $2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the NADPH/NADP⁺ ratio was half of that obtained in the cultures performed at $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. There is probably more NADPH regenerated at the intermediate oxygen-limiting condition than at extreme oxygen limitation, as we can see higher flux through the PP pathway (an important NADPH generation pathway) was higher (2.5-fold) when the OTR was $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

It is important to point out that the NADH cofactor is mainly generated in the central metabolic pathways [Entner–Doudoroff (ED) pathway, TCA cycle and alginate biosynthesis], being consumed mainly in the respiratory chains to produce energy in the form of ATP. Although the values of the NADH/NAD⁺ ratios achieved under the different conditions changed slightly with OTR (Fig. 3), they were always low. This could be due to fact that the NADH is rapidly consumed by the

respiratory chains, and a high proportion of the oxidized form NAD⁺ has to be preserved in order to favor oxidation of the carbon source; therefore, this intracellular ratio is low. Nevertheless, there were significant differences in the NADH/NAD ratios among the different cultivation conditions evaluated. It is known, that when the oxygen consumption rate increases, the total dinucleotide pool generated during the oxidation of glucose is consumed by the first protein complex of the respiratory chain [38]. Therefore, the intracellular ratio of this cofactor is expected to decrease as the OTR increases. It is important to point out that at an OTR of $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, the highest NADH/NAD ratio (0.23) was achieved, which is in agreement with an increase in the carbon fluxes through the alginate biosynthesis and TCA cycle, both of which are NADH regeneration pathways (Fig. 4). Therefore, it is possible that under this condition, alginate biosynthesis contributes to increase the NADH availability. On the other hand, when the OTR increased up to $14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, the *A. vinelandii* cells were not oxygen-limiting, but were exposed to nitrogen limitation conditions. Under these condition, although the carbon fluxes through the TCA cycle, and therefore for NADH production, were higher than under the other conditions evaluated, the electrons of cofactors (NADH and NADPH) could be consumed faster in the respiratory chains of *A. vinelandii* (the coupled and uncoupled) as part of the protection of the nitrogenase system under high oxygen concentrations [36], and it was reflected as a decrease in the NADH/NAD⁺ ratio (Fig. 6).

In *A. vinelandii*, the main NADPH producing pathways are the ED pathway, the isocitrate dehydrogenase step of the TCA cycle and PPP; these pathways allow a high NADPH/NADP⁺ ratio to be achieved [39]. The reduced form NADPH has a significant contribution during reductive biosynthetic reactions (fatty acids, amino acids and P3HB), and when *A. vinelandii* is exposed to high oxygen concentrations and nitrogen fixation, this cofactor could be directed through the uncoupled respiratory chain by NADH dehydrogenase II [32]. The above fact suggests that, the lower NADPH/NADP⁺ ratio observed in those cultivations conducted at the highest OTR could be due to an increase in NADH dehydrogenase II activity.

Conclusions

The NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺ cofactor pairs are involved in many biochemical reactions. In the case of *A. vinelandii*, it has been shown that changes in the oxygen availability have an important effect on the metabolic fluxes. Our results show that at the lowest OTR ($2.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the NAD(P)H levels were lower than those achieved at $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, probably due to a decrease in the carbon fluxes towards the

central metabolism (PP pathway and TCA cycle) and to an increase in P3HB biosynthesis. However, the decrease of these reduced cofactor pairs under non-limiting oxygen conditions ($14.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) compared to the condition at $6.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, might be due to the process of nitrogen fixation and the respiratory protection of *A. vinelandii* that this work shows being induced at high oxygen availability, which was associated with the nitrogen limitation that occurs under this condition.

Methods

Bacterial strain and culture medium

Azotobacter vinelandii wild-type strain ATCC 9046 was used. The strain was conserved at 29°C in Burk's nitrogen-free salts supplemented with 20 g L^{-1} of glucose [31]. The composition of the culture medium was as follows (in g L^{-1}): K_2HPO_4 0.66, KH_2PO_4 0.16, MOPS 1.42, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 0.2, MgSO_4 0.2, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0029, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.027 and $0.8 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The glucose concentration used for chemostat stage cultivation, was of 10 g L^{-1} . The initial pH was adjusted to 7.2 using 2 N NaOH .

Chemostat cultures

Continuous cultures were carried out in a 3 L Applikon bioreactor (Schiedam, Netherlands) with 2 L working volume. The bioreactor, was equipped with two Rushton turbines and aerated at 2 L min^{-1} (1.0 vvm). The cultivations were conducted at 300, 500 and 700 rpm and the pH was kept constant at 7.2 and it was controlled by the addition of 2 N NaOH . Temperature was maintained at 29°C . The DOT was measured using a polarographic oxygen probe (Applikon Schiedam, Netherlands). The continuous cultures were operated a dilution rate of 0.08 h^{-1} , this value corresponded to 80% of μ_{max} at 300 rpm. The values of μ_{max} were determined in batch cultivations at different agitation rates using the same culture conditions (pH 7.2, 29°C , 1.0 vvm). The steady-state condition was achieved after three residence times, when the protein and the glucose concentration remained constant ($\leq 5\%$ variation). Samples of cultures (50 mL) were withdrawn from the bioreactor for analytical measurements. All the experiments were conducted by triplicate and the mean value of these results was calculated and reported.

Analytical determinations

Cellular protein, glucose and ammonium concentration assessments

Microbial growth was evaluated through protein measurements using the Lowry method [40], with bovine serum albumin as standard, the residual biomass was

estimated by subtracting the P3HB content from the total biomass. Glucose concentration was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent [41]. Ammonium concentration was measured by the phenol-hypochlorite method, as described by Kaplan [42].

Poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) and alginate quantification

P3HB content was quantified by HPLC, after its conversion into crotonic acid. Firstly, the biomass was dried under vacuum at 60°C . For each sample, 3 mg of biomass was weighed in a 1.5 mL Eppendorf tube; 1 mL of H_2SO_4 was added, and the sample was heated at 90°C for 1 h. Subsequently, the sample was cooled at room temperature and diluted with Milli-Q water to concentrations within the range of the calibration curve. The P3HB quantification was performed using an HPLC system with an Aminex HPX-87H column ($300 \times 7.8 \text{ mm}$) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 50°C and using H_2SO_4 (7 mM) as the eluent with a flow rate of 0.65 ml min^{-1} . Crotonic acid was quantified using UV absorption at 220 nm. Commercial P3HB (Sigma-Aldrich), treated identically as the samples was used as standard. Alginate concentration was quantified gravimetrically by precipitation with 3 volumes of ice propanol. The precipitate was filtered ($0.22 \mu\text{m}$ Millipore filters) and dried at 85°C to constant weight [43].

Determination of the OTR/OUR and the specific oxygen uptake rate

Gas analysis was performed by online measurements of O_2 and CO_2 in the exit gas and compared with measurements taken of the inlet gas with a gas analyzer (Teledyne Instruments, USA). The following equation was applied to calculate OTR from the exit gas [44]:

$$\text{OTR} = \frac{V_G}{V_L V_N} (X_{in} - X_{out}) \quad (1)$$

V_G is the gas inlet flow rate (L h^{-1}), V_L the fermentation working volume (L), V_N the molar volume (L mol^{-1}), and X_{in} and X_{out} the mole fractions at the gas inlet and outlet, respectively. For chemostat cultures at constant DOT and for conditions of steady state, the OTR ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) is equal to the oxygen uptake rate (OUR) [45], and the equation used for determination of specific the oxygen uptake rate (q_{O_2}) was as follows:

$$q_{\text{O}_2} = \frac{\text{OUR}_{\text{max}}}{X_{\text{max}}} \quad (2)$$

where OUR_{max} ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was the maximum oxygen uptake rate and X_{max} (g L^{-1}) was the maximum protein concentration.

Measurements of the intracellular cofactors concentrations

Amounts of NAD⁺, NADH, NADP⁺, and NADPH were quantified by enzymatic methods [46]. These cofactors, were extracted and assayed using the EnzyChrom™ assay kit following the supplier's instructions (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). 12.6 mg of wet cells from cultures were immediately received in methanol (70% v/v) at – 50 °C for a rapid inactivation of the cellular metabolism [23]. The cell pellet was washed with cold PBS and resuspended with base or acid buffer (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) to extract the reduced or oxidized pyridine nucleotides [46]. The assays utilized glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase for NAD(H) and NADP(H) quantification respectively, at 565 nm (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

Flux balance analysis

The intracellular fluxes were determined by flux balance analysis (FBA), using substrate uptake rates and product formation rates by applying metabolite balancing, which is based on the stoichiometry of all reactions in the metabolic network [31]. The model developed for *A. vinelandii* included the metabolic network described in Table 3, based on the Entner–Doudoroff (ED) pathway, the pentose phosphate (PP) pathway, the TCA cycle, as well as the alginate and P3HB biosynthetic pathways. FBA simulations were performed using the OptFlux 3.3, an open-source and modular software for in silico metabolic engineering [47]. Maximizing cellular growth rate was used as the objective function for all FBA simulations.

Quantitative RT-PCR

Expression of *algD*, *phbB*, *cydA*, *ndhII* and *nifH* were measured by quantitative RT-PCR (*qRT-PCR*), as previously reported [48]. Total RNA extraction was performed as previously reported [49]. To eliminate genomic DNA, RNA was treated with DNase (DNA-free™, Ambion) and its concentration measured by 260/280 nm ratio absorbance. The cDNA was synthesized using 500 ng of DNase-treated total RNA, the Revert Aid™ H First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas), and a mixture of the specific DNA primers. The sequences of the primers used are listed in Table 4. The cDNA obtained was used as template for Real-Time PCR assays. The level of *gyrA* was used as an internal control to normalize the results. All assays were performed in triplicate. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method reported by Livak and Schmittgen [50]. The data are reported as relative expression levels by comparing expression levels in cultures developed at 6.2 and 14.3 mmol L⁻¹ h⁻¹, to the expression levels of reference value (culture developed at 2.4 mmol L⁻¹ h⁻¹).

Table 3 The components of the metabolic network used for flux calculation were as follows

v1a	GLC	→	G6P
v1b	G6P	→	F6P
v1c	F6P	→	GAP + DHA
v2	DHA	→	GAP
v3	GAP	→	c3PG
v4	c3PG	→	PEP
v5	PEP	→	PYR
v6	PYR	→	ACCOA + CO ₂
v7	PYR + CO ₂	→	OAA
v8	OAA	→	PEP + CO ₂
v9	G6P	→	P5P + CO ₂
v10	P5P	→	GAP + S7P
v10r	GAP + S7P	→	P5P
v11	GAP + S7P	→	cE4P + F6P
v11r	cE4P + F6P	→	GAP + S7P
v12	cE4P + P5P	→	GAP + F6P
v12r	GAP + F6P	→	cE4P + P5P
v13	OAA + ACCOA	→	ICT
v14	ICT	→	CO ₂ + aKG
v15	aKG	→	SUC + CO ₂
v16	SUC	→	FUM
v16r	FUM	→	SUC
v17	FUM	→	OAA
v18	ICT	→	SUC + GOX
v19	ACCOA + GOX	→	OAA
v20	G6P	→	KDPG
v21	KDPG	→	PYR + GAP
v22	F6P	→	MAN6P
v1ext	MAN6P	→	Alginate
v2in	ACCOA	→	P3HB_bio
vB_G6P	G6P	→	G6P_bio
vB_F6P	F6P	→	F6P_bio
vB_GAP	GAP	→	GAP_bio
vB_c3PG	c3PG	→	c3PG_bio
vB_PEP	PEP	→	PEP_bio
vB_PYR	PYR	→	PYR_bio
vB_ACCOA	ACCOA	→	ACCOA_bio
vB_OAA	OAA	→	OAA_bio
vB_aKG	aKG	→	aKG_bio
vB_P5P	P5P	→	P5P_bio
vB_cE4P	cE4P	→	cE4P_bio
vB_Biomass	0.0228 * c3PG_bio + 0.0024 * PEP_bio + 0.0012 * cE4P_bio + 7.0E-4 * G6P_bio + 0.0194 * OAA_bio + 0.2768 * ACCOA_bio + 0.0062 * P5P_bio + 0.0512 * PYR_bio + 0.0267 * aKG_bio	→	Biomass
vB_Bio-mass_ex	Biomass	→	Biomass_ex
vGlcinp	GLC	↔	GLC_ex
vAlgex	Alginate	↔	Alginate_ex
vexCO ₂	CO ₂	→	CO ₂ _ex

Table 4 Primers used for the quantitative RT-PCR

Gene	Forward primers (5'–3')	Reverse primers (5'–3')
<i>gyrA</i>	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT
<i>algD</i>	ACGTGGTCATTCCGATTCTC	GCGGGAAGTTGTAGTCCTTG
<i>phbB</i>	GGAAAATTCACCGTGATCG	CGTGTCGCAGACTTCAAA
<i>idh</i>	CCCGTGTCCGTAAGAATA	GCCGTAGAAATCACCGTTGT
<i>akdh</i>	TCAAGCATGTGGTCTGGTGT	GGAACAGCTCCTTCTTGTC
<i>zwf</i>	ATGATCCAGAACCACCTGCT	CCTTGAGCACCTTGACCTTC
<i>cydA</i>	CCTCCGAAGAGCAGATCAAG	GCAGACAAAACAGGATGAGCA
<i>ndhII</i>	GTGCGCAAGGTACCGTAGAG	GTAACCTGATGGGCAACCTG
<i>nifH</i>	TCGACAACAACTGCTGGTC	ACGATGGATTCTGCTTCGAC

Mathematical expressions

The specific glucose uptake rate (q_G) and specific alginate and P3HB production rate (q_P) in steady-state conditions were calculated as follows:

Specific glucose uptake rate

$$q_G = \frac{D(G_0 - G)}{X}$$

Specific alginate or P3HB production rate

$$q_P = \frac{DP}{X}$$

where D (h^{-1}) is the dilution rate, P (g L^{-1}) is the alginate or P3HB concentration, X (g L^{-1}) is a protein concentration, G_0 (g L^{-1}) is the glucose concentration in the feed medium, and G (g L^{-1}) is the residual glucose concentration.

Carbon usage determination

The % C-mol was calculated as the ratio of the C-mol of biomass and products and the C-mol of glucose assuming that the carbon source consumed was 100%. The C-mol of biomass results from the biomass elemental composition described as $\text{CH}_2\text{O}_{0.52}\text{N}_{0.16}$ ($24.6 \text{ g C-mol}^{-1}$). For alginate and PHB, the monomeric composition was considered: hydroxybutyric acid for PHB and mannuronic acid and acetyl groups for alginate. The following values were used: $24.6 \text{ g CDW} = 1\text{C-mol}$ for % C-mol biomass; $26.0 \text{ g hydroxybutyric acid} = 1\text{C-mol}$ for % C-molPHB; $32.3 \text{ g mannuronic} = 1\text{C-mol}$ for % C-molAlg; $21.5 \text{ g acetyl} = 1\text{C-mol}$ for % C-molAcetyl. The % C-mol of CO_2 was estimated as the difference between the 100% C-mol and the % C-mol used for the biomass and products.

Authors' contributions

AG performed the experimental work, data analysis and manuscript writing. PF and JA were involved in the analysis of metabolism fluxes and the critical revision of the manuscript. TM and DS were involved in the critical revision of the manuscript. CP supervised experimental work, data analysis and he was involved in the critical revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa Cuernavaca, Apdo. Post. 510-3, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico. ² Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Barcelona, Spain. ³ Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa Cuernavaca, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support obtained from CONACYT (28535) and DGAPA-UNAM (IT100513). We thank Dra. Celia Flores for technical assistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 10 August 2017 Accepted: 15 January 2018

Published online: 22 January 2018

References

- Galindo E, Peña C, Nuñez C, Segura D, Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact*. 2007;6:7.
- Peña C, Galindo E, Büchs J. The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochem*. 2011;46:230–57.
- Oelze J. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24:321–33.
- Post E, Kleiner D, Oelze J. Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen-controlled continuous culture. *Arch Microbiol*. 1983;134:68–72.
- Richard A, Margaritis A. Rheology, oxygen transfer and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82:299–305.
- Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *J Biochem Eng*. 2004;17:187–94.
- Díaz-Barrera A, Peña C, Galindo E. The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microb Biotechnol*. 2007;76:903–10.
- Díaz-Barrera A, Silva P, Avalos R, Acevedo F. Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O_2 transfer rate in chemostat cultures. *Biotechnol Lett*. 2009;31(6):903–10.

9. Lozano E, Galindo E, Peña C. The quantity and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions are determined by the maximal oxygen transfer rate (OTR_{max}). *Microb Cell Fact*. 2011;10:1–13.
10. Gómez-Pazarín K, Flores C, Castillo T, Buchs J, Galindo E, Peña C. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in *Azotobacter vinelandii* cultures in shake flasks under low power input. *J Chem Technol Biotechnol*. 2016;91:1485–92.
11. Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng*. 2002;4:217–29.
12. Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. The effect of manipulating NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metab Eng*. 2002;4:230–7.
13. Sanchez AM, Bennett GN, San KY. Effect of different levels of NADH availability on metabolic fluxes of *Escherichia coli* chemostat cultures in defined medium. *J Biotechnol*. 2005;117:395–405.
14. De Felipe FL, Kleerebezem M, de Vos WM, Hugenholtz J. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J Bacteriol*. 1998;180:3804–8.
15. Fu J, Wang Z, Chen T, Liu W, Shi T, Wang G, Tang YJ, Zhao X. NADH plays the vital role for chiral pure d-(–)-2,3-butanediol production of *Bacillus subtilis* under limited oxygen conditions. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111:2126–31.
16. Bao T, Zhang X, Zhao X, Rao Z, Yang T, Yang S. Regulation of the NADH pool and NADH/NADPH ratio redistributes acetoin and 2,3-butanediol proportion in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol J*. 2015;10:1298–306.
17. Heux S, Cachon R, Dequin S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab Eng*. 2006;8:303–14.
18. Henriksen CM, Christensen LH, Nielsen J, Villadsen J. Growth energetics and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J Biotechnol*. 1996;45:149–64.
19. Obanye AIC, Hobbs G, Gardner DCJ, Oliver SG. Correlation between carbon flux through the pentose phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiol-ogy*. 1996;142:133–7.
20. Lim SJ, Jung YM, Shin HD, Lee YH. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J Biosci Bioeng*. 2002;93:543–9.
21. Choi JC, Shin HD, Lee YH. Modulation of 3-hydroxyvalerate molar fraction in poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) using *Ralstonia eutropha* transformant co-amplifying *phbC* and NADPH generation-related *zwf* genes. *Enzyme Microb Technol*. 2003;32:178–85.
22. Lee JN, Shin HD, Lee YH. Metabolic engineering of pentose phosphate pathway in *Ralstonia eutropha* for enhanced biosynthesis of poly-β-hydroxybutyrate. *Biotechnol Prog*. 2003;19:1444–9.
23. Centeno-Leija S, Utrilla J, Flores N. Metabolic and transcriptional response of *Escherichia coli* with a NADP⁺-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013;104(6):913–24.
24. Tatnell P, Russell N, Gacesa P. GDP-mannose dehydrogenase in the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from metabolite studies. *Microbiology*. 1994;140:1745–54.
25. Snook CF, Tipton PA, Beamer LJ. Crystal structure of GDP-mannose dehydrogenase: a key enzyme of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 2003;42:4658–68.
26. Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA. The role of oxygen limitation in the formation of poly-3-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J*. 1972;128:1193–201.
27. Castillo MT, Heinzle E, Peifer S, Schneider K, Peña C. Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochem*. 2013;48:995–1003.
28. Maier U, Losen M, Büchs J. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochem Eng J*. 2004;17:155–67.
29. Díaz-Barrera A, Soto E, Altamirano C. Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39:613–21.
30. Noguez R, Segura D, Moreno S, Hernández A, Juárez K, Espín G. Enzyme INtr, NPR and IANtr are involved in regulation of the poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;15:244–54.
31. Castillo MT, Galindo E, Peña C. The acetylation degree of alginates in *Azotobacter vinelandii* ATCC9046 is determined by the dissolved oxygen and the specific growth rate: studies in glucose-limited chemostat cultivations. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013;40:715–23.
32. Bertsova YV, Bogachev AV, Skulachev VP. Noncoupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Azotobacter vinelandii* is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations. *J Bacteriol*. 2001;183:6869–74.
33. Linkerhäger K, Oelze J. Nitrogenase activity and regeneration of the cellular ATP pool in *Azotobacter vinelandii* adapted to different oxygen concentrations. *J Bacteriol*. 1996;179:1362–7.
34. Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;56:315–25.
35. Díaz-Barrera A, Maturana N, Pacheco-Leyva I, Martínez I, Altamirano C. Different responses in the expression of alginases, alginate polymerase and acetylation genes during alginate production by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-controlled conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2017;1:1–11.
36. Inomura K, Bragg J, Follows MJ. A quantitative analysis of the direct and indirect costs of nitrogen fixation: a model based on *Azotobacter vinelandii*. *ISME J*. 2017;11:166–75.
37. Sabra W, Zeng AP, Sabry S, Omar S, Deckwer WD. Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;52:773–80.
38. Bertsova YV, Bogachev AV, Skulachev VP. Two NADH: ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in respiratory protection. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1363:125–33.
39. Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, Kengen SW. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front Microbiol*. 2015;6:742.
40. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–75.
41. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 1959;31:426–8.
42. Kaplan A. The determination of urea, ammonia and urease. *Methods Biochem Anal*. 1969;17:311–24.
43. Peña C, Trujillo-Roldán M, Galindo E. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol*. 2000;27:390–8.
44. Zeng AP, Byun T, Posten C, Deckwer WD. Use of the respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*. 1994;19:1107–14.
45. Stanbury PF, Whitaker A, Hall S. Principles of fermentation technology. Oxford, United Kingdom: Butterworth Heinemann; 2003. p. 360.
46. Bergmeyer H. Methods of enzymatic analysis, vol. 2. 3rd ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1985. p. 1047–64.
47. Rocha I, Maia P, Evangelista P, Vilaça P, Soares S. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. *BMC Syst Biol*. 2010;4:45–56.
48. Flores C, Moreno S, Espín G, Peña C, Galindo E. Expression of alginases and alginate polymerases in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microbiol Technol*. 2013;53:85–91.
49. Barry T, Geary S, Hannify S, MacGearailt C, Shaloo M, Heery D. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:4940.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-CT method. *Methods*. 2001;25:402–8.