



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO BAJO
CONDICIONES DE MICROAEROFILIA SOBRE EL PESO MOLECULAR DEL POLI-3-
HIDROXIBUTIRATO (P3HB) EN LAS CEPAS MUTANTES *phbZ1⁻* Y *OP* DE
Azotobacter vinelandii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
ELSA ANTONIETA GÓMEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Carlos Felipe Peña Malacara
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Daniel Segura González
Dr. Alfredo Martínez Jiménez
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Mor., Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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 beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 855776. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, a través del proyecto AG200219.

Además se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a los estudios de Posgrado (PAEP), con el cual fue posible atender al XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Índice

RESUMEN	1	5. OBJETIVO.....	18
1. INTRODUCCIÓN	2	5.1 Objetivos particulares.....	18
2. ANTECEDENTES.....	3	6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
2.1 POLI-3-HIDROXIBUTIRATO.....	3	7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.2 APLICACIONES DEL P3HB.....	4	7.1 Mantenimiento de la cepa, medio de cultivo y producción del inóculo.	21
2.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE P3HB	4	7.2 Cultivos en matraces agitados.....	21
2.4 <i>Azotobacter vinelandii</i>	5	7.3 Cultivos lote en biorreactor	22
2.5 Biosíntesis y metabolismo del P3HB	7	7.4 Métodos analíticos	22
2.6 IMPORTANCIA DEL PESO MOLECULAR DEL P3HB	9	7.4.1 Determinación de biomasa por peso seco.....	22
2.7 Efecto de las condiciones de cultivo sobre el peso molecular del P3HB	10	7.4.2 Determinación de proteína total	23
2.7.1 Contenido de P3HB en el inóculo	10	7.4.3 Determinación de sacarosa por el método de β-fructofuranosidasa-DNS.....	24
2.7.2 Efecto del oxígeno disuelto sobre la síntesis del P3HB	11	7.4.4 Cuantificación del contenido de P3HB en la biomasa.....	25
2.8 Enzimas involucradas en la síntesis y degradación de P3HB.....	13	7.4.5. Extracción del P3HB.....	26
2.8.1 β-cetotiolasa	13	7.4.7 Obtención del extracto libre de células para análisis enzimáticos.....	27
2.8.2 Acetoacetyl-CoA reductasa.....	14	7.5 Análisis enzimáticos.....	27
2.8.3 P3HB sintasa	15	8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
2.8.4 Depolimerasa y su papel en el peso molecular del biopolímero	17	CONCLUSIONES	70
3. JUSTIFICACIÓN.....	18	PERSPECTIVAS	71
4. HIPÓTESIS.....	18	BIBLIOGRAFÍA.....	72
		ANEXO 1	77

Resumen

El polihidroxiбутирато (P3HB) es un biopolímero de la familia de los polihidroxiálcanoatos y es producido por una gran variedad de microorganismos, entre ellos *Azotobacter vinelandii*. El P3HB tiene características similares a las de los plásticos derivados de la industria petroquímica, sin embargo, su uso se ha enfocado en el campo de la biomedicina, debido a que es un polímero totalmente biodegradable y biocompatible. Las propiedades termomecánicas y la biodegradabilidad del P3HB están determinadas por el peso molecular del polímero. En estudios recientes se ha reportado que, en condiciones de limitación de oxígeno (1% oxígeno disuelto), se producen polímeros de alto peso molecular ($> 1,000$ kDa). El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en el peso molecular del P3HB sintetizado por *A. vinelandii* en condiciones de baja transferencia de oxígeno (microaerofilia). Se utilizó como control la cepa OP, la cual contiene una mutación en el gen *algU* (regulador transcripcional que regula positivamente la biosíntesis de alginato), por lo que, al no producir alginato se considera una cepa sobreproductora de P3HB. Se utilizó la cepa *phbZ1*⁻, derivada de la cepa OP, la cual es mutante para la enzima depolimerasa más abundante de *A. vinelandii*. Se encontró que, en cultivos en matraces agitados, el peso molecular promedio (PMP) del P3HB para la cepa OP es mayor ($\sim 3,000$ kDa) en una condición de cultivo de baja aireación (200 mL de volumen de llenado) comparado con el alcanzado en la condición de mayor aireación (100 mL de volumen de llenado), el cual fue de $\sim 1,000$ kDa. En el caso de la cepa mutante *phbZ1*⁻, el PMP es menos dependiente de la transferencia de oxígeno, alcanzando un peso molecular máximo en el intervalo de 3,300-4,300 kDa en las dos condiciones de cultivo evaluadas. Por otra parte, en cultivos en biorreactor de 3 L, el PMP alcanzado fue significativamente mayor que el producido en cultivos en matraces. El peso molecular del P3HB fue mayor en condiciones de muy baja transferencia de oxígeno ($3.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) utilizando una agitación de 240 rpm con la cepa *phbZ1*⁻, alcanzando un PMP en el intervalo de 10,200 a 11,000 kDa, por primera vez reportado para *A. vinelandii* y considerados de ultra-alto peso molecular ($>4,000$ kDa). En la condición de 300 rpm ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), se produjeron polímeros de aproximadamente 8,300 kDa para la cepa OP y 9,400 kDa para la cepa *phbZ1*⁻. En condiciones de más alta transferencia de oxígeno ($8\text{-}11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) el PMP para la cepa *phbZ1*⁻ fue de 4,800 kDa mientras que para la cepa OP fue de 3,500 kDa. En el presente estudio se incluyeron análisis de las enzimas involucradas en el ciclo de biosíntesis del P3HB, encontrándose que los polímeros de mayor peso molecular fueron sintetizados bajo una actividad combinada de un aumento en la actividad sintasa y una baja actividad depolimerasa.

1. Introducción

En los últimos años se ha incrementado el interés por producir polímeros biodegradables que puedan sustituir a los poliésteres termoplásticos provenientes del petróleo (Peña *et al.*, 2014). Existen microorganismos con la capacidad de sintetizar y acumular este tipo de poliésteres como reserva energética.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres biodegradables y biocompatibles que pueden tener múltiples aplicaciones en el campo de la medicina, resultando en un producto de alto valor agregado (Williams & Martin, 2005).

Existen más de 300 especies de bacterias productoras de PHAs. La bacteria *Azotobacter vinelandii* produce poli-3-hidroxi-3-butanato (P3HB), un poliéster intracelular de la familia de los polihidroxialcanoatos (PHAs) (Diaz-Barrera & Soto, 2010) constituido por monómeros de 3-hidroxi-3-butanato unidos por medio de enlaces éster (Chen, 2009).

El P3HB es acumulado cuando el crecimiento bacteriano se limita por la disminución de nitrógeno, fósforo u oxígeno y cuando hay un exceso de fuente de carbono presente; por lo que, sirve como almacenamiento de carbono y energía para la bacteria. Es importante señalar que el peso molecular del P3HB determina el comportamiento elástico, la resistencia mecánica y el grado de cristalinidad del material. Por otro lado, la velocidad de degradación del bioplástico se ve afectada por el tamaño de las moléculas del P3HB, ya que a un mayor peso molecular, menor será la velocidad de degradación (Peña *et al.*, 2011). Por lo que se debe buscar la producción de un bioplástico cuyo peso molecular sea adecuado para la aplicación final del producto. Se ha logrado producir P3HB en cultivos en biorreactor utilizando diferentes cepas de *A. vinelandii* como modelo de estudio. Sin embargo, existen pocos estudios que se hayan enfocado sobre el impacto que tienen las condiciones de transferencia de oxígeno sobre el peso molecular del polímero obtenido. En este trabajo se desea estudiar el papel que tiene el oxígeno, bajo condiciones de microaerofilia, como modulador de la síntesis y degradación del polímero y su peso molecular.

2. Antecedentes

El consumo creciente de plásticos a nivel mundial (~ 320 millones de toneladas anuales) es un problema ambiental debido a la acumulación de estos materiales en las tierras y océanos (Lebreton *et al.*, 2018) convirtiéndose en un problema de contaminación. Una de las alternativas para resolver este problema puede ser el uso de plásticos biodegradables, tales como los polihidroxicanoatos (PHAs). Los PHAs tienen la ventaja sobre los plásticos convencionales de ser reconocidos como completamente biosintéticos y biodegradables, produciendo nulos residuos tóxicos y siendo completamente reciclables como residuos orgánicos (Ghosh *et al.*, 2019).

2.1 Poli-3-hidroxi-butirato

El poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) es un polímero de la familia de los polihidroxicanoatos. El P3HB es un poliéster alifático compuesto por monómeros de 3-hidroxi-butirato, los cuales se unen a través de la formación de un enlace éster del grupo carboxilo de un monómero con el grupo hidroxilo del monómero vecino.

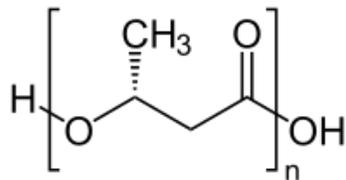


Figura 1. Estructura química del monómero del P3HB.

Este polímero es acumulado intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión denominados gránulos o carbonosomas (Jendrossek & Pfeiffer, 2014). El P3HB comienza a sintetizarse cuando el crecimiento bacteriano se limita por la disminución de nitrógeno, fósforo u oxígeno, y cuando hay un exceso de fuente de carbono presente. Se conoce que el P3HB acumulado sirve como almacenamiento de carbono y energía así como receptor de electrones, al cual se puede canalizar el exceso de poder reductor (Senior & Dawes, 1973).

El P3HB tiene características termomecánicas similares a las de los plásticos convencionales derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno, con la ventaja de que puede ser sintetizado a partir de fuentes de carbono renovables (Laycock *et al.*, 2014). Las

propiedades que le confieren gran relevancia para ser sustituto de los plásticos convencionales son dos: es un polímero totalmente biodegradable (puede ser asimilado por muchos microorganismos del suelo, de mares, lagos o aguas residuales) y también es completamente biocompatible, es decir, no es tóxico para organismos superiores (Chen, 2009).

La biodegradabilidad del polímero depende también de su estructura química, debido a la disponibilidad del enlace éster que une a los monómeros de P3HB, el cual, bajo ciertas condiciones ambientales puede ser hidrolizado. Por otro lado, una gran diversidad de microorganismos presentes en el ambiente puede secretar enzimas PHA depolimerasas extracelulares, estas enzimas son las encargadas de catalizar la hidrólisis del enlace éster y liberar moléculas de 3-hidroxi butirato para ser asimiladas como fuente de carbono (Numata *et al.*, 2009).

2.2 Aplicaciones del P3HB

Debido a su biocompatibilidad, el P3HB es un producto ideal para su uso en las áreas biomédica y farmacéutica, por lo que, las características químicas y la pureza del producto son de gran importancia (Peña *et al.*, 2014). Hasta ahora, el P3HB es empleado como pegamento médico, material de sutura, mallas quirúrgicas, hisopos, vendajes, sistemas de encapsulamiento de fármacos de liberación prolongada; así como también puede ser utilizado en aplicaciones biomédicas, resultando en un producto de alto valor agregado. Un ejemplo sería la producción de membranas con microestructura controlada que funcionan como andamios o soportes para la ingeniería de tejido cardiovascular, nervioso, óseo y cartilaginoso o de regeneración dérmica, así como para la generación prótesis (Chen & Wang, 2013; Williams & Martin, 2005).

2.3 Microorganismos productores de P3HB

El P3HB y otros PHAs son producidos por más de 300 especies de microorganismos, principalmente bacterias. Sin embargo, solo algunos de ellos acumulan suficiente P3HB para su producción a gran escala (Peña *et al.*, 2014). Entre los microorganismos que acumulan una gran cantidad de PHB son *Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata*, *Pseudomonas*

oleovorans, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Paracoccus denitrificans*, *Methylobacterium extorquens*, *Bacillus spp* y *Azotobacter vinelandii*. También se han generado bacterias recombinantes (*E. coli*) que expresan los genes biosintéticos para P3HB de *C. necator*, *A. lata* o *A. vinelandii* (Peña *et al.*, 2014) y que son capaces de acumular hasta 80 % de P3HB con una concentración celular de 31 g L⁻¹ (*E. coli* 6576) , siendo también una alternativa competitiva para la producción industrial de este polímero (Kim, 2000).

En el grupo de investigación en Ingeniería de Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha utilizado *Azotobacter vinelandii* como modelo de estudio debido a la capacidad de la bacteria para acumular naturalmente alrededor de un 80 % de P3HB con respecto al peso seco de la célula (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2007; García *et al.*, 2014) y producir P3HB de ultra-alto peso molecular (> 4,000 kDa) (Chen *et al.*, 1994).

2.4 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter es un género bacteriano perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* del subgrupo de las γ -proteobacterias. *A. vinelandii* es una bacteria Gram-negativa, móvil, con flagelos peritricos, que tiene como hábitat natural los suelos y las aguas continentales (Setubal *et al.*, 2009). El tamaño de la bacteria puede estar entre 1.5 y 2 μ m de diámetro y se considera pleomórfica, ya que su morfología varía desde bacilos hasta cocos. Se le puede encontrar como células individuales, en pares, o como agregados irregulares de forma y tamaño variables. El metabolismo de *A. vinelandii* es quimioorganotrófico y aerobio; sin embargo, puede crecer en concentraciones bajas de oxígeno. Esta bacteria se reproduce por fisión binaria y es poliploide (contiene varias copias de su cromosoma) (Maldonado *et al.*, 1994).

Este microorganismo ha sido de particular interés debido a sus características metabólicas.

- 1) Es capaz de fijar nitrógeno atmosférico en presencia de oxígeno (diazotrofia) (Röckel *et al.*, 1983).
- 2) Posee la mayor tasa respiratoria que se conozca para una bacteria en condiciones de diazotrofia, es diez veces mayor que la de *E. coli* (Setubal *et al.*, 2009).
- 3) Produce dos polímeros de interés comercial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato (P3HB).
- 4) Experimenta un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación (Sadoff, 1975).

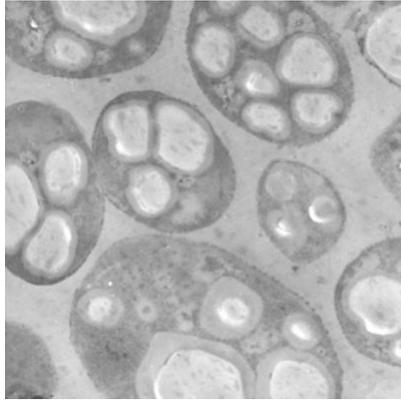


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de *A. vinelandii* conteniendo gránulos de P3HB (inclusiones blancas). Tomado de Peña *et al.*, (2014).

A. vinelandii posee tres distintas nitrogenasas con diferentes metales como sus cofactores (Premakumar *et al.*, 1984). Estas enzimas le permiten a la bacteria crecer cuando uno u otro metal esencial está ausente (Bellenger *et al.*, 2011; Pau, 1993) e incluso a diferentes temperaturas (Walmsley & Kennedy, 1991). Al crecer en un ambiente limitado en hierro, esta especie bacteriana produce un pigmento verde neon muy característico, un compuesto sideróforo difusible llamado azotobactina (Fekete *et al.*, 1983) sin embargo, también produce muchos otros compuestos sideróforos (Cornish & Page, 1998).

Por otro lado, *A. vinelandii* puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono, incluyendo alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares (Harris, 1946). Esta versatilidad plantea la posibilidad de utilizar fuentes de carbono, no refinadas y de bajo costo, tales como melazas y extractos de maltas, como sustrato para procesos biotecnológicos, especialmente para la producción de bioplásticos (Page, 1989, 1992).

2.4.1 Cepas modificadas de *A. vinelandii* (OP y phbZ1⁻)

El regulador transcripcional *algU*, presente en el genoma de *A. vinelandii*, controla la expresión del gen *cydR*, el cual es un represor de los genes de la cadena respiratoria alternativa y del operón de biosíntesis de P3HB (Wu *et al.*, 2001); además *algU* regula positivamente la biosíntesis de alginato (Núñez *et al.*, 2000). La inactivación de *algU* en esta bacteria dio origen a la cepa denominada OP (utilizada en el presente estudio), la cual es incapaz de sintetizar el polímero alginato; sin embargo, se convirtió en sobreproductora del biopolímero P3HB ya que se ha demostrado que, en cultivos en biorreactor la acumulación

del poliéster puede llegar a ser hasta del 80% del peso seco de la bacteria (García *et al.*, 2014; Millán *et al.*, 2016).

Se ha encontrado que *A. vinelandii* contiene siete genes que pueden codificar para depolimerasas (Adaya *et al.*, 2018). En el grupo de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología se generó una cepa mutante, derivada de la cepa OP, la cual tiene suprimida una secuencia (*Avin03910*) que codifica para la una de las siete P3HB depolimerasas (*PhbZ1*), en este caso la de mayor abundancia en los gránulos de P3HB (Adaya *et al.*, 2018). Esta cepa, denominada *phbZ1*⁻ (también utilizada en este estudio), tiene un fenotipo de sobreproducción de P3HB en biorreactores, debido a que no degrada el polímero durante la fase estacionaria de crecimiento; esta mutación evita que la bacteria degrade el polímero al final del cultivo y se vea comprometido el peso molecular.

2.5 Biosíntesis y metabolismo del P3HB

El ciclo del P3HB en *A. vinelandii* involucra dos etapas: síntesis y degradación. La primera es la etapa de síntesis, la cual se lleva a cabo por tres enzimas a partir de acetil-CoA, formado a partir del catabolismo de glucosa a través de la vía Entner-Doudoroff. Se sabe que, bajo condiciones de limitación de oxígeno y exceso de fuente de carbono, los niveles de NADH incrementan, inhibiendo las actividades de las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés) y por lo tanto, los niveles de acetil-CoA incrementan, iniciando la síntesis de P3HB (Senior & Dawes, 1973).

La condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA es catalizada por la enzima β -cetotiolasa. Posteriormente, se forma β -hidroxibutiril-CoA por la acción de la enzima acetoacetil-CoA reductasa y la polimerización de β -hidroxibutiril-CoA con la liberación de CoASH es catalizada por la PHB sintasa (Verlinden *et al.*, 2007) (Figura 3).

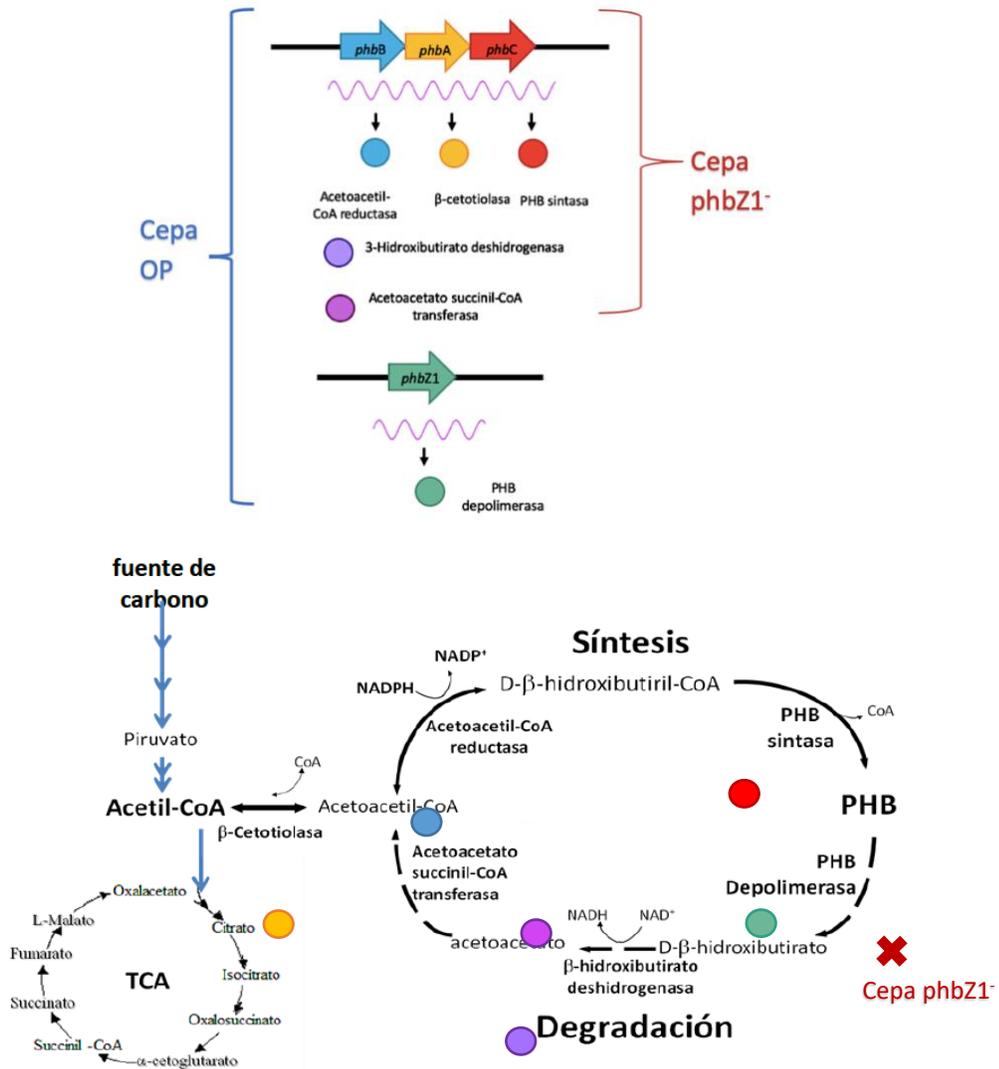


Figura 3. Ruta de biosíntesis y degradación del P3HB (Adaptado de Dawes, 1988). La cepa OP posee todos los genes que codifican para las enzimas involucradas en el ciclo de síntesis y degradación del P3HB, mientras que la cepa *phbZ1*⁻ tiene una mutación en el gen *Avin03910*, que codifica para la depolimerasa PhbZ1.

Los genes que codifican para estas tres enzimas de biosíntesis están incluidos en el operón *phbBAC*. Los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* codifican para la β -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la P3HB sintasa, respectivamente (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2000).

Cuando la fuente de carbono externa se agota, inicia la segunda etapa, que corresponde a la degradación o movilización intracelular del biopolímero para la generación de energía y precursores biosintéticos.

La degradación del P3HB comienza cuando el biopolímero se fracciona en moléculas de 3-hidroxi-butirato. Esta reacción es catalizada por la enzima P3HB depolimerasa. En la siguiente reacción, el 3-hidroxi-butirato, es oxidado por la enzima hidroxibutirato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, obteniéndose acetoacetato. Finalmente, la enzima acetoacetato-succinil-CoA transferasa convierte el acetoacetato en acetoacetyl-CoA, que es convertido por la enzima β -cetotilasa en acetyl-CoA para ser utilizado en el TCA (Figura 3).

Se han realizado estudios con modelos biológicos diferentes a *A. vinelandii*, en los cuales se han evaluado las actividades de las enzimas involucradas en la biosíntesis de P3HB. En el caso de *Methylosinus trichosporium* IMV3011, se observó que la actividad de la P3HB sintasa se incrementó con la producción de P3HB y que los cambios de las actividades enzimáticas de la P3HB sintasa y la P3HB depolimerasa ocurrieron al mismo tiempo, lo que indicó que la polimerización y depolimerización del P3HB intracelular ocurre de forma simultánea (Song *et al.*, 2012). Por lo tanto, el peso molecular del P3HB fue determinado principalmente por las actividades combinadas de ambas enzimas. Algunos de los intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, tales como el ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico y acetyl-CoA tuvieron efectos positivos en la producción de PHB, ya que incrementaron actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de PHB (Song *et al.*, 2012).

2.6 Importancia del peso molecular del P3HB

Las propiedades fisicoquímicas y termomecánicas de un biopolímero, tales como el comportamiento elástico, la resistencia mecánica y el grado de cristalinidad son muy importantes para sus aplicaciones y en gran medida están determinadas por el peso molecular. Es bien conocido que el homopolímero de P3HB es un plástico con pobres características en cuanto a su rigidez (Kusaka *et al.*, 1999). En el caso del P3HB, se ha demostrado que este tipo de polímeros que alcanzan un ultra-alto peso molecular (3-11 x10⁶ Da) son materiales más dúctiles y flexibles con una alta resistencia y mayor alargamiento a la ruptura sin afectar su biodegradabilidad (Aoyagi *et al.* 2003, Kusaka *et al.*, 1999). Por ejemplo, las fibras de P3HB con peso molecular promedio (Mw) de 300 kDa presentan una resistencia a la tracción de 190 MPa y una elongación al rompimiento del 5

%; mientras que, cuando el Mw es de 5,300 kDa las fibras aumentan su resistencia a la tracción a 1,320 MPa y su elongación al rompimiento a un 58 % (Iwata, 2005; Ragan, 2008). Además, la velocidad de degradación del material está determinada por el tamaño de las moléculas del biopolímero, observándose que cuando el peso molecular del P3HB es mayor, la velocidad de degradación disminuye (Bonartsev *et al.*, 2012).

2.7 Efecto de las condiciones de cultivo sobre el peso molecular del P3HB

El peso molecular del P3HB puede ser afectado por los parámetros de cultivo, como la composición del medio de cultivo, pH, temperatura y condiciones de aireación (Agus *et al.*, 2010, Asenjo *et al.*, 1995; Bocanegra *et al.*, 2013, Myshkina *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2014; Shimizu *et al.*, 1993). Adicionalmente, se ha observado que el peso molecular del P3HB puede ser afectado por la fase de crecimiento, observándose un decremento entre la fase de crecimiento y la fase exponencial, dependiendo de la cepa de *A. vinelandii* utilizada (Millán *et al.*, 2016).

2.7.1 Contenido de P3HB en el inóculo

En un estudio previo se mostró que la evolución del peso molecular en función de la fase de crecimiento podría estar influenciada por el contenido de P3HB en el inóculo (Kusaka *et al.*, 1997); en dicho estudio se utilizó una cepa recombinante de *Escherichia coli* XL1-Blue, y se observó que en cultivos en biorreactor, cuando el inóculo no contenía P3HB, el peso molecular del polímero disminuía en más del 50 % durante la fase exponencial. En contraste, al utilizar un inóculo conteniendo 30 % de P3HB, el peso molecular del polímero permanecía constante independientemente de la fase de crecimiento (Kusaka *et al.*, 1997).

A partir de estos antecedentes, en nuestro grupo de investigación surgió el interés de evaluar el efecto del contenido de P3HB en el inóculo sobre el peso molecular del polímero producido por la cepa OP de *A. vinelandii* en cultivos en biorreactor (Millán *et al.*, 2017). En este estudio se utilizaron como inóculo células que contenían 20, 50 y 70 % de P3HB; se observó que el contenido de P3HB en el inóculo afectó la productividad volumétrica de P3HB (q_{P3HB}) y el peso molecular del mismo. Los cultivos inoculados con células conteniendo 20 % de P3HB alcanzaron la mayor q_{P3HB} ($0.17 \pm 0.018 \text{ g}_{P3HB} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) mientras que, un

contenido de P3HB del 70% en el inóculo significó una baja q_{P3HB} ($0.021 \pm 0.002 \text{ g}_{P3HB} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Millán *et al.*, 2017).

En este mismo estudio, se observó que al utilizar un inóculo con 70 % de contenido del polímero, el peso molecular del P3HB producido se mantuvo constante en valores cercanos a los 3,070 kDa; mientras que, cuando se utilizó un inóculo con el 20 % de contenido de P3HB, el peso molecular del polímero fue de 1,570 kDa (Millán *et al.*, 2017). Estos resultados sugirieron que, manipulando el contenido de P3HB en el inóculo, se pueden producir biopolímeros con diferentes pesos moleculares, sin embargo, no existe una explicación molecular o fisiológica clara de este fenómeno y se necesitan más estudios al respecto.

2.7.2 Efecto del oxígeno disuelto sobre la síntesis del P3HB

Uno de los factores cuya limitación da lugar a la producción de PHAs en microorganismos como *A. vinelandii*, *A. beijerinckii* y *Rhizobium* ORS571 es el oxígeno (Babel & Steinbüchel, 2001). En las especies del género *Azotobacter*, la acumulación de P3HB se presenta cuando el oxígeno disuelto en el medio limita el crecimiento de la bacteria (Galindo *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2014).

Para los cultivos de *A. vinelandii*, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) crítica es de 4 % de saturación (García *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2011); condiciones por debajo de la TOD crítica se denominan condiciones de limitación de oxígeno. Se ha observado que, cuando *A. vinelandii* se cultiva en condiciones de limitación de oxígeno (<4 % TOD) se favorece la síntesis de P3HB; por el contrario, en condiciones de no limitación de oxígeno (>4 % TOD) se favorece el crecimiento celular y disminuye la acumulación de P3HB (García *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2014). Como ya se mencionó, este fenómeno ocurre porque, en condiciones de limitación de oxígeno el flujo de acetyl-CoA que entra al TCA disminuye, provocando que bajo estas condiciones se produzcan elevadas concentraciones de NADPH, NADH y acetyl-CoA, así como una baja disponibilidad de CoA libre. La acumulación de los cofactores NADH y NADPH inhibe a las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa que participan en el TCA y la CoA libre regula de manera alostérica a la primera enzima (β -cetotiolasa) de la ruta de la biosíntesis del P3HB, la cual incrementa su actividad cuando los niveles de CoA libre disminuyen, lo que favorece la acumulación del P3HB (Anderson & Dawes, 1990; Senior & Dawes, 1973).

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la influencia de las condiciones de aireación, tales como la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) sobre el rendimiento y el peso molecular del P3HB producido por la cepa silvestre OP de *A. vinelandii*. Esta cepa, al tener una mutación en el gen *algU* se ve afectada la producción del polisacárido extracelular alginato, produciendo únicamente P3HB (Díaz-Barrera *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2014).

Es importante señalar que, en cultivos en matraces, la VTO puede ser manipulada mediante el volumen de llenado y la velocidad de agitación. Se ha observado que a un menor volumen de llenado (manteniendo constante la frecuencia de agitación), se alcanza una mayor VTO. En cultivos realizados en matraces agitados se estudió la influencia de las condiciones de aireación sobre el peso molecular promedio del P3HB sintetizado por la cepa OP en medio de cultivo PY, encontrándose que en condiciones de baja aireación ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se sintetizó un polímero de mayor peso molecular (1,657 kDa) en comparación con la condición de alta aireación ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) donde el peso molecular fue de 551 kDa (Herrera-López, 2012; Peña *et al.*, 2014). Este comportamiento es congruente con lo encontrado previamente por Myshkina y colaboradores en *A. chroococcum* 7B (Myshkina *et al.*, 2008), donde se observó que en cultivos con matraces, al disminuir la velocidad de agitación los pesos moleculares del P3HB aumentaron siendo de 1,480 kDa en la condición aeróbica (250 rpm), 1,670 kDa (190 rpm), 1,820 en microaerofilia (sin agitación) y a 2,215 kDa en la condición anaeróbica y sin agitación.

En otro estudio con *A. chroococcum* 6B en biorreactores, también se observó que al disminuir la condición de aireación desde 2.5 vvm pasando por 1.3 y 0.5 vvm, el peso molecular del polímero alcanzó valores de 111, 195 y 1,100 kDa, respectivamente. Estos resultados demuestran cómo al disminuir la aireación los pesos moleculares tienen a incrementarse significativamente (Quagliano & Miyazaki, 1997).

Para la cepa OP de *Azotobacter vinelandii* también se ha observado que bajo condiciones de limitación de oxígeno disuelto (1 %) la acumulación del polímero se incrementa significativamente (80 % de P3HB) (Millán *et al.*, 2017). En el mismo estudio se observó que el oxígeno disuelto en el intervalo de 1 al 15 % de saturación, no presenta ningún efecto sobre el peso molecular del P3HB. Sin embargo, hasta ahora no se conoce cuál es el efecto

del oxígeno sobre el peso molecular del P3HB en condiciones microaerofólicas (menores a 1 %).

2.8 Enzimas involucradas en la síntesis y degradación de P3HB

La acumulación de P3HB en bacterias como *Azotobacter vinelandii* se debe a la formación de gránulos, los cuales son estructuras subcelulares que se organizan y regulan de manera compleja (Jendrossek & Pfeiffer, 2014). Los gránulos de P3HB albergan un considerable número de proteínas en su superficie, lo cual sugiere que éstas representan complejos supramoleculares con funciones específicas y no únicamente deben ser considerados como simples contenedores ricos en carbono y energía (Jendrossek & Pfeiffer, 2014). A los gránulos de P3HB se les ha denominado carbonosomas, para indicar la multifuncionalidad de estos complejos.

El análisis de las proteínas que se encuentran en las capas superficiales de los gránulos es complejo, debido a que las técnicas para lograr el aislamiento de los gránulos usualmente se ve comprometido por contaminación con otros constituyentes celulares (Liebergesell *et al.*, 1992).

Sin embargo, dentro de las proteínas que son bien conocidas por estar asociadas a los gránulos de P3HB están las phasinas (p.e. PhaP1), las cuales son proteínas que están presentes en la superficie de los gránulos de P3HB en una estructura, de alguna manera, ordenada (Jendrossek, 2007). Otras proteínas muy conocidas que están asociadas a los gránulos son las PhaC (sintasa), PhaZ1 (depolimerasa), PhaR (regulador transcripcional para expresión de phasina), entre otras.

En cuanto al ciclo de síntesis de P3HB sabemos que se lleva a cabo por la actividad de tres enzimas β -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y P3HB sintasa.

2.8.1 β -cetotiolasa

La enzima β -cetotiolasa es la primera en tener actividad en la biosíntesis de P3HB, su papel es condensar dos moléculas de acetyl-CoA para formar acetoacetyl-CoA. También tiene la capacidad de catalizar la reacción de tólisis (reacción inversa) del acetoacetyl-coA para formar dos moléculas de acetyl-CoA. La actividad de condensación de la β -cetotiolasa es

regulada alostéricamente por CoA, por lo que, dependiendo de la disponibilidad de acetil-CoA y CoA libre en la célula, puede ocurrir ya sea la reacción de condensación o de tiólisis (Senior & Dawes, 1973).

La β -cetotiolasa se encuentra en el citoplasma, está conformada por cuatro subunidades idénticas, y tiene un peso molecular de 190 kDa .

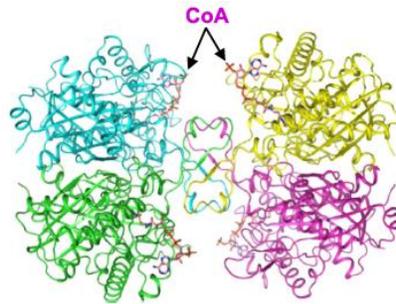


Figura 4. Modelo de la enzima β -cetotiolasa, conformada por un tetramero (en *C. necator*). Se muestran cuatro moléculas de CoA unidos a cada uno de los polipéptidos (color magenta). Tomado de (Kim & Kim, 2014).

Los residuos de aminoácidos que participan en la catálisis son Cys88 y Cys379, el primer paso de la reacción consiste en el ataque nucleofílico del grupo tiol de la Cys88 al acetil-CoA, formando un enlace tioéster entre Cys88 y el sustrato. Finalmente, la Cys379 participa como agente nucleofílico atacando el enlace tioéster previamente formado, llevándose a cabo la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA (Kim & Kim, 2014).(E.-J. Kim & Kim, 2014)(E.-J. Kim & Kim, 2014)

2.8.2 Acetoacetil-CoA reductasa

Esta segunda enzima realiza la reducción del acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA, esta reacción requiere del cofactor NADPH para catalizar la reacción. En la Figura 5 se muestra a estructura de la acetoacetil-coA reductasa de *R. eutropha* (Matsumoto *et al.*, 2013). Esta enzima es funcional como tetrameto, y su actividad depende de la formación de un complejo ternario junto con el acetoacetil-CoA y el NADP⁺. El sitio activo lo constituyen la Thr173 en la subunidad A, la Pro207 y la Thr173 en la subunidad B; sin embargo regiones

flexibles en conformaciones alfa y beta en el sitio de unión promueven el reconocimiento del sustrato y del NADP⁺.

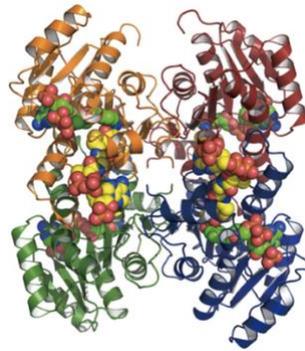


Figura 5. Modelo de la enzima Acetoacetyl-CoA reductasa, conformada por un tetrámero (en *C. necator*). Tomado de (Matsumoto *et al.*, 2013).

2.8.3 P3HB sintasa

La P3HB sintasa es la última enzima involucrada en la biosíntesis del polímero. Esta enzima cataliza la polimerización del 3-hidroxi-butiril-CoA a P3HB, liberando CoA. En las bacterias *Cupriavidus necator* y *Azotobacter vinelandii* la sintasa está conformada por dos subunidades idénticas (PhaC, clase I), esta enzima es capaz de polimerizar únicamente monómeros de PHAs de cadena corta (3 a 5 átomos de carbono) (Rehm, 2007).

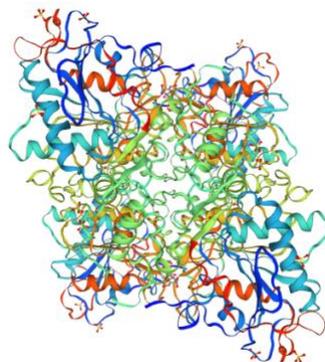


Figura 6. Modelo de la enzima PhaC1 (P3HB sintasa de *Cupriavidus necator*), conformada por un tetrámero. Tomado de Swiss Model Repository, 2019.

La región N-terminal está constituida por cerca de 100 aminoácidos en las sintasas de clase I; se ha sugerido que dicha región podría determinar la especificidad de la enzima por el sustrato (Rehm, 2003, 2007). Al eliminar la región N-terminal, su actividad catalítica no se ve afectada, sin embargo, mutaciones sitio específicas en dicha región incrementan la actividad de la enzima.

La región C-terminal, constituida por alrededor de 40 aminoácidos, se considera esencial para la actividad de la sintasa y es una región rica en residuos hidrofóbicos, lo que sugiere su interacción con los gránulos del polímero. Se ha observado que mutaciones en esta región resultan en la pérdida de la actividad de la enzima (Normi *et al.*, 2005; Rehm, 2007).

El sitio activo de la enzima está compuesto por la triada catalítica Cisteína-Aspartato-Histidna (Cys319-Asp480-Hys508), similar al que presentan otras esterasas (Jendrossek, 2009).

En ensayos realizados *in vitro* se ha observado que la mayor actividad enzimática de esta enzima se presenta en los gránulos del P3HB, donde las sintasas se encuentran unidas covalentemente. Se ha sugerido que, previo a la síntesis de P3HB, la enzima está presente en el citoplasma; al iniciar la síntesis del polímero, la enzima unida a un monómero de 3-hidroxi-3-butirato se dimeriza e inicia la etapa de polimerización del P3HB (Figura 7) (Rehm, 2007).

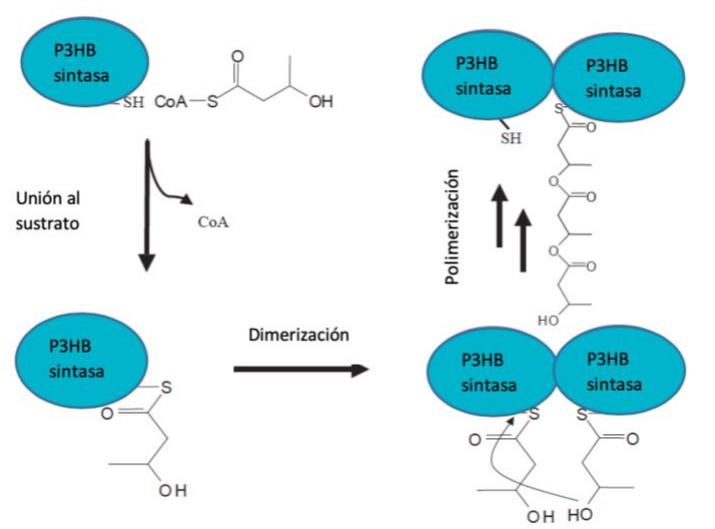


Figura 7. Modelo del mecanismo catalítico de la P3HB sintasa (Tomado de Rehm, 2007).

En 2014, Jendrossek y colaboradores, descubrieron en *C. necator* (antes *R. eutropha*), una proteína denominada PhaM, la cual es el activador fisiológico de la P3HB sintetas, dando como resultado la dimerización de la enzima y la formación de un complejo enzimático conocido como sitio de nucleación, donde se forman las cadenas de polímero (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

2.8.4 Depolimerasa y su papel en el peso molecular del biopolímero

Los microorganismos productores de PHAs sintetizan enzimas que catalizan la depolimerización del P3HB acumulado. Estas depolimerasas son intracelulares y se encuentran ancladas a la superficie de los gránulos de PH3B; además, se ha observado que dichas enzimas hidrolizan específicamente el biopolímero en estado nativo (amorfo), es decir, son incapaces de hidrolizar P3HB desnaturalizado (cristalino) (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

En estudios con modelos biológicos como *Methylosinus trichosporium* se ha observado que el peso molecular del P3HB sintetizado se puede explicar mediante el análisis de la expresión de enzimas como la P3HB polimerasa o la P3HB depolimerasa (Song *et al.*, 2012). En un estudio reciente, donde se utilizó la cepa mutante *phbZ1⁻* en fermentadores de 3 L y bajo condiciones controladas de tensión de oxígeno disuelto (TOD) del 1 %, se encontró que, con respecto a la cepa OP, la producción volumétrica de P3HB fue 60 % mayor. La mayor producción de P3HB se atribuyó a un mayor consumo de sacarosa por parte de la cepa mutante (Millán *et al.* , 2016).

En cuanto al peso molecular del polímero obtenido, se observó que al utilizar la cepa mutante *phbZ1⁻* se produjo un peso molecular máximo de alrededor de 6,100 kDa y permaneció constante durante todo el cultivo ya que no se presentó la aparición de polímeros de bajo pesos molecular. En contraste, en la cepa parental OP, el peso molecular máximo fue menor (4,800 kDa) y éste disminuyó desde las etapas tempranas de cultivo (después de 20 h), con un incremento en la fracción de polímeros de menor peso molecular que se correlacionaba con el incremento de la actividad P3HB depolimerasa. Además, se observó que la distribución de pesos moleculares del P3HB producido por la cepa mutante se encontraba en el intervalo de 300 a 30,000 kDa, mientras que con la cepa OP se produjo un polímero con fracciones con pesos moleculares entre 10 y 300 kDa (Millán *et al.* , 2016).

A partir de estos resultados se sugirió que la enzima depolimerasa PhbZ1 tiene un importante papel en la degradación de P3HB en cultivos en biorreactor y su inactivación permite la producción de un polímero uniforme con alto peso molecular.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de la producción de polímeros biocompatibles y a la relevancia que tiene conocer la influencia de los parámetros de cultivo que den como resultado polímeros con diferentes pesos moleculares y adecuados para aplicaciones biomédicas, este trabajo tiene como objetivo entender cómo las condiciones de muy baja transferencia de oxígeno (microaerofilia) afectan el peso molecular del P3HB a través de la comprensión de los mecanismos involucrados en los procesos de polimerización y depolimerización que se llevan a cabo en cada una de las cepas a estudiar.

4. HIPÓTESIS

Bajo condiciones de baja transferencia de oxígeno ($VTO_{max} < 10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), el peso molecular del P3HB sintetizado por la cepa *phbZ1⁻* en cultivos en biorreactor con pH controlado, se mantendrá en el orden de los 6,000 kDa ; mientras que en la cepa control OP se producirá un polímero de mayor peso molecular con respecto al obtenido a altas VTOs.

5. OBJETIVO

Estudiar los cambios en el peso molecular del P3HB sintetizado por la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* y la cepa parental OP en condiciones de microaerofilia (bajas velocidades de transferencia de oxígeno).

5.1 Objetivos particulares

Determinar el peso molecular del P3HB en cultivos en matraces agitados bajo dos condiciones de transferencia de oxígeno (2 y 5 $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) modificando el volumen de llenado (100 y 200 mL) utilizando las cepas OP y *phbZ1⁻* de *A. vinelandii*.

Determinar el peso molecular del P3HB producido por *A. vinelandii* (cepas OP, phbZ1⁻) en cultivos lote de 3 L bajo diferentes condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno ($VTO_{\max} < 10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Determinar la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación del P3HB en ambas cepas, cultivadas bajo condiciones de muy baja transferencia de oxígeno.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se realizaron cultivos en matraces agitados para poder caracterizar la cinética de crecimiento de la cepa mutante phbZ1⁻, utilizando como control a la cepa OP. Se analizó la producción de P3HB, así como el peso molecular del polímero bajo dos condiciones de aireación, 200 y 100 mL de volumen de llenado, de forma que se puedan alcanzar velocidades de transferencia de oxígeno entre 2 y 5 $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Por otra parte, se realizaron cultivos lote por triplicado en biorreactor de 3 L utilizando ambas cepas (OP y phbZ1⁻) bajo dos velocidades de agitación (300 y 500 rpm) para alcanzar dos condiciones de $VTO_{\max} = 5$ y $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, en condiciones controladas de pH (7.2), aireación (1 vvm) y temperatura (29°C) durante todo el proceso de fermentación, utilizando medio PY. Se llevó a cabo una tercera condición (exploratoria) de cultivo bajo una velocidad de agitación de 240 rpm únicamente con la cepa mutante phbZ1⁻ para alcanzar una condición de $VTO_{\max} < 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se llevó a cabo la cuantificación del polímero intracelular, así como la determinación del peso molecular del P3HB para todas las cinéticas de cultivo. La estrategia experimental se presenta en la Figura 8.

Con el objetivo de conocer cuáles son las respuestas fisiológicas que se modifican en función de la transferencia de oxígeno y cómo estas podrían tener un efecto sobre el peso molecular del P3HB producido por *A. vinelandii* se realizaron análisis enzimáticos en dos etapas de cultivo (fase exponencial y fase estacionaria) para conocer la contribución de la actividad de cada una de las enzimas involucradas en el proceso de polimerización y depolimerización del P3HB.

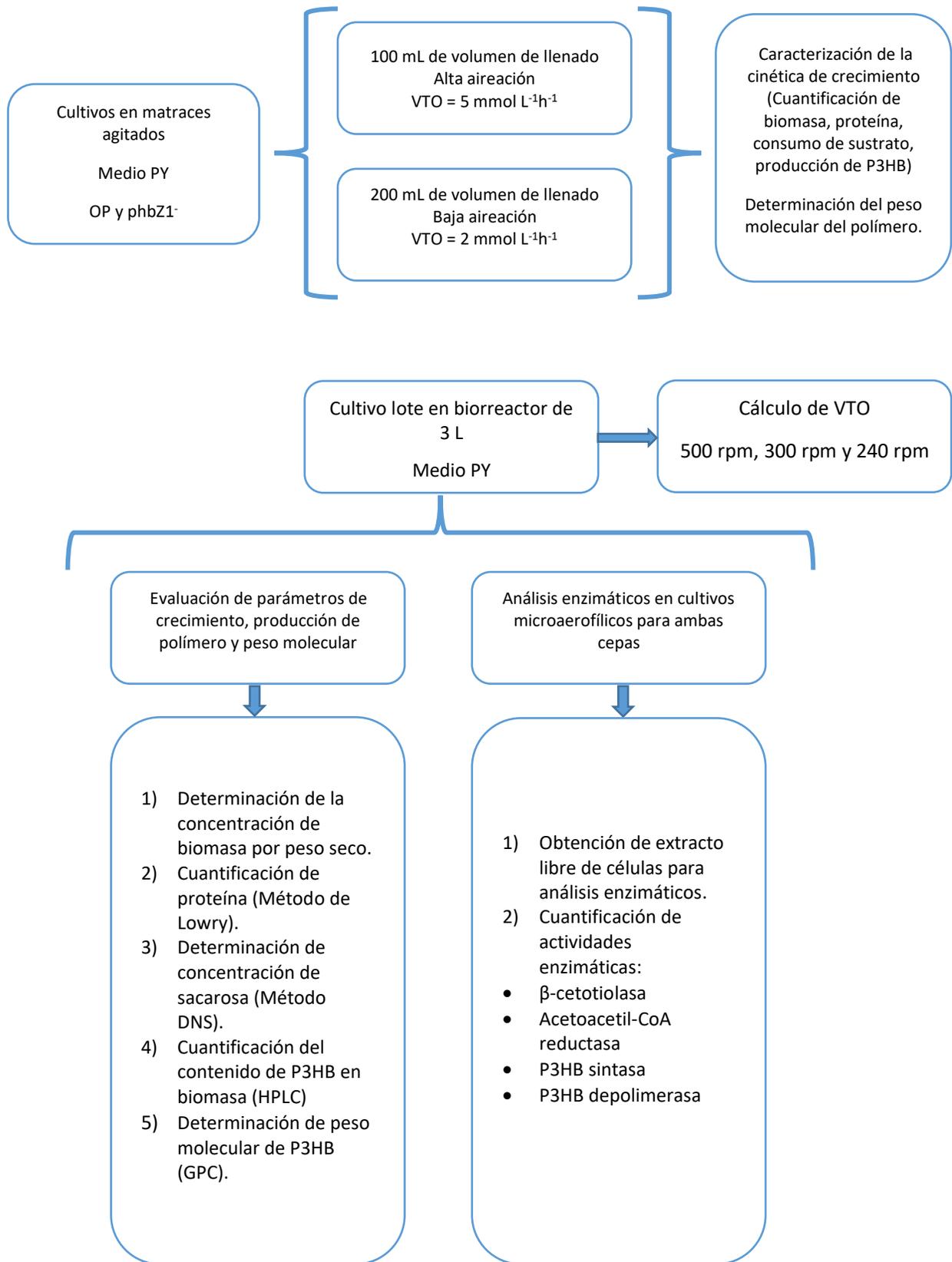


Figura 8. Estrategia experimental

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Mantenimiento de la cepa, medio de cultivo y producción del inóculo.

Las cepas de *A. vinelandii* (OP y phbZ1⁻) se cultivaron en medio PY, el cual contiene sacarosa (20 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹) y extracto de levadura (3 g L⁻¹). En los cultivos sólidos en cajas Petri se adicionaron 18 g L⁻¹ de agar bacteriológico al medio de cultivo y se suplementaron con 15 µg mL⁻¹ de ácido nalidíxico para la cepa *A. vinelandii* OP. En el caso de la cepa mutante phbZ1⁻ se adicionó al medio 15 µg mL⁻¹ de ácido nalidíxico y 1 µg mL⁻¹ de gentamicina.

Los inóculos se generaron mediante cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 100 mL de medio PY. A cada matraz se transfirieron 2 asadas de células previamente cultivadas en cajas Petri incubadas a 29°C durante 60 h. El inóculo alcanzó una densidad óptica entre 0.16-0.18 (540nm con un factor de dilución 50), correspondiendo a 0.08-0.1 g L⁻¹ de biomasa peso seco, generalmente después de 20-24 h de incubación a 29 °C y 200 rpm.

7.2 Cultivos en matraces agitados

Ambas cepas fueron cultivadas en el medio PY con la siguiente composición: sacarosa 20 g L⁻¹, extracto de levadura 3 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹. El pH se ajustó a 7.2 con una solución concentrada (2 N) de NaOH. Los cultivos se realizaron en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific Co., Modelo G 25) a 200 rpm y 29 °C. Se utilizaron dos condiciones de volumen de llenado, 100 (alta transferencia) y 200 mL (baja transferencia); en matraces de 500 mL que contenían 90 mL de medio de cultivo (alta transferencia), se agregaron 10 mL del inóculo generado (alta transferencia) y, se agregaron 20 mL del inóculo en 180 mL de medio de cultivo para la condición de baja transferencia.

Los cultivos se llevaron a cabo en 7 matraces de forma paralela para cada cepa y condición evaluada de forma independiente, de los cuales se tomó un matraz para cada tiempo de muestreo (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h) para realizar los análisis correspondientes; todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

7.3 Cultivos lote en biorreactor

Los cultivos se realizaron en un biorreactor Applikon (Holland) de 3 L, con un volumen de trabajo de 2 L, equipado con dos turbinas Rushton (diámetro impulsor/diámetro tanque = 0.35), de 6 paletas planas y un difusor de 7 orificios para efectuar aireación por burbujeo. El pH se controló a 7.2 adicionando automáticamente NaOH 2 N durante la fase exponencial de crecimiento o HCl 2 N en la fase estacionaria del cultivo. El monitoreo de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se llevó a cabo mediante un electrodo polarográfico de oxígeno cuya señal es transmitida al controlador (*my-Control*, Applikon Biotechnology). Los cultivos se realizaron a 29 °C utilizando dos velocidades de agitación (300 y 500 rpm) para ambas cepas y una condición adicional a 240 rpm para la cepa mutante *phbZ1⁻* y en condiciones controladas de aireación (1 vvm), de logrando establecer tres diferentes condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno.

Para medir el O₂ y el CO₂ en el flujo gaseoso de la salida del biorreactor se utilizó un par analizadores de gases (BlueSens, BCP-O2 Regular y BCP-CO2 Regular). La estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) se realizó a partir del análisis en línea del nivel de oxígeno gaseoso a la salida del biorreactor, utilizando la ecuación propuesta por Zeng y colaboradores (Zeng & Deckwer, 1996).

$$VTO = \frac{V_G}{V_L V_N} (X_{in} - X_{out})$$

donde V_G es el flujo de gas en la entrada (L h⁻¹), V_L es 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.

7.4 Métodos analíticos

7.4.1 Determinación de biomasa por peso seco

La concentración de biomasa se determinó mediante el método gravimétrico de peso seco. Para cada muestra se tomó una alícuota de 3-6 mL de caldo de cultivo y se centrifugó a

9,660 x g durante 15 min (centrífuga *Eppendorf* modelo 5804 R). Se separó el sobrenadante y el paquete celular se filtró al vacío a través de membranas de 0.22 μm (*Millipore*), previamente pesadas. Las membranas con muestra se secaron por 24 h a 70°C y posteriormente, se colocaron en un desecador hasta obtener peso constante. La cantidad de biomasa se obtuvo por diferencia de peso, expresada en g L^{-1} de medio de cultivo.

7.4.2 Determinación de proteína total

El análisis de la cantidad de proteína total en la biomasa se llevó a cabo mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La reacción genera un color azul cuya densidad óptica se determina a 625nm y es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

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

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

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

Se tomó 1 mL de la muestra del caldo de cultivo y se centrifugó a 9,660 x g durante 10 min; el precipitado se resuspendió en agua, aplicando una dilución de acuerdo a la cantidad de muestra. Se tomaron 200 μL de la dilución y se adicionó 1 mL de solución reactiva, se agitó y posteriormente se dejó reposando por 10 min. Posteriormente, se añadieron 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivo comercial, Sigma-Aldrich), se homogeneizó y se dejó reposar en oscuridad por 30 min. A continuación, las muestras se centrifugaron por 5 min, para evitar la interferencia de sólidos disueltos (gránulos de P3HB) en la medición. Finalmente, se determinó la absorbancia a 625nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific) contra un blanco de reacción que consistió en la mezcla de reactivos utilizando como muestra agua destilada. Se realizó una curva patrón utilizando albúmina bovina (Sigma-Aldrich), con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g L^{-1} .

Para realizar la cuantificación, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína } \left(\frac{g}{L}\right) = \left(\frac{\text{Absorbancia} - b}{m}\right) * \text{Dilución}$$

Donde b y m son la ordenada al origen y la pendiente de la curva patrón, respectivamente.

7.4.3 Determinación de sacarosa por el método de β -fructofuranosidasa-DNS

El método se basa en la reacción de hidrólisis de sacarosa por la enzima invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reacción con el ácido 2,5 dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado colorido (amarillo) cuya densidad óptica medida a 540nm es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Solución de DNS: Se preparó pesando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y 10 g de DNS, disolviendo en 1 L de agua destilada. Nota: se adicionó lentamente el DNS para evitar su precipitación.

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

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

Se colocaron 90 μ L de muestra en un tubo Eppendorf (1.5 mL) y se mezcló con 10 μ L de la solución enzimática. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se adicionaron 100 μ L de la solución de DNS a cada muestra. Los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 5 min, inmediatamente después se enfriaron en un baño de hielo. Se adicionó 1 mL de agua destilada a cada tubo. Finalmente, se determinó la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific)

contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua destilada.

El cálculo de la concentración de sacarosa se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Sacarosa} \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia} - b}{m} \right) * \text{Dilución}$$

Donde b y m son la ordenada al origen y la pendiente de la curva estándar de sacarosa, respectivamente.

7.4.4 Cuantificación del contenido de P3HB en la biomasa

La cuantificación de P3HB se realizó mediante la conversión a ácido crotónico por tratamiento con H₂SO₄ concentrado (Law & Slepecky, 1961). Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, Waters Alliance 2695) empleando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), utilizando como fase móvil H₂SO₄ 5 mM, un flujo de 0.65 mL min⁻¹ y una temperatura de análisis de 50 °C. Se utilizó un detector Waters 2996 de arreglo de diodos.

Se tomaron 5 mg de biomasa seca y se adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se calentó a 90°C durante 1 h. Las muestras se dejaron enfriar, posteriormente se realizó una dilución 1:50 con agua MilliQ y se inyectaron 20 µL de muestra al HPLC. El área bajo la curva se cuantificó a 220nm y se empleó la siguiente ecuación obtenida de una curva estándar de P3HB comercial a concentraciones conocidas entre 0.01-0.1 mg mL⁻¹ (Castillo *et al.*, 2013).

$$PHB (\%) = \left[\frac{\left(\frac{\text{Área bajo la curva} + 7,600}{158,848,710} \right) * \text{Dilución}}{\text{Biomasa utilizada}} \right] * 100$$

7.4.5. Extracción del P3HB

Se recuperó por centrifugación la biomasa celular contenida en 3 o 6 mL de muestra dependiendo de su concentración ($0.5\text{-}2\text{ g L}^{-1}$). Posteriormente, la biomasa se lavó con 1 mL de agua destilada, se resuspendió y nuevamente se centrifugó a $9,660\text{ x g}$ por 10 min (centrífuga *Eppendorf* modelo 5804 R). Se adicionó 1 mL de acetona, resuspendiendo el paquete celular por 10 min. Después de centrifugar a $9,660\text{ x g}$ por 10 min, la acetona se descartó y se adicionaron 2 mL de cloroformo para solubilizar el P3HB, dejando en contacto durante 20-24 h a temperatura ambiente para su posterior filtración previo al análisis de peso molecular.

7.4.6 Determinación del peso molecular del P3HB

La distribución de pesos moleculares se determinó por cromatografía de permeación en gel (GPC). Para las muestras provenientes de los cultivos en matraces agitados se utilizó una columna Shodex K-806M, la cual permite analizar muestras de P3HB con pesos moleculares desde 1,000 hasta 20,000 kDa. Debido a que la vida útil de la columna Shodex K-806M se cumplió al finalizar dichos análisis, en el caso de las muestras provenientes de los cultivos en biorreactor, se utilizó una columna nueva (Shodex K-807L), que permite analizar un intervalo más amplio de pesos moleculares (desde 1,000 a 200,000,000 Da). La columna se acopló a un equipo de HPLC (Waters Alliance 2695) con un detector de índice de refracción (Waters, 2414). El volumen de inyección es de 50 μL , la temperatura de trabajo fue de 30°C y el tiempo de corrida de 30 min a un flujo de 0.7 mL min^{-1} (columna Shodex K-806M) y de 18 min a un flujo de 1 mL min^{-1} (columna Shodex K-807L) empleando cloroformo como fase móvil. Se utilizaron estándares de poliestireno para la construcción de la curva de calibración con pesos moleculares entre $2.9\text{ x }10^3\text{-}11.0\text{x}10^6$ Da. Las muestras se prepararon a una concentración de $1\text{-}2\text{ mg mL}^{-1}$ y se disolvieron entre 12-18 h antes de su análisis. Cada muestra se filtró con membranas de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ resistentes a cloroformo (Millán *et al.*, 2016).

Se utilizó el software Empower para el procesamiento y cuantificación del peso molecular de las muestras. A partir de la curva de calibración se obtuvo una ecuación con la que se pudo estimar el peso molecular de P3HB dependiendo del volumen de elución.

7.4.7 Obtención del extracto libre de células para análisis enzimáticos

Antes de la ruptura, las células se suspendieron en un buffer de fosfatos 25 mM y pH 7.2. Las células almacenadas a -20°C se resuspendieron en un buffer de lisis (densidad óptica a 540nm: 2). Las células se rompieron por sonicación (4 ciclos de 15 s a 6W de potencia). Posteriormente, se centrifugaron a 14,500 x g durante 10 min a 4°C y se recuperó el extracto libre de células (sobrenadante). El sobrenadante se mantuvo en hielo inmediatamente después y se empleó para determinar la concentración de proteína y realizar los análisis enzimáticos.

7.5 Análisis enzimáticos

La actividad de las enzimas involucradas en la síntesis (β -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa, P3HB sintasa) y degradación (depolimerasa) de P3HB fueron determinadas de acuerdo a las técnicas previamente reportadas (Millán, 2017).

7.5.1 β -cetotiolasa

La actividad de la enzima se determinó mediante la reacción de tiólisis del acetoacetyl-CoA. Se midió la disminución de la absorbancia a 303nm debido al decremento de la concentración del complejo enol formado por el Mg^{2+} y el acetoacetyl-CoA. El coeficiente de extinción molar del acetoacetyl-CoA es de $17,260 M^{-1} cm^{-1}$ (Segura *et al.*, 2000; Senior & Dawes, 1973; Volova, *et al.*, 2004). La reacción se realizó en un buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.8 a 29 °C en una microplaca de 96 pozos con un volumen de trabajo de 200 μ L. El pozo de referencia contenía todos los componentes de reacción, excepto el cofactor coenzima A (CoA). La unidad se definió como la actividad de conversión de 1 μ mol de acetoacetyl-CoA por min por mg de proteína.

7.5.2 Acetoacetyl-CoA reductasa

La actividad reductasa se midió empleando un buffer de fosfatos 100 mM, pH 5.5 a 29 °C en 200 μ L de volumen de reacción (Senior & Dawes, 1973; Song *et al.*, 2012; Volova *et al.*, 2004).

La actividad se determinó a través de la reacción de oxidación del NADPH, mediante la medición de la disminución de la absorbancia a 340nm y empleando un coeficiente de extinción molar de 6,220 $M^{-1} cm^{-1}$. El pozo de referencia contenía todos los componentes de reacción excepto el sustrato acetoacetyl-CoA. La reacción inició al momento de adicionar el NADPH. La unidad se definió como la actividad para reducir 1 μ mol de acetoacetyl-CoA por min por mg de proteína.

7.5.3 P3HB sintasa

La actividad de la enzima P3HB sintasa se determinó mediante la medición espectrofotométrica del ácido tionitrobenzoico (TNB). En la condensación de dos moléculas del monómero 3-hidroxi-butiril-CoA, se libera CoA la cual reacciona con el 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) y se produce el anión TNB de manera proporcional a la cantidad de CoA liberada. El coeficiente de extinción molar del TNB es de 13,600 $M^{-1} cm^{-1}$ a una longitud de onda de 412nm. La reacción se realizó en buffer de fosfatos 25 mM a pH 7.0 y a 29 °C en una microplaca de 96 pozos con un volumen de trabajo de 200 μ L.

El pozo de referencia contenía todos los componentes de reacción excepto el sustrato β -hidroxi-butiril-CoA y la reacción inició al momento de adicionar el sustrato en la celda. La actividad de la enzima P3HB sintasa se midió tanto en la fracción soluble (sobrenadante) como en la fracción insoluble (enzima asociada a los gránulos de polímero). La unidad se definió como la actividad requerida para polimerizar 1 μ mol del monómero β -hidroxi-butiril-CoA por min por mg de proteína.

7.5.4 P3HB depolimerasa

Para la determinación de la actividad P3HB depolimerasa fue necesario recuperar los gránulos del biopolímero en estado nativo, debido a que la enzima presente en *A. vinelandii* sólo es capaz de degradar cadenas de P3HB en estado amorfo (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

7.5.5 Recuperación de gránulos nativos

Las muestras de cultivo se almacenaron a -20°C hasta su resuspensión en el buffer de lisis. La ruptura se realizó en una prensa French a 900 psi de presión máxima para evitar severos daños a la depolimerasa (Millán *et al.*, 2016), la cual se encuentra anclada a los gránulos de biopolímero. El complejo gránulo-enzima (P3HB-depolimerasa) se empleó en la determinación de la actividad enzimática.

Posteriormente, los gránulos de P3HB se purificaron por ultracentrifugación (71,000 x g, 45 min a 4°C) en un gradiente de glicerol-Tris HCl 50 mM, pH 7.5 (87-40% v/v). Los gránulos se recuperaron de la interfase entre los gradientes de 80 y 60 % de glicerol. A continuación, la suspensión de los gránulos en el glicerol se dializó durante 12 h a 4°C en una membrana de diálisis (Spectrapor, Fisher Scientific Co) con tamaño de poro de 12-14 kDa en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 con agitación para acelerar la remoción del glicerol de las muestras.

Finalmente, se preparó una suspensión de gránulos (con una densidad óptica cercana a 1.0 medida a 600nm) en el mismo buffer de diálisis para cada muestra. La medición de la actividad se realizó en una celda de 3 mL con 1.6 mL de volumen de trabajo, la cual se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. Para determinar la concentración de P3HB en la mezcla de reacción contenida en la celda se midió la absorbancia a 600nm a diferentes tiempos de reacción. Los valores de absorbancia se extrapolaron en una curva de calibración, la cual se construyó preparando soluciones de gránulos de P3HB a diferentes valores de densidad óptica a los cuales se les determinó la concentración de P3HB por HPLC. La unidad se define como la actividad requerida para degradar 1 µg de P3HB por min por mg de proteína (Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Volova *et al.*, 2013).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cultivos en matraces agitados

Los matraces agitados son los biorreactores más frecuentemente utilizados en los campos de la ingeniería bioquímica y la microbiología; son un instrumento imprescindible cuando se requiere un gran número de experimentos. Por ejemplo, para el *screening* de cepas, desarrollo de medios de cultivos, optimización de condiciones de cultivo como la velocidad de agitación y el pH y la temperatura óptima de crecimiento, etc. (Büchs, 2001). Por otro lado, los experimentos en matraces son una herramienta ampliamente utilizada en las primeras etapas del desarrollo de un bioproceso. Es por esto que se consideró relevante como primera etapa del proyecto realizar un estudio exploratorio con cultivos en matraces agitados, de forma que se pudiera realizar una caracterización de los parámetros cinéticos y observar si bajo dos condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno existían diferencias en la producción de P3HB y el peso molecular del polímero. Además, observar si existen o no diferencias entre las dos cepas utilizadas en este estudio (OP y *phbZ1⁻* de *A. vinelandii*).

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL bajo dos condiciones de volumen de trabajo, 100 y 200 mL. Se ha reportado que la velocidad de transferencia de oxígeno máxima (VTO_{max}) bajo estas condiciones equivale aproximadamente a 5 y 2 $mmol L^{-1} h^{-1}$, respectivamente (Herrera López, 2012). Se utilizó medio PY (sacarosa 20 $g L^{-1}$, peptona 5 $g L^{-1}$ y extracto de levadura 3 $g L^{-1}$), la agitación fue de 200 rpm y la temperatura se mantuvo constante a 29 °C. A continuación, se presentan los resultados para ambas condiciones de aireación: 100 mL (5 $mmol L^{-1} h^{-1}$) y 200 mL (2 $mmol L^{-1} h^{-1}$).

En la figura 9 (a) y (b) se muestra la producción de biomasa (medida como peso seco) para cada una de las condiciones evaluadas para la cepa mutante *phbZ1⁻* y la cepa control OP, en la figura 9 (c) se muestra la producción de proteína y, en la figura 9 (d) el consumo de sacarosa para estos mismos cultivos.

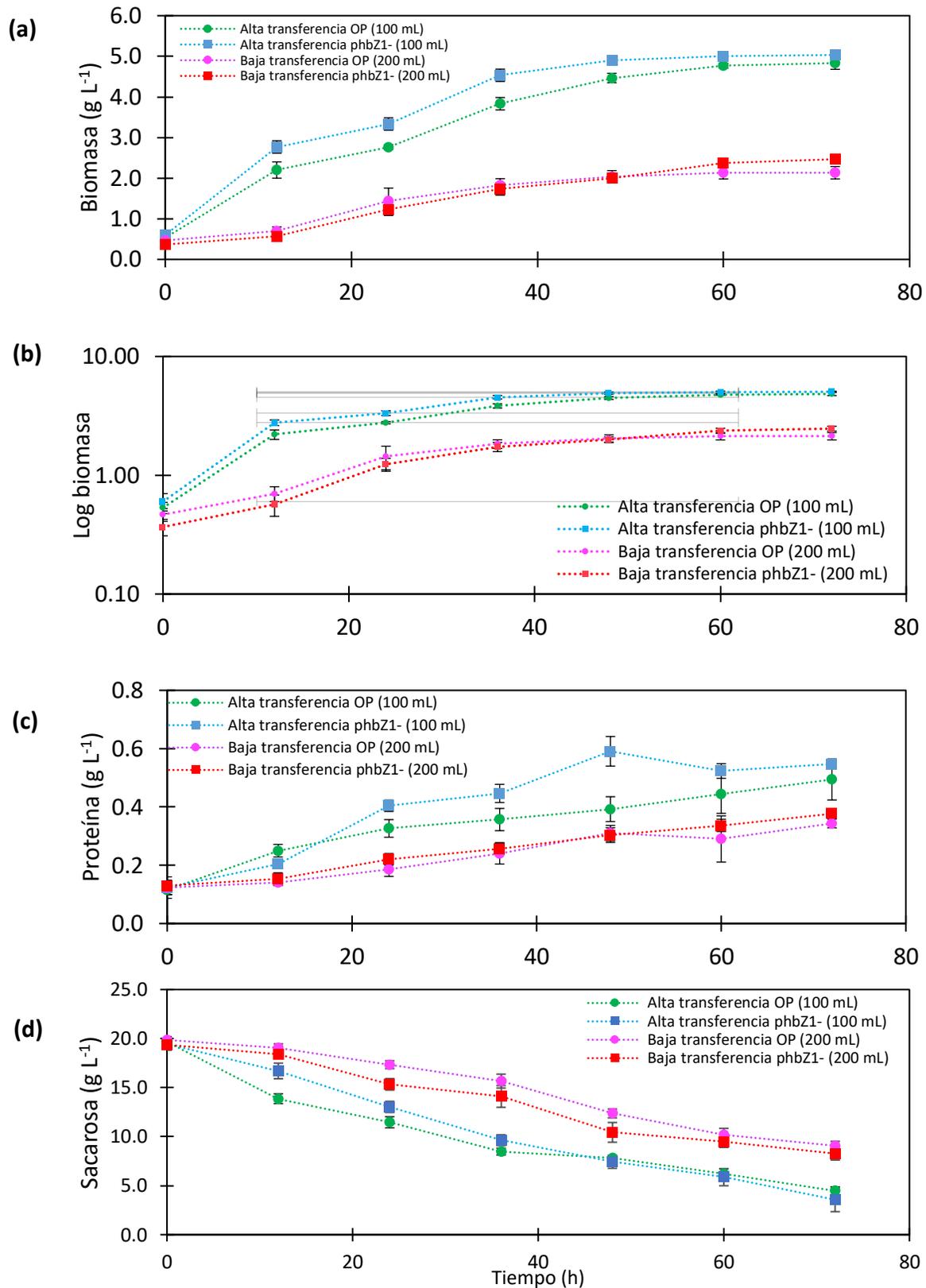


Figura 9. (a) Cinética de crecimiento celular con base en biomasa, (b) cinética con base en log biomasa (c) con base en proteína y (d) cinética de consumo de fuente de carbono con base en sacarosa de las cepas OP y phbZ1- de *A. vinelandii* bajo dos condiciones de volumen de llenado 100 mL (5 mmol L⁻¹ h⁻¹) y 200 mL (2 mmol L⁻¹ h⁻¹).

Como era de esperarse la velocidad específica de crecimiento y, por lo tanto, la producción de biomasa y proteína fueron mayores para la condición de más alta transferencia de oxígeno. En la Tabla 1 a continuación se muestra un resumen de los parámetros cinéticos de los cultivos.

Tabla 1. Valores de biomasa y proteína máximos para los cultivos en matraces agitados con la cepas OP y phbZ1⁻, velocidad específica de crecimiento calculada con respecto a biomasa y proteína.

	Alta transferencia (5 mmol L ⁻¹ h ⁻¹) 100 mL vol. de llenado		Baja transferencia (2 mmol L ⁻¹ h ⁻¹) 200 mL vol. de llenado	
	Cepa OP	Cepa phbZ1 ⁻	Cepa OP	Cepa phbZ1 ⁻
Biomasa máxima (g L ⁻¹)	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.1
μ con respecto a biomasa (h ⁻¹)	0.035 ± 0.006	0.039 ± 0.003	0.029 ± 0.004	0.027 ± 0.002
Proteína máxima (g L ⁻¹)	0.49 ± 0.07	0.55 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.38 ± 0.01
μ con respecto a proteína (h ⁻¹)	0.036 ± 0.004	0.033 ± 0.004	0.020 ± 0.006	0.018 ± 0.002
Y _{X/sac} (g g ⁻¹)	0.283 ± 0.007	0.279 ± 0.014	0.157 ± 0.011	0.189 ± 0.012
Consumo de sacarosa (%)	77.3 ± 1.5	81.8 ± 5.6	54.4 ± 1.7	57.4 ± 2.3

La biomasa máxima se alcanzó con la cepa phbZ1⁻ (5.0 ± 0.1 g L⁻¹) bajo la condición de alta transferencia de oxígeno, debido a que su velocidad específica de crecimiento con respecto a este parámetro fue mayor (0.039 ± 0.003 h⁻¹) que con la cepa OP (0.035 ± 0.006 h⁻¹). Sin embargo, no se observan diferencias significativas con ambas cepas con 100 mL de volumen de llenado. Debido a que la transferencia de oxígeno se disminuye más de la mitad al utilizar 200 mL de volumen de llenado, se observa un efecto en la producción de biomasa, cayendo prácticamente a la mitad con ambas cepas (Tabla 1).

El contenido máximo de proteína se correlacionó con la producción de biomasa, siendo mayor con la cepa phbZ1⁻ (0.55 ± 0.02 g L⁻¹). Las velocidades específicas de crecimiento con respecto a proteína son congruentes con el crecimiento de ambas cepas, siendo

prácticamente iguales para ambas cepas bajo cada condición de transferencia de oxígeno, debido a las desviaciones estándar calculadas.

El consumo de la fuente de carbono fue mayor con ambas cepas bajo la condición de más alta transferencia. La cepa *phbZ1⁻* consumió el 81.8 ± 5.6 % de la sacarosa disponible y la cepa OP consumió el 77.3 ± 1.5 %. El rendimiento de biomasa con respecto a la fuente de carbono fue mayor en la cepa OP (Tabla 1). Por otro lado, en la condición de baja transferencia el consumo de la fuente de carbono disminuyó considerablemente, la cepa *phbZ1⁻* consumió 57.4 ± 2.3 % de la sacarosa, mientras que la cepa OP consumió únicamente 54.4 ± 1.7 %.

El porcentaje de P3HB se cuantificó en los diferentes tiempos de cultivo, obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 10.

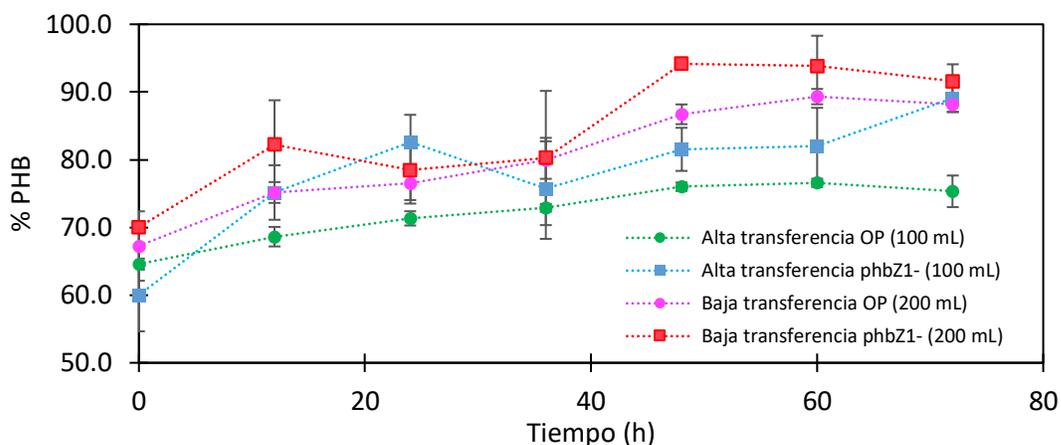


Figura 10. Porcentaje de P3HB obtenido en las cinéticas de cultivo de la cepas OP y *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* bajo dos condiciones de aireación 100 mL ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y 200 mL ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Se observa que, para la cepa OP, en el tiempo inicial de cultivo, el contenido de P3HB es alrededor de 64.6 ± 2.5 % con base en el peso seco para la condición de 100 mL y para la cepa *phbZ1⁻* es de 60.0 ± 5.4 %. En los cultivos bajo la condición de 200 mL, la acumulación inicial de P3HB es de 67.3 ± 3.5 % para la cepa OP y de 70 ± 2.3 % con la cepa *phbZ1⁻*. Para las 48 h de cultivo el porcentaje de acumulación máximo se logra con la cepa *phbZ1⁻* (94.2 ± 0.9 %) para la condición de menor transferencia de oxígeno, seguida de la cepa OP en esta misma condición (86.7 ± 1.5 %). Hacia el final del cultivo (72 h) la acumulación del polímero

es muy similar en ambas cepas (88.2 ± 1.1 % cepa OP y 91.6 ± 2.5 % cepa phbZ1⁻) a baja transferencia de oxígeno y la acumulación con la cepa phbZ1⁻ bajo la condición de alta transferencia prácticamente se iguala (89.1 ± 2.1 %), sin embargo, con la cepa OP a esta misma condición permanece en 75.3 ± 2.3 %.

Estos resultados son congruentes con lo que se había reportado previamente (Millán *et al.*, 2017) con la cepa OP en los cultivos en matraces, donde se observó que a una menor velocidad de transferencia de oxígeno se obtuvo una mayor acumulación del polímero. Sin embargo, en dicho estudio, al haberse utilizado una velocidad de agitación de 150 rpm, se obtuvo un porcentaje de acumulación distinto; con la cepa OP en baja transferencia de oxígeno se obtenía una acumulación del polímero del 70 % y en alta transferencia de oxígeno, la acumulación de P3HB alcanzó únicamente 50 % (Millán *et al.*, 2017).

Los resultados anteriores muestran que con la cepa phbZ1⁻ se logra una mayor acumulación del polímero en condiciones similares de transferencia de oxígeno en cultivos con matraces en comparación con la cepa OP. Este comportamiento puede deberse a una mayor disponibilidad de acetil-CoA (principal precursor para la síntesis del P3HB), en respuesta a una baja concentración de oxígeno en el medio, dando como resultado un menor flujo de acetil-CoA hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y un mayor flujo hacia la síntesis de P3HB (Senior & Dawes, 1973). Otra explicación está relacionada con la menor tasa de degradación del polímero con la cepa phbZ1⁻. Esta cepa no posee la P3HB depolimerasa Z1, la cual fue identificada como la depolimerasa más abundante en los gránulos intracelulares (Adaya *et al.*, 2018); es posible que por la ausencia de esta enzima no se esté observando degradación del polímero a tiempos prolongados de cultivo y finalmente se logra el mismo porcentaje de acumulación del mismo, independientemente de la condición de transferencia de oxígeno.

Se calculó el título de producción de P3HB en los diferentes tiempos de cultivo, obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 11.

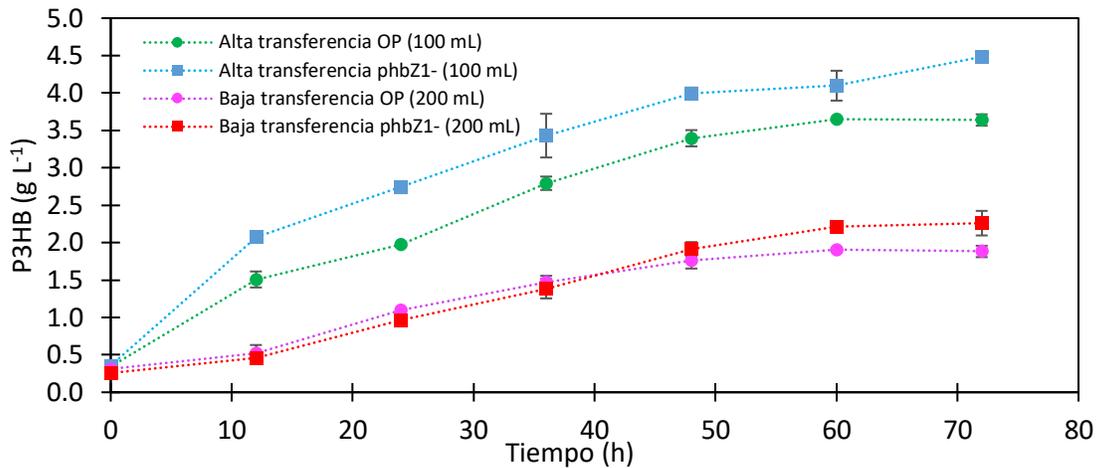


Figura 11. Cinética de producción de P3HB de las cepas OP y phbZ1⁻ de *A. vinelandii* bajo dos condiciones de aireación 100mL (5 mmol L⁻¹h⁻¹) y 200mL (2 mmol L⁻¹h⁻¹).

Como se puede observar, la producción volumétrica máxima de P3HB se alcanzó con la cepa phbZ1⁻ (4.5 ± 0.1 g L⁻¹) a las 72 h de cultivo para la condición de alta transferencia de oxígeno; mientras que para la condición de baja transferencia se alcanzó un título de 2.3 ± 0.2 g L⁻¹ en este mismo tiempo de cultivo. Para la cepa OP se obtuvo un título de producción de 3.6 ± 0.1 g L⁻¹ en la condición de alta transferencia de oxígeno, mientras que para la condición de baja transferencia se obtuvo 1.9 ± 0.2 g L⁻¹ de P3HB. Estos datos concuerdan con lo reportado previamente para la cepa OP (Herrera López, 2012). Para la condición de 100 mL la producción volumétrica de P3HB fue de 3.5 g L⁻¹, mientras que para 200 mL es igual a 1.5 g L⁻¹ a las 60 h de cultivo (Herrera López, 2012).

El rendimiento de P3HB con respecto a la fuente de carbono fue claramente mayor en la condición de alta transferencia, en este caso siendo más alta para la cepa phbZ1⁻ ($Y_{P3HB/sac} = 0.258 \pm 0.014$) y para la cepa OP ($Y_{P3HB/sac} = 0.219 \pm 0.006$). En la condición de baja transferencia el rendimiento bajó casi a la mitad para ambas cepas siendo de 0.177 ± 0.016 para la cepa phbZ1⁻ y 0.144 ± 0.022 .

En la figura 12 se muestran los pesos moleculares promedio (PMP) del P3HB producido por las cepas OP y la cepa phbZ1⁻ en las condiciones de 100 y 200 mL de volumen de llenado.

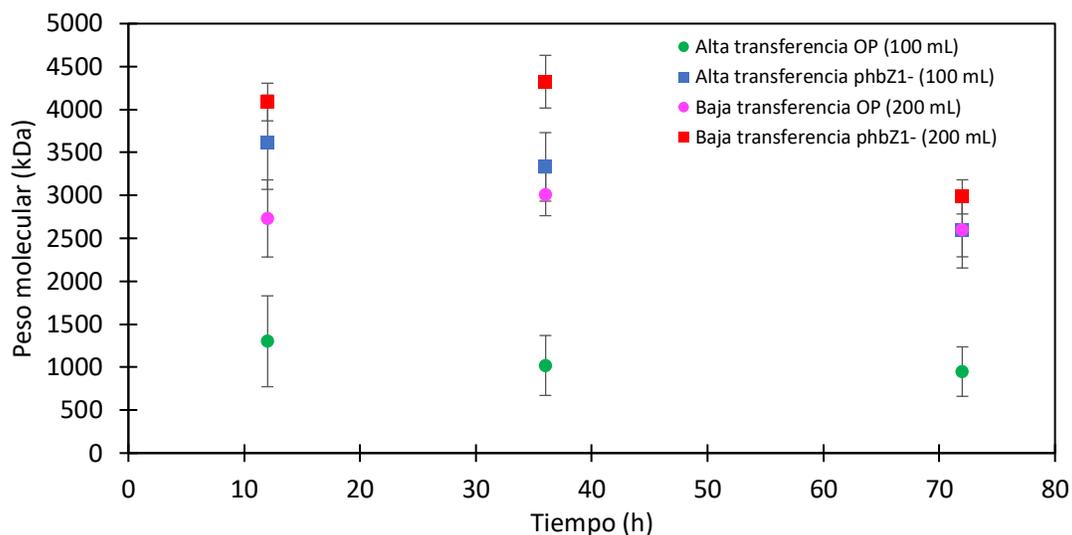


Figura 12. Peso molecular promedio (PMP) del P3HB a lo largo de la cinética de crecimiento de las cepas OP y phbZ1⁻ de *A. vinelandii* bajo dos condiciones de aireación 100 mL (5 mmol L⁻¹ h⁻¹) y 200 mL (2 mmol L⁻¹ h⁻¹).

Es claro de los resultados de la figura 12 que las condiciones de transferencia de oxígeno imperantes en matraces determinan el peso molecular del P3HB producido por la cepa OP, observándose un mayor peso molecular (~ 2,600 a 3,000 kDa) en los cultivos en condiciones de baja transferencia (200 mL de volumen de llenado) y bajo peso molecular (~950 a 1300 kDa) a alta transferencia (100 mL de volumen de llenado).

En contraste, en el caso de la cepa phbZ1⁻ el PMP del P3HB no parece depender de la condición de transferencia como sucede con la cepa OP; ya que los pesos moleculares se mantienen en el rango de los 3,000 a 4,000 kDa independientemente de la condición de llenado de los matraces. Para la condición de alta transferencia con la cepa phbZ1⁻, el PMP tiende a disminuir conforme avanza el tiempo de fermentación, entre las 12 y las 72 horas hubo un decremento en el peso molecular promedio de 640 kDa (de 3,620 a 2,980 kDa). En la condición de baja transferencia el PMP fue mayor durante todo el cultivo con la cepa phbZ1⁻ llegando a un máximo a las 36 h de cultivo (4,300 kDa). Sin embargo, nuevamente se observó un decremento en el PMP del polímero (3,200 kDa) hacia las 72 h del cultivo. Independientemente de los mecanismos que pudieran estar determinando el PMP de esta cepa a tiempos tardíos de cultivo, es claro que se producen polímeros con un peso molecular mayor al producido por la cepa OP. A continuación en la Tabla 2, se muestra el

PMP obtenido en cada condición de cultivo por ambas cepas con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 2. Valores de PMP del P3HB obtenido con los cultivos en matraces agitados con la cepas OP y phbZ1-, se muestran tres tiempos de cultivo 12, 36 y 72 h.

	Alta transferencia (5 mmol L ⁻¹ h ⁻¹) 100 mL vol. de llenado		Baja transferencia (2 mmol L ⁻¹ h ⁻¹) 200 mL vol. de llenado	
	Cepa OP	Cepa phbZ1 ⁻	Cepa OP	Cepa phbZ1 ⁻
12 h	1,302 ± 529 kDa	2,732 ± 449 kDa	3,619 ± 219 kDa	4,087 ± 549 kDa
36 h	1,020 ± 349 kDa	3,013 ± 249 kDa	3,332 ± 307 kDa	4,324 ± 399 kDa
72 h	949 ± 288 kDa	2,603 ± 318 kDa	2,605 ± 199 kDa	2,983 ± 448 kDa

Como se puede observar, los resultados de PMP obtenidos tienen buena reproducibilidad, ya que la desviación estándar más alta es la que se obtuvo con la cepa OP en la condición de alta aireación a las 12 h de cultivo (529 kDa) lo cual representa un 40 % de desviación.

En la figura 13 se muestran las distribuciones de los pesos moleculares para el P3HB producido a lo largo de la fermentación para la cepa OP en las condiciones de 100 y 200 mL de volumen de llenado.

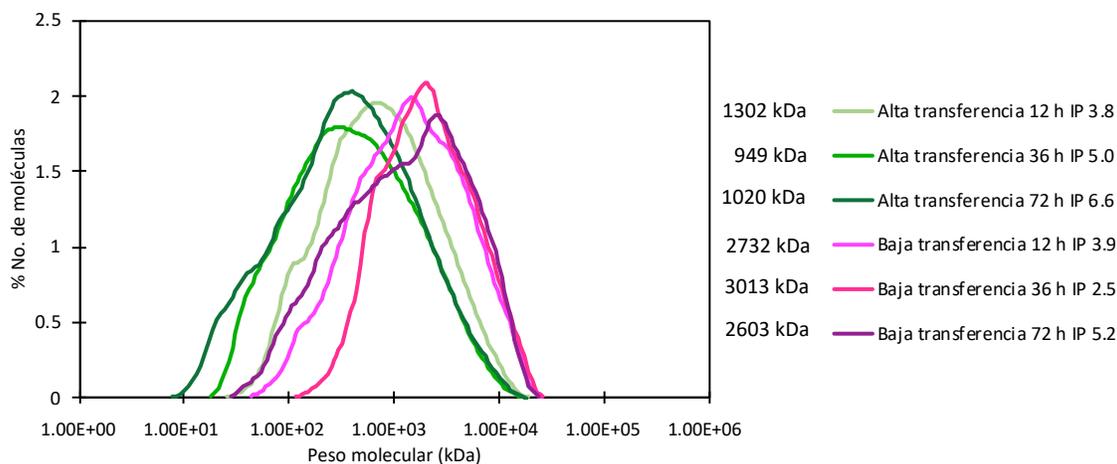


Figura 13. Distribución de pesos moleculares de la cepa OP de *A. vinelandii* bajo las condiciones de aireación de 100 mL (5 mmol L⁻¹ h⁻¹) y 200 mL (2 mmol L⁻¹ h⁻¹) en los tiempos de cultivo (12, 36 y 72h). En el panel derecho se muestra el peso molecular promedio y el índice de polidispersión de cada curva de distribución.

Como se puede observar, para la condición de 100 mL, a las 12 h del cultivo los pesos moleculares tienen una distribución relativamente homogénea, teniendo un índice de polidispersión (IP) de 3.8 en comparación a las distribuciones del polímero que se obtiene de los tiempos de cultivo a las 36 y 72 h, donde claramente se aprecia una polidispersión más alta (IP= 5.0 y 6.6, respectivamente). Lo anterior demuestra que, conforme avanza el tiempo de cultivo, para esta cepa y en la condición de 100 mL de volumen de llenado, el polímero producido se vuelve cada vez más heterogéneo.

En esta misma figura, se presentan las distribuciones de pesos moleculares del P3HB generado por la cepa OP en la condición de 200 mL de volumen de llenado. Llama la atención que para el inicio del cultivo (12 h) se tiene una distribución con un IP de 4.5 y un PMP de 2732 kDa, siendo que para la hora 36 es de 2.5; esta disminución de la polidispersión va acompañada de un aumento en el peso molecular promedio (3013 kDa). Finalmente para las 72 h del cultivo, el IP es igual a 5.2, teniendo un PMP de 2603, muy similar al que se tenía a las 12 h de cultivo. De manera general a esta condición de cultivo (200 mL de volumen de llenado), los pesos moleculares alcanzados fueron más altos que a la condición a mayor transferencia.

En la figura 14 se presentan las distribuciones de pesos moleculares para el P3HB a lo largo del cultivo en las de 100 mL y 200 mL de volumen de llenado para la cepa *phbZ1⁻*.

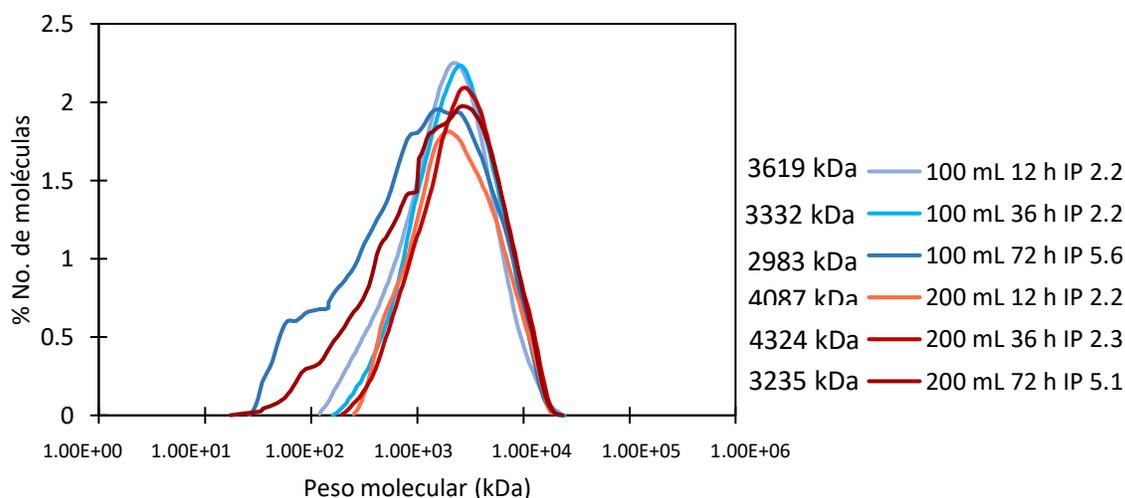


Figura 14. Distribución de pesos moleculares de la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* bajo las condiciones de aireación 100 mL ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y 200 mL ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para tres tiempos de cultivo (12, 36 y 72 h). En el panel derecho se muestra el peso molecular promedio y el índice de polidispersión de cada curva de distribución.

Como se puede observar en la figura 14, para la condición de 100 mL de volumen de llenado, el índice de polidispersión del polímero obtenido a las 12 y 36 h de cultivo es de 2.2, lo cual, obedece a la producción de un polímero muy homogéneo, cuyos pesos moleculares se encuentran entre los 3,300 y los 3,600 kDa, respectivamente. Después de las 36 h se presenta nuevamente una caída en los pesos moleculares (2,983 kDa), relacionada estrechamente al IP, el cual fue de 6.6. Por otro lado, para la condición de 200 mL se pudo observar que, los pesos moleculares se mantienen prácticamente igual entre las 12 y las 36 h del cultivo (de 4,087 a 4,324 kDa). El IP a las 12 y 36 horas es de 2.2 y 2.3 respectivamente, y de 5.1 para las 72 h de cultivo, indicando que para el último tiempo de cultivo están presentes polímeros de bajo peso molecular, provocando una disminución en el PMP del polímero (3,235 kDa).

Con base en los resultados obtenidos de los cultivos en matraces agitados se pudo observar una clara influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno en las cinéticas de crecimiento. Se observó una mayor velocidad de crecimiento en los cultivos a alta transferencia para ambas cepas. Esto era de esperarse, ya que la cepa mutante *phbZ1⁻* proviene de su cepa parental (OP), por lo que no se esperan diferencias importantes en su metabolismo de carbono y por lo tanto en su capacidad de crecimiento.

En cuanto a la acumulación del polímero de interés, se observaron diferencias significativas entre la cepa OP a alta transferencia de oxígeno ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con respecto a la condición de baja transferencia ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ya que en el último tiempo de cultivo (72 h) para la primera condición se acumuló hasta 75% de P3HB con base al peso seco de la bacteria siendo que para la segunda fue 88 %. Sin embargo, para la cepa mutante no se observaron esas diferencias bajo las dos diferentes condiciones de transferencia, alcanzando una acumulación de P3HB entre 89 y 91%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe un incremento de 25% en la producción volumétrica del P3HB con la cepa *phbZ1⁻* en la condición de alta transferencia de oxígeno y de 22% en la condición de baja transferencia en comparación con la cepa OP de *A. vinelandii*. Se puede considerar que la cepa mutante *phbZ1⁻* es una mejor productora de P3HB.

Con respecto a los resultados de PMP obtenidos con la cepa OP, se observó una clara

diferencia entre la condición de alta transferencia, donde se obtuvo un PMP más bajo (950 a 1,300 kDa) contra la condición de baja transferencia de oxígeno, donde los PMP fueron considerablemente más altos (2,600 a 3,000 kDa). Esto puede ser resultado de dos fenómenos simultáneos: 1) la síntesis de P3HB de más alto peso molecular se ve favorecido a una VTO de $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 2) por presencia de la depolimerasa Z1 en esta cepa, ya que la actividad de esta enzima podría estar siendo regulada diferencialmente bajo las diferentes VTO_{max} , siendo más activa en la condición de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y dando como resultado polímeros de menor peso molecular.

Lo anterior se demuestra con el gráfico de distribución de peso molecular (Figura 13) donde claramente se observa un incremento en el índice de polidispersión del P3HB, para la condición de alta transferencia, de 3.8 a las 12 h (PMP = 1,300) de cultivo hasta 6.4 a las 72 h (PMP= 949 kDa). Dado que en este intervalo de tiempo existió una producción de P3HB de alrededor de 2.1 g/L , es claro que existe una degradación activa del polímero por parte de las enzimas depolimerasas dando como resultado una proporción aumentada de moléculas de menor peso molecular al final de la fermentación, como ya se ha demostrado en cultivos en biorreactor para esta cepa (Millán, 2017).

En la condición de baja transferencia de oxígeno, el mecanismo de polimerización y depolimerización parece suceder de una manera muy distinta, ya que el polímero a las 12 h (PMP= 2,732 kDa) presenta un índice de polidispersión (IP) de 4.5, a la mitad del cultivo, el IP se redujo a 2.5 (PMP= 3,013) y finalmente se incrementa a 5.2 hacia el final del cultivo (2,600 kDa). De estos resultados se puede hipotetizar que entre las 12 y las 36 h de cultivo, los 0.9 g L^{-1} que se producen de P3HB tienen una distribución más homogénea, es decir, se están produciendo cadenas de P3HB de altos pesos moleculares similares entre sí, que como resultado dan un PMP de aproximadamente 3,000 kDa, situación que puede estar siendo regulada por los bajos niveles de oxígeno. Finalmente hacia el final de la fermentación, se observa el decremento en el peso molecular, dado que entre el las 36 y 72 h de cultivo únicamente se produjeron 0.48 g L^{-1} de polímero, se puede concluir que las depolimerasas (principalmente la Z1) podrían estar llevando a cabo la degradación del polímero, explicando el incremento del IP del P3HB.

Para la cepa OP, existen claras respuestas fisiológicas a la velocidad de transferencia de

oxígeno: 1) sobre la actividad de polimerización y como resultado sobre los pesos moleculares, siendo más altos para $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 2) posiblemente sobre la actividad depolimerizante, viéndose incrementada a tiempos tardíos de cultivo bajo ambas condiciones de transferencia de oxígeno.

Para la cepa mutante *phbZ1⁻*, la condición de transferencia de oxígeno no tuvo un efecto tan directo sobre el PMP. En esta cepa, la ausencia de la depolimerasa más abundante en el gránulo (Z1) explicaría las diferencias en el peso molecular ya que, desde que inicia el cultivo, se están sintetizando polímeros de mayor peso molecular que no están siendo degradados por esta enzima, en comparación con la cepa OP. Al inicio del cultivo (12 h), en ambas condiciones de transferencia de oxígeno se favorece la síntesis de polímeros de muy alto peso molecular, sin embargo, conforme avanza el tiempo de cultivo el comportamiento de los PMP cambia: por un lado a baja VTO el PMP continúa incrementándose hasta alcanzar 4,300 kDa y a alta VTO disminuye hasta alcanzar un valor de 3,300 kDa.

El decremento en el PMP para la condición de alta transferencia a las 36 h de cultivo puede deberse principalmente a un incremento en la síntesis de polímeros de bajo peso molecular en este intervalo de tiempo (donde se produjeron 2.1 g L^{-1} de P3HB, figura 11) o a una posible actividad de otras depolimerasas presentes en la cepa, que podrían activarse en esta condición de más alta VTO_{max} ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Por otro lado, para la condición de baja transferencia, después de alcanzarse un máximo de PMP a las 36 h de cultivo (4,300 kDa), hubo un decremento en el PMP hacia el final del cultivo. Nuevamente, esto podría ser explicado por una producción de polímeros de menor peso molecular; sin embargo, entre las 36 y las 72 h de cultivo únicamente se produjeron 0.9 g L^{-1} de P3HB, por lo que es más probable que la drástica caída en el PMP se deba a la actividad por parte de una o varias de las otras seis depolimerasas presentes en la cepa *phbZ1⁻*. Debido a que el decremento en el PMP es mayor en la condición de baja transferencia, podría especularse que la actividad de otras enzimas depolimerasas está favorecida en esta condición ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en tiempos avanzados de cultivo. Esto puede observarse con la distribución de los pesos moleculares (figura 14), donde se aprecia claramente que es en los tiempos finales de cultivo cuando en ambas condiciones de transferencia de oxígeno el IP se incrementa significativamente (5.6 para VTO baja y 5.1

para VTO alta).

De los experimentos realizados en matraces se puede concluir que la condición de aireación afecta la evolución de los pesos moleculares de manera diferencial para la cepa OP; siendo que para la condición de más alta aireación ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se obtienen PMP más bajos (alrededor de 1,000 kDa); mientras que, para la condición de baja aireación los pesos moleculares son más altos (2,600 kDa). Por otro lado, para la cepa phbZ1⁻ la condición de aireación parece no tener un papel relevante en el PMP del P3HB en los cultivos a alta aireación ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), debido a que el PMP permanece relativamente constante desde la fase exponencial y hasta el tiempo final del cultivo (entre 2900 y 3,600 kDa), no así para la condición a baja aireación ($2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), donde los pesos moleculares, descienden desde valores cercanos a los 4,300 kDa hasta los 2,980 kDa para el final de la fermentación .

Finalmente, con la cepa phbZ1⁻, se obtienen pesos moleculares significativamente mayores en comparación a la cepa OP, indicando que en cultivos con matraces tanto la presencia de la enzima depolimerasa Z1 como la transferencia de oxígeno producen, en combinación, polímeros de P3HB con mayor peso molecular, independientemente del mecanismo de polimerización y depolimerización.

Sin embargo, los PMP obtenidos en los cultivos con matraces son menores que los obtenidos con estas mismas cepas por Millán y colaboradores en cultivo en biorreactor bajo una condición de VTO de $6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (4,500 kDa con la cepa OP y 6,000 kDa con la cepa phbZ1⁻) con control de 1 % TOD, a pesar de que en matraces la condición de transferencia es aparentemente menor. Sin embargo, se ha observado que en cultivos con matraces agitados, la velocidad de transferencia total que es suministrada en este sistema de cultivo puede llegar a ser mayor que la de un biorreactor que se encuentra la misma VTO_{max} , por lo que podría explicarse que al estarse suministrando más oxígeno en el sistema de matraces, este tiene un efecto sobre la disminución del PMP del polímero (Figura 28, más adelante).

8.2 Cultivos lote en biorreactor de 3 L

Dado que en los cultivos realizados en matraces se observaron diferencias significativas en el peso molecular del P3HB al modificar la condición de transferencia de oxígeno, se

estableció como siguiente objetivo realizar cultivos lote en biorreactor de 3 L de forma que se pudiera realizar la caracterización cinética y determinar si, bajo diferentes condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno se modifica de la misma manera el peso molecular del P3HB, así como los títulos de producción del polímero, nuevamente con las dos cepas utilizadas en este estudio (OP y phbZ1⁻ de *A. vinelandii*).

Se realizaron cultivos lote en biorreactor utilizando la cepa control OP así como la cepa phbZ1⁻. El volumen de trabajo utilizado fue de 2 L en biorreactores Applikon de 3 L, el medio de cultivo fue PY (peptona, extracto de levadura) suplementando con sacarosa a una concentración de 15 g L⁻¹. En esta etapa, se utilizaron dos condiciones de agitación 300 y 500 rpm con una aireación de 1 vvm, controlando el pH a 7.2 y sin control de la tensión de oxígeno disuelto, se realizaron los cultivos por triplicado con cada una de las cepas en cada una de las condiciones de transferencia de oxígeno. Una vez establecidas estas condiciones, se decidió realizar un cultivo por duplicado con la cepa phbZ1⁻ en una condición de menor transferencia de oxígeno utilizando una velocidad de agitación de 240 rpm para poder evaluar si existía diferencia en los pesos moleculares en una condición de mayor microaerofilia.

El inóculo se desarrolló como se indicó en materiales y métodos, verificando en el microscopio que éste estuviera libre de microorganismos contaminantes previo a la inoculación del fermentador. A continuación se presentan los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas por duplicado a 300 y 500 rpm utilizando la cepa OP de *A. vinelandii*.

En la figura 15 se presentan los parámetros monitoreados en línea para las fermentaciones realizadas a 300 y 500 rpm para la cepa OP y en la figura 16 se presentan los parámetros cinéticos fuera de línea para las fermentaciones realizadas a 300 y 500 rpm para la cepa OP.

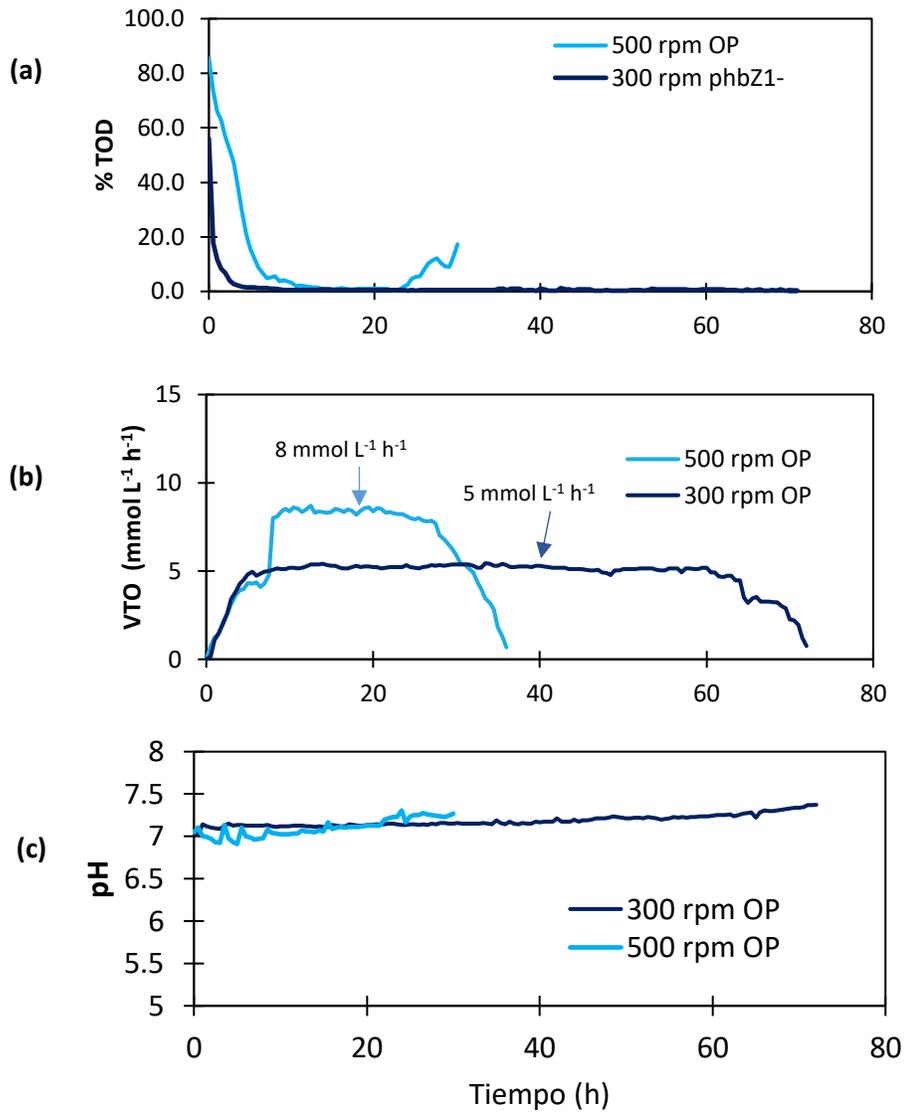


Figura 15. Parámetros registrados por el controlador del biorreactor para las condiciones de 300 y 500 rpm de la cepa OP de *A. vinelandii* (a) Tensión de oxígeno disuelto. (b) Velocidad de transferencia de oxígeno (c) Evolución de pH.

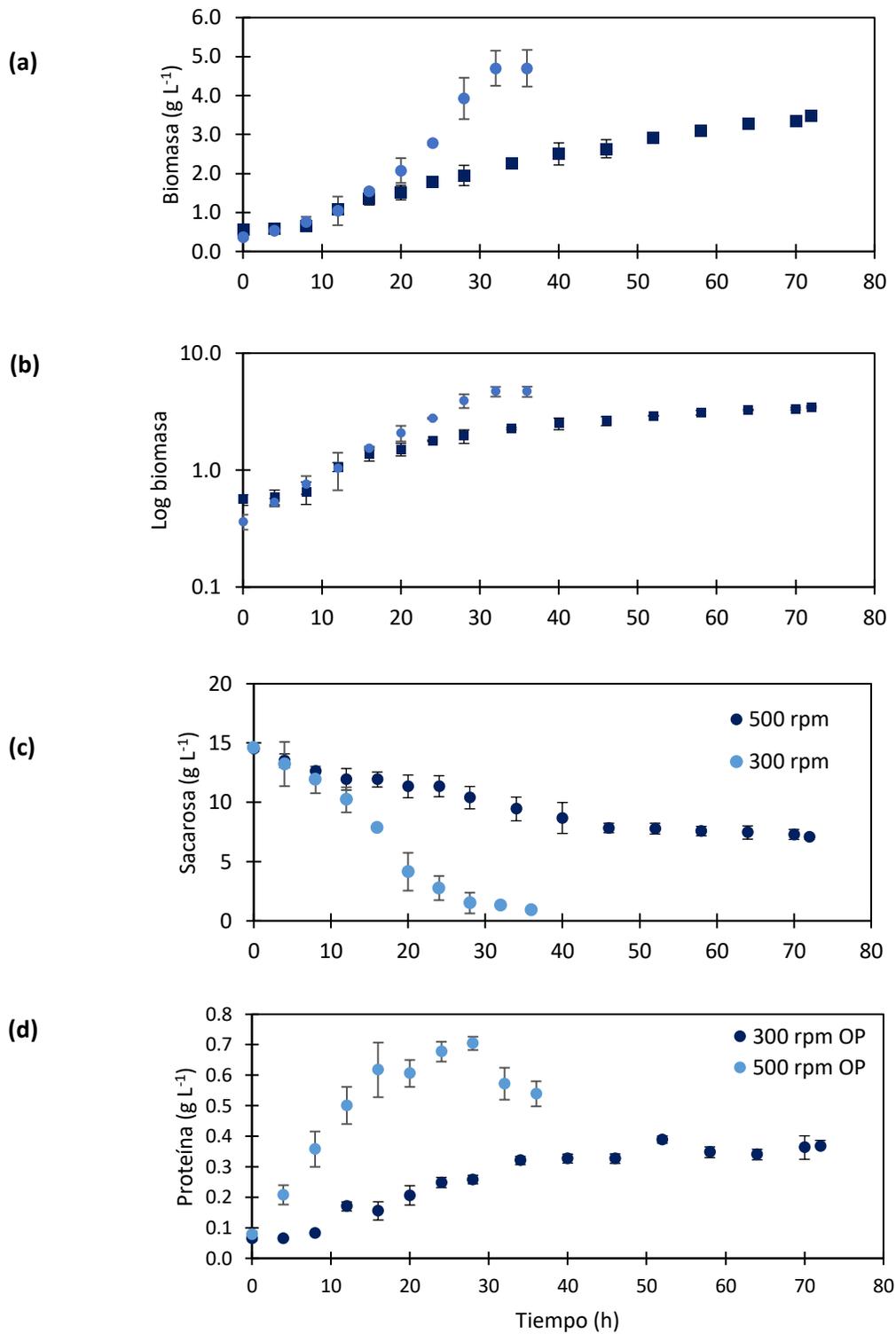


Figura 16. Parámetros cinéticos registrados para las condiciones de 300 y 500 rpm de la cepa OP de *A. vinelandii* (a) Biomasa (b) Log Biomasa (c) Sacarosa (d) Proteína. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Con respecto a la condición de 500 rpm, en la figura 15 (a) se puede observar que la tensión de oxígeno disuelto (% de saturación) disminuyó paulatinamente hasta llegar a 1.0 % después de las 14 h, manteniéndose constante hasta poco después de las 24 h. Se calculó la VTO_{max} , a partir de los datos obtenidos del analizador de gases (O_2 y CO_2) a la salida del reactor, resultando en un promedio para este período igual a $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 15 b). El pH se mantuvo constante en un valor cercano a 7.2 durante todo el cultivo (Figura 15 c).

También se muestra en la figura 15 (a), para la condición de 300 rpm, que la TOD disminuyó a valores cercanos a 1 % desde la tercera hora de cultivo. El porcentaje de TOD se mantuvo constante a 0.5 % hasta las 40 h de cultivo e incrementó a valores entre 0.6 y 0.7 % desde las 40 y hasta las 72 h. La VTO_{max} promedio calculada para este cultivo fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el mismo período de tiempo (Figura 15 b). El control de pH se mantuvo en valores cercanos a 7.2 (Figura 15 c).

En la figura 16 (a) se presenta la cinética de crecimiento con respecto a biomasa y en la figura 16 (b) se presenta en escala logarítmica. Para la condición de 500 rpm existe un crecimiento lineal (figura 16 b) entre las 14 y 24 h, correspondiente a la caída de la TOD, alcanzando una biomasa máxima de $4.7 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ desde las 32 h de cultivo y permaneciendo así hasta las 36 h. El crecimiento alcanzado bajo esta condición de cultivo correlaciona con el consumo del sustrato. En la figura 16 (c) se muestra la sacarosa residual, al final del cultivo se consumieron $13.7 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$ de los $14.6 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ disponibles en el fermentador. El rendimiento de biomasa con respecto a sustrato fue de $0.33 \pm 0.02 \text{ g}_{biomasa} / \text{g}_{sacarosa}$. Se calculó la velocidad específica de crecimiento con respecto a biomasa siendo esta de $0.080 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$.

En contraste, el cultivo llevado a cabo a 300 rpm, el crecimiento fue más lento debido a la menor transferencia de oxígeno. Para este cultivo el crecimiento tuvo un comportamiento lineal, donde alcanzó $3.5 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ a las 72 h de cultivo; sin embargo, únicamente se consumieron $7.2 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ de sacarosa hacia el final ($49.8 \pm 2.6 \%$). El rendimiento de biomasa con respecto a sustrato fue de $0.39 \pm 0.01 \text{ g}_{biomasa} / \text{g}_{sacarosa}$ y la velocidad específica de crecimiento fue de $0.024 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$.

En la figura 16 (d) se muestra la cinética de crecimiento con base en proteína. La concentración de proteína para los cultivos bajo la condición de 500 rpm correlaciona con la concentración de biomasa, alcanzando un máximo de $0.70 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ a las 28 h de cultivo, que corresponde a $16.1 \pm 0.6 \%$ del peso seco de la bacteria. En el caso de la condición a 300 rpm la concentración de proteína alcanzó su máximo a las 52 h de cultivo ($0.39 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$), correspondiendo a alrededor del $13.1 \pm 0.8 \%$ del peso seco de la bacteria.

En las figuras 17 (a) se presenta el título de producción de P3HB y (b) la evolución del porcentaje de acumulación de P3HB y, con respecto al tiempo de cultivo para la cepa OP.

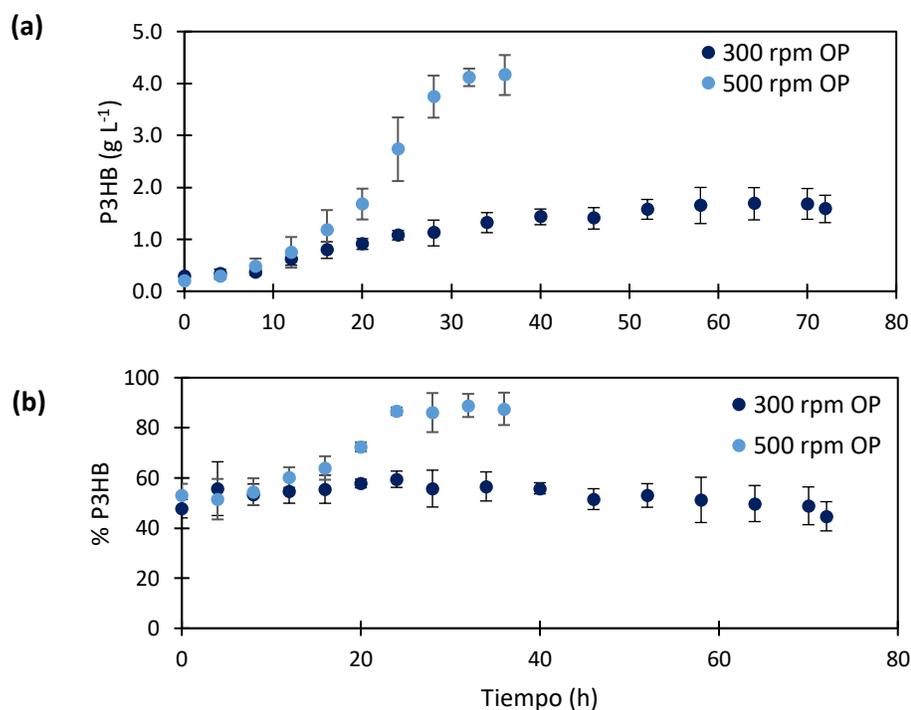


Figura 17. Parámetros cinéticos de producción de P3HB para las condiciones de 300 y 500 rpm de la cepa OP de *A. vinelandii* (a) Concentración de P3HB y (b) % de acumulación de P3HB.

La producción de P3HB (Figura 17 a) alcanzó un máximo de $4.16 \pm 0.38 \text{ g L}^{-1}$ para la condición de 500 rpm y $1.69 \pm 0.31 \text{ g L}^{-1}$ para 300 rpm, con un rendimiento con base en sustrato igual a $0.28 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{P3HB}} / \text{g}_{\text{sacarosa}}$ y $0.20 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{P3HB}} / \text{g}_{\text{sacarosa}}$, respectivamente.

En la figura 17 (b) se presenta la evolución del porcentaje de acumulación de P3HB con respecto al tiempo de cultivo. Para la condición de $VTO_{max} = 8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (500 rpm), la acumulación inicial de P3HB en las células fue de alrededor de 50 %; conforme el tiempo de cultivo fue avanzando, la acumulación de P3HB estuvo asociada al crecimiento celular, alcanzando un máximo del $88.9 \pm 4.6 \%$ con respecto a la biomasa a las 32 h. Por otro lado, para la condición de $VTO_{max} = 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (300 rpm), se observa que la acumulación osciló entre el 45 y 60% a lo largo de todo el cultivo. Esto contrasta con el cultivo llevado a cabo a 500 rpm, ya que en el cultivo a 300 rpm a pesar de realizarse a una VTO_{max} menor, presentó una menor acumulación de P3HB.

En la figura 18 a continuación, se muestran los parámetros monitoreados en línea para las fermentaciones realizadas a 500 y 300 rpm para la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* y en la figura 19 se presentan los parámetros cinéticos fuera de línea para las fermentaciones realizadas a 500 y 300 rpm para la cepa *phbZ1⁻*.

En la figura 18 (a) se puede observar que el porcentaje de oxígeno disuelto (% TOD) para la condición de 500 rpm disminuyó lentamente hasta llegar a 1.0 % después de las 7 h de cultivo, manteniéndose en un intervalo de 1.0 a 1.7 % hasta antes de las 24 h. En la figura 18 (b) se presenta la VTO_{max} promedio a lo largo del cultivo; para el período comprendido entre las 8 y las 24 h fue de $11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Con respecto a la condición de 300 rpm se muestra en la figura 18 (a) que la TOD disminuyó a valores menores a 1.0 % desde las 7 h de cultivo. El oxígeno disuelto se mantuvo oscilando entre 0.3 y 0.9 % hasta las 70 h de cultivo. La VTO_{max} promedio calculada para este cultivo (entre las 10 y 60 h de cultivo) fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (figura 18 b). El pH se controló adecuadamente para ambas condiciones (figura 18 c).

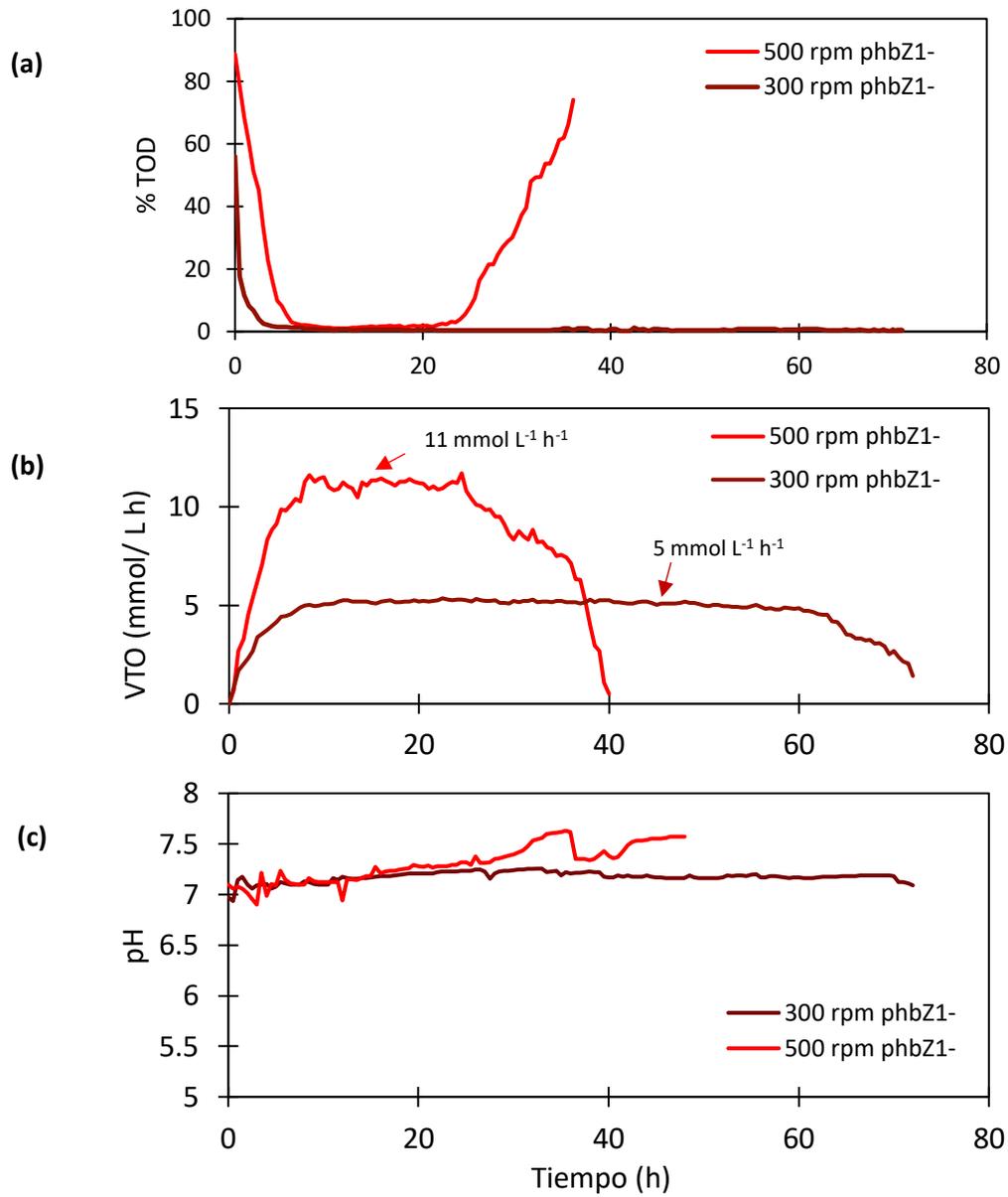


Figura 18. Parámetros cinéticos registrados por el controlador del biorreactor para las condiciones de 300 y 500 rpm de la cepa phbZ1⁻ de *A. vinelandii* (a) Tensión de oxígeno disuelto. (b) Velocidad de transferencia de oxígeno (c) evolución de pH.

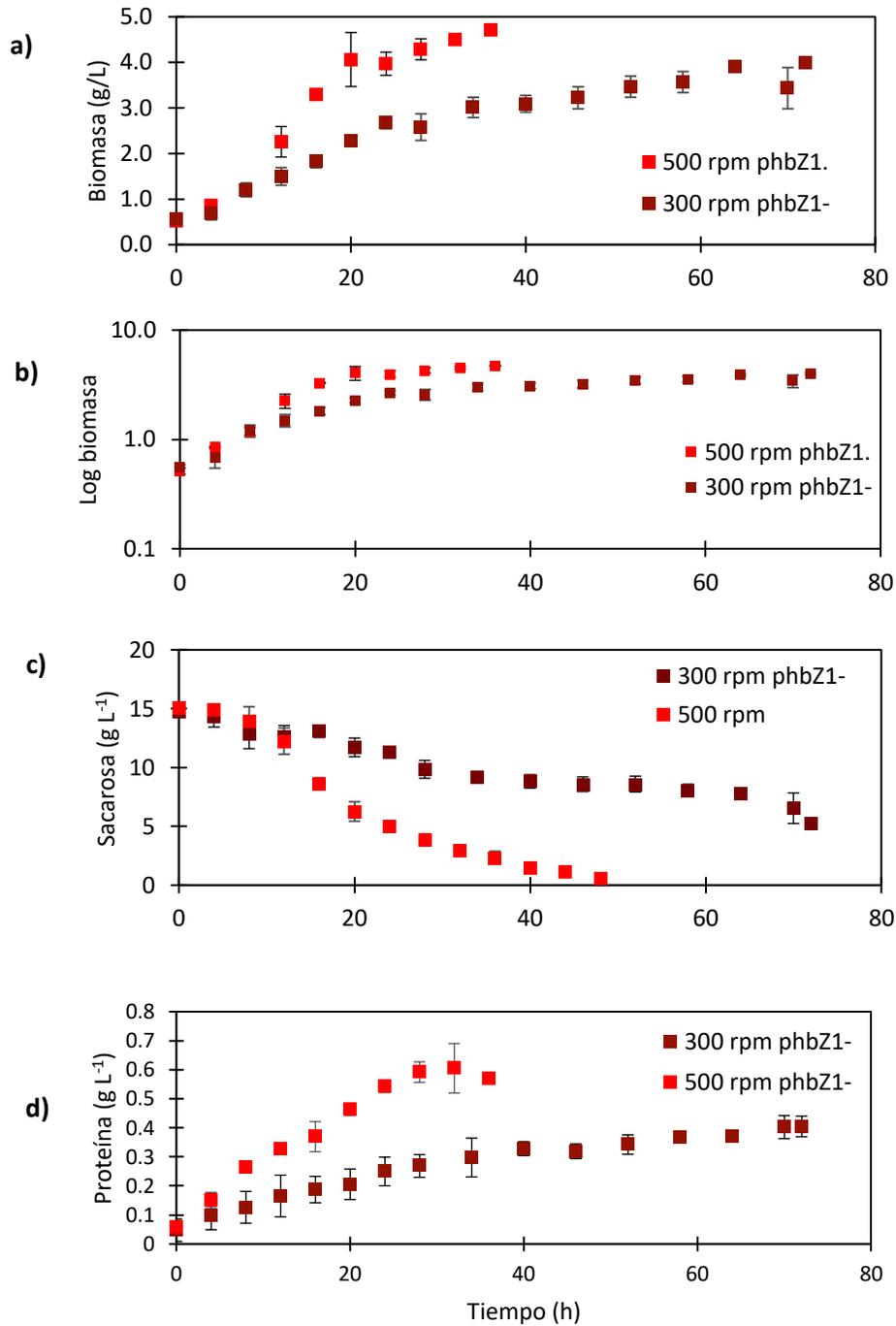


Figura 19. Parámetros cinéticos registrados para las condiciones de 300 y 500 rpm de la cepa phbZ1- de *A. vinelandii* (a) Biomasa (b) Log biomasa (c) Sacarosa y (d) Proteína (d) Concentración de P3HB e) % de P3HB.

En la figura 19 (a) se presenta la cinética de crecimiento con base en biomasa y en la figura 19 (b) se presenta esta misma cinética en escala logarítmica. Para la condición de 500 rpm existe un crecimiento que parece exponencial entre el inicio del cultivo y las 24 h,

correspondiente a la caída de la TOD, alcanzando una biomasa de alrededor de $4.1 \pm 0.6 \text{ g L}^{-1}$ desde las 20 h de cultivo y aumentando ligeramente hasta llegar a $4.7 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ a las 36 h, sin embargo, es claro que bajo la escala logarítmica el crecimiento es más bien lineal hasta las 24 h de cultivo. Para la condición de 300 rpm, el crecimiento también se comportó de manera lineal hasta aproximadamente las 24 h, donde hubo un cambio de inflexión hasta llegar a las 72 h, donde la biomasa máxima fue de $4.0 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$.

En la figura 19 (c) se presenta la evolución de sacarosa residual para el cultivo a 500 rpm, donde se observa que se consumió prácticamente toda la fuente de carbono al final de la fermentación. El rendimiento de biomasa con respecto a sustrato fue de $0.29 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$. Se calculó la velocidad específica de crecimiento con respecto a biomasa siendo esta de $0.106 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$. En el caso de la condición a 300 rpm, el crecimiento tuvo un comportamiento lineal; la biomasa alcanzada al final del cultivo (72 h) fue de $4.0 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ (figura 19 a), la sacarosa residual fue de $5.3 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$, por lo que únicamente se utilizó $9.5 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ de los $14.8 \pm 0.4 \text{ g L}^{-1}$ disponibles en el cultivo. El rendimiento de biomasa con respecto a sustrato fue de $0.36 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$ y la velocidad específica de crecimiento fue de $0.063 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$.

En la figura 19 (d) se muestra la cinética de crecimiento con base en proteína. La concentración de proteína para los cultivos bajo la condición de 500 rpm corresponde a la concentración de biomasa, alcanzando un máximo de $0.61 \pm 0.09 \text{ g L}^{-1}$ (32 h de cultivo), correspondiente a $13.4 \pm 2.1 \%$ del peso seco de la bacteria. En el caso de la condición a 300 rpm la concentración de proteína alcanzó su máximo a las 72 h de cultivo ($0.40 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$) y correspondiendo a alrededor del $10.1 \pm 0.8 \%$ del peso seco de la bacteria.

En las figura 20 a continuación, se presenta (a) el título de producción de P3HB y (b) la evolución del porcentaje de acumulación de P3HB y, con respecto al tiempo de cultivo para la cepa phbZ1⁻. Para la condición de 500 rpm ($V_{\text{TO}_{\text{max}}} = 11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la acumulación inicial de P3HB en las células fue de alrededor de $57.4 \pm 2.0 \%$; conforme el cultivo fue avanzando, se alcanzó $94.6 \pm 2.0 \%$ de acumulación de P3HB con respecto a la biomasa, a las 36 h. La producción de P3HB alcanzó $4.49 \pm 0.13 \text{ g L}^{-1}$, siendo el rendimiento con base en biomasa igual a $0.95 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{P3HB}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ y con base en al sustrato de $0.29 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{P3HB}}$

/ g sacarosa. En el cultivo a 300 rpm ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para la cepa *phbZ1⁻* inicialmente se acumuló cerca del 50% de polímero, incrementándose después de las 12 h de cultivo hasta alcanzar una acumulación máxima de $82.2 \pm 3.3 \%$ de P3HB a las 46 h de cultivo. La producción de P3HB fue de $3.03 \pm 0.31 \text{ g L}^{-1}$ a las 72 h, el rendimiento con base en biomasa fue de $0.81 \pm 0.05 \text{ g}_{\text{P3HB}} / \text{g}_{\text{biomasa}}$ y con base al sustrato de $0.29 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{P3HB}} / \text{g}_{\text{sacarosa}}$.

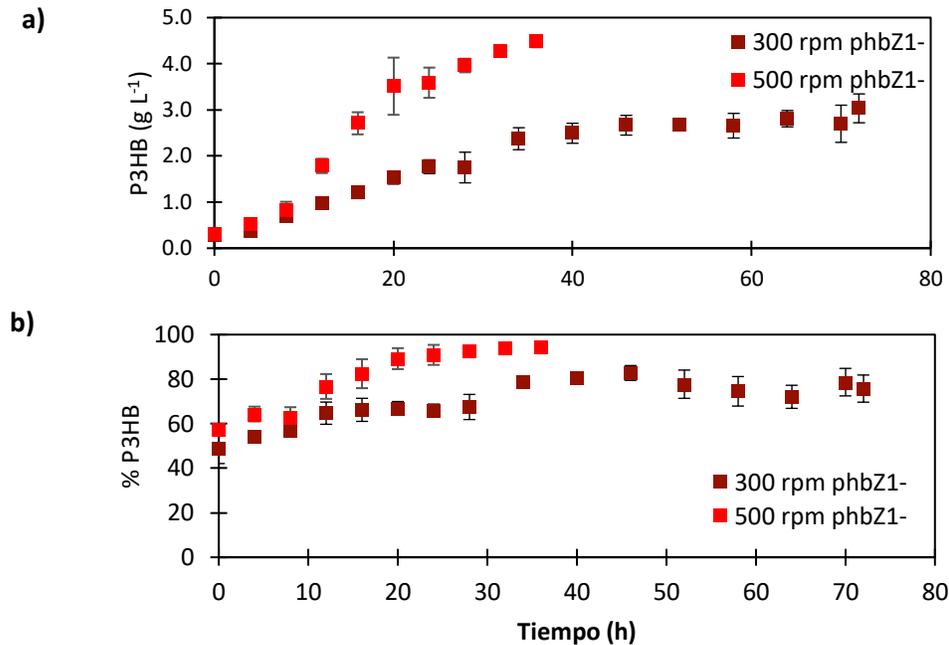


Figura 20. Parámetros cinéticos de producción de P3HB para las condiciones de 300 y 500 rpm de la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* (a) concentración de P3HB y (b) % de acumulación de P3HB.

Nuevamente se observa un fenómeno en el que a 300 rpm a pesar de alcanzar una VTO_{max} menor ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), presentó una menor acumulación de P3HB en contraste con el cultivo llevado a cabo a 500 rpm donde el porcentaje de P3HB fue mayor al 90%. En contraste, para la condición de 300 rpm ($5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para la cepa OP, parece haber un equilibrio entre la polimerización y depolimerización del P3HB debido a que el porcentaje de acumulación se mantiene constante (aproximadamente en 50 %) a través del tiempo.

En la figura 21 se muestran los parámetros registrado “en línea” por el controlador durante la fermentación realizada por duplicado a 240 rpm para la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* y en las figura 22 y 23 se presentan los parámetros cinéticos para esta misma fermentación.

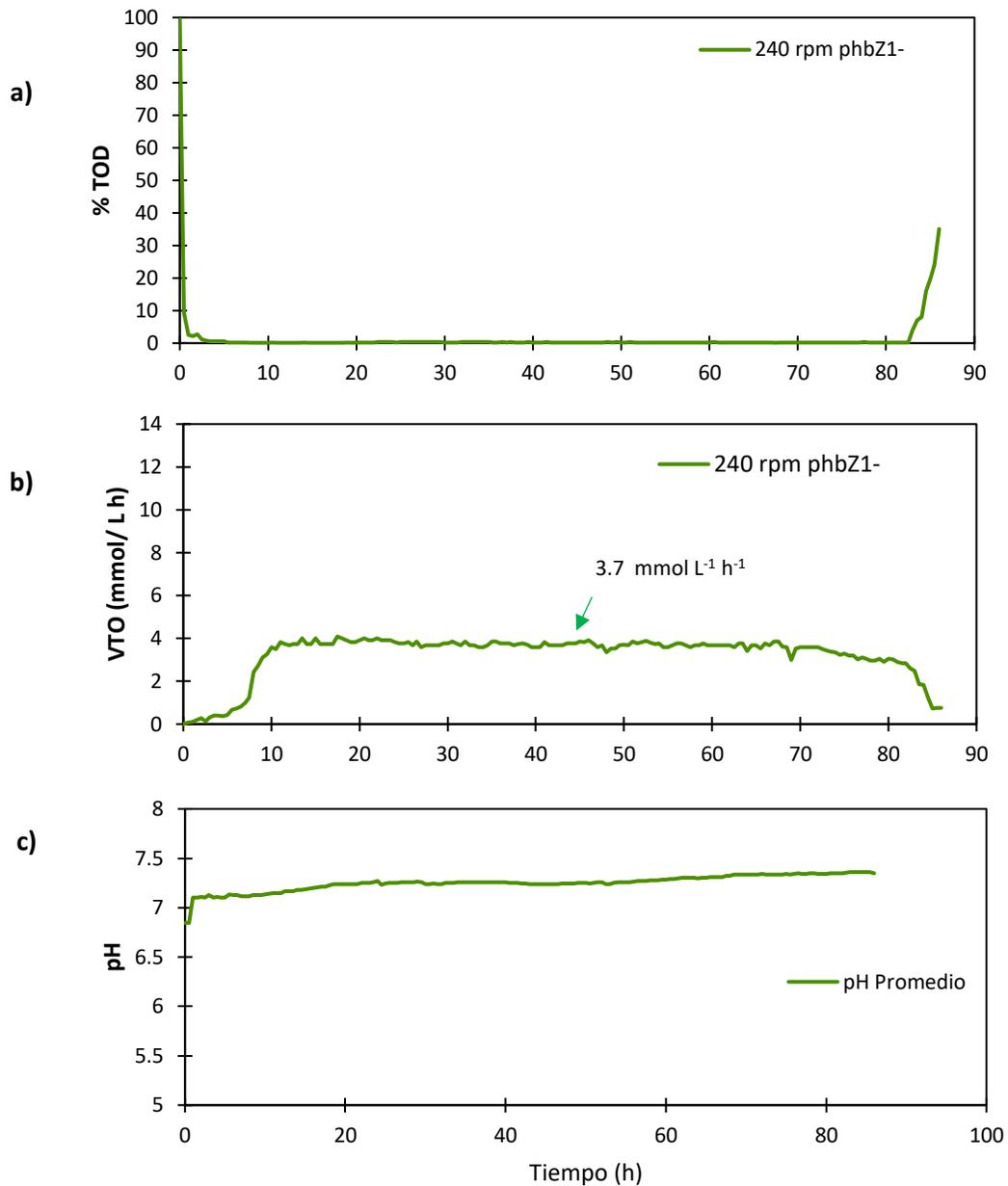


Figura 21. Parámetros cinéticos monitoreados en línea para la condición de 240 rpm de la cepa phbZ1⁻ de *A. vinelandii* a) tensión de oxígeno disuelto b) velocidad de transferencia de oxígeno c) evolución de pH.

En la figura 21 (a) se observa que la TOD para la condición de 240 rpm con la cepa phbZ1⁻ disminuyó rápidamente hasta llegar a valores entre 0.1 y 0.3 % después de las 6 h de cultivo, manteniéndose este mismo intervalo hasta después de las 82 h de cultivo. En la figura 21 (b) se presenta el perfil de VTO a lo largo del cultivo; para el período comprendido entre las 10 y las 80 h la VTO_{max} promedio fue de 3.7 mmol L⁻¹h⁻¹. El pH se controló adecuadamente en valores cercanos a 7.2 (figura 21 c). Cabe mencionar que, los resultados mostrados a

continuación para esta condición de 240 rpm se realizaron por duplicado, por lo que las desviaciones estándar sólo consideran un par de datos.

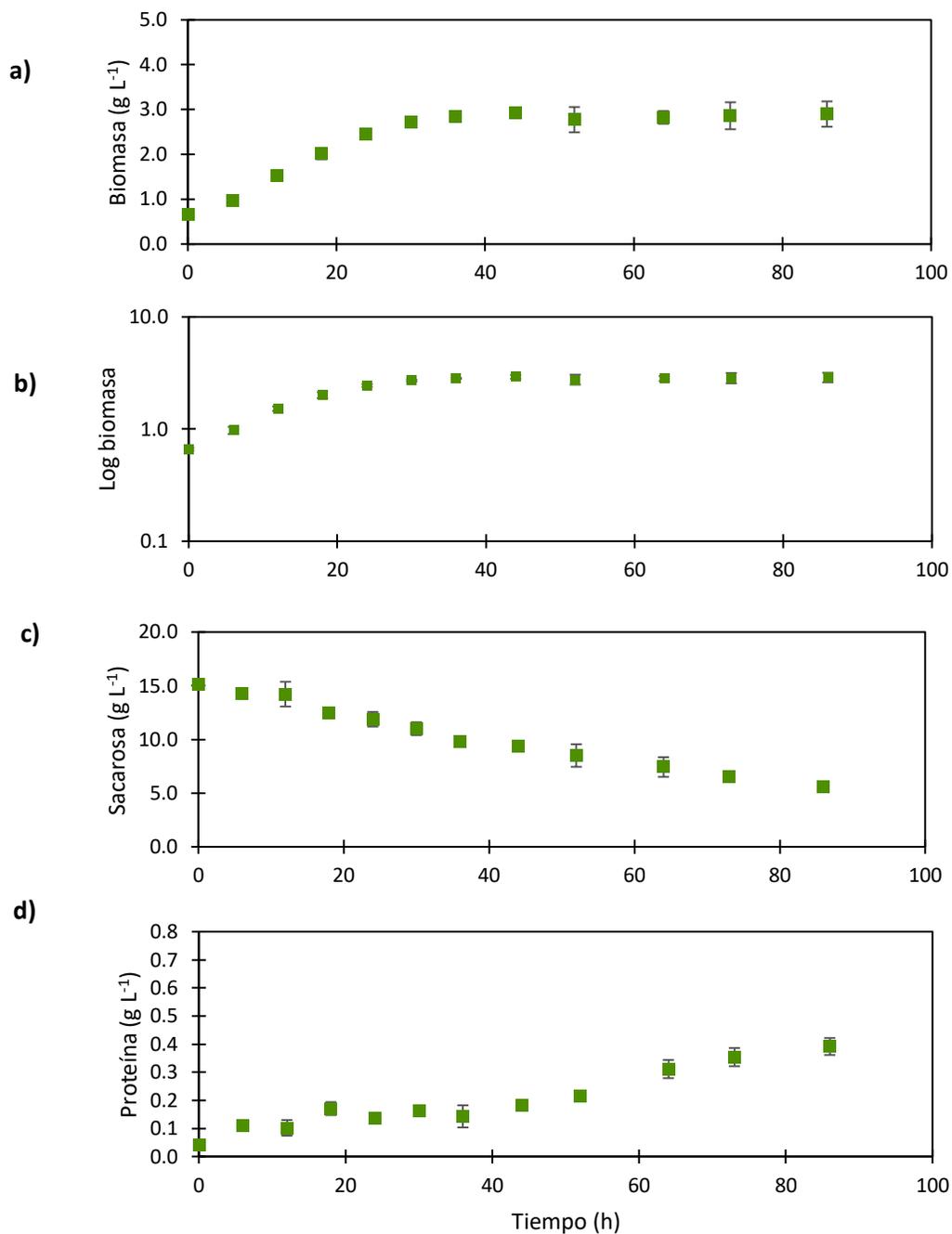


Figura 22. Parámetros cinéticos monitoreados fuera de línea para la condición de 240 rpm de la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* a) Biomasa b) Log biomasa c) Sacarosa residual d) Proteína.

En la figura 22 (a) se presenta la cinética de crecimiento con base en biomasa y en la figura 22 (b) se presenta en escala logarítmica. El crecimiento se comportó de forma lineal entre el inicio del cultivo y las 36 h, alcanzando una biomasa de alrededor de $2.84 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ desde las 36 h de cultivo y permaneciendo prácticamente constante a las 86 h ($2.90 \pm 0.28 \text{ g L}^{-1}$). En la figura 22 (c) se presenta la evolución del consumo de sacarosa para el cultivo a 240 rpm, donde se observa que se consumieron $9.5 \pm 0.3 \text{ g L}^{-1}$ de los $15.1 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$ disponibles. El rendimiento de biomasa con respecto a sustrato fue de $0.24 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sacarosa}}$. La velocidad específica de crecimiento con respecto a biomasa siendo esta de $0.053 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$.

La concentración de proteína para los cultivos bajo la condición de 240 rpm corresponde a la concentración de biomasa, alcanzando un máximo de $0.39 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ (86 h de cultivo), correspondiente aproximadamente a $13.5 \pm 0.3 \%$ del peso seco de la bacteria (Figura 22 d).

En las figuras 23 (a) y (b) se presenta la evolución de la producción de P3HB y el porcentaje de acumulación, respectivamente.

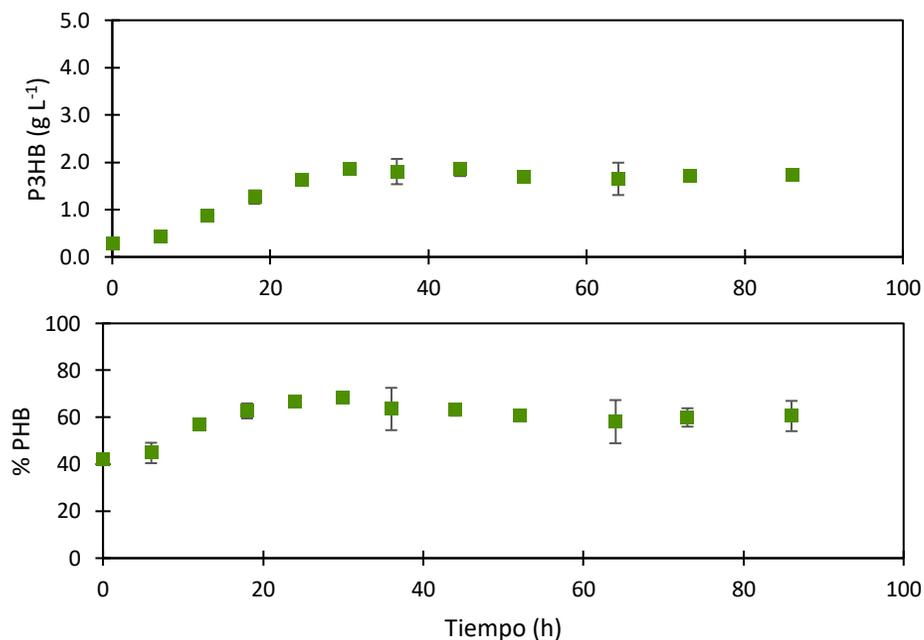


Figura 23. Parámetros cinéticos de producción de P3HB para la condición de 240 rpm de la cepa *phbZ1⁻* de *A. vinelandii* a) Concentración de P3HB y b) % de acumulación de P3HB.

Para esta velocidad de agitación ($VTO_{max} = 3.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), el título máximo de producción fue de $1.85 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ a las 30 h de cultivo. La acumulación inicial de P3HB en las células fue de alrededor de $56.9 \pm 0.7 \%$ a las 12 h; conforme el cultivo fue avanzando, se alcanzó un máximo de $68.3 \pm 1.3 \%$ de acumulación de P3HB con respecto a la biomasa, a las 30 h y se mantuvo en el intervalo de 58 a 60% el resto del cultivo. El rendimiento de P3HB con respecto a la biomasa es igual a $0.77 \pm 0.03 \text{ g}_{P3HB} / \text{g}_{biomasa}$ y con base en el sustrato de $0.38 \pm 0.05 \text{ g}_{P3HB} / \text{g}_{sacarosa}$.

Después de haber analizado estas tres condiciones de transferencia de oxígeno se pueden resaltar que, a una menor transferencia de oxígeno alcanzada, la acumulación del polímero también es menor. Este es un comportamiento que no se esperaba debido a que, como ya se explicó, la limitación de oxígeno favorece la producción del polímero. En este caso no es así, y el comportamiento de acumulación obedece más a lo ya observado por (Díaz-Barrera *et al.*, 2015), donde un mayor valor de VTO_{max} ($10.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), se obtuvo una mayor acumulación de P3HB ($\sim 65.0 \%$) en comparación a la condición de $7.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ donde la acumulación fue de $\sim 45.0\%$ con la cepa OP de *A. vinelandii*. Otra diferencia con trabajos previos en los cuales, una mayor acumulación de P3HB se observa a menor transferencia de oxígeno, puede deberse a las diferencias en el medio de cultivo, ya que en estudios anteriores (García *et al.*, 2014) se utilizó amonio como fuente de nitrógeno, y tanto en el presente estudio, como en el de Díaz-Barrera *et al.* (2015), los cultivos fueron suplementados con extracto de levadura.

Sin embargo, el comportamiento en estas condiciones de cultivo parece indicar una dicotomía o *trade-off* entre el título de producción de P3HB y el peso molecular, es decir, la disminución de la concentración final del P3HB está correlacionada con un aumento significativo del peso molecular del mismo. Esto podría explicarse tomando en cuenta que la célula busca siempre economizar energía. Es posible que resulte energéticamente favorable que la PHB sintasa, en vez de iniciar la síntesis nuevas moléculas de P3HB, aumente la longitud de la molécula que ya se encuentra en el sitio activo de la enzima. Esta hipótesis podría comprobarse mediante ensayos más específicos, tales como un análisis de flujo metabólico, como se ha hecho previamente con otras cepas de *A. vinelandii* (García *et al.*, 2018), para evaluar la concentración de cofactores (NADH/NAD^+ y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$) así

como de los intermediarios del ciclo de síntesis del polímero, y así poder elucidar su contribución en el peso molecular del P3HB bajo estas condiciones de transferencia de oxígeno y con las cepas OP y phbZ1⁻.

A continuación en la Tabla 3 se presenta un resumen de los parámetros cinéticos de los cultivos llevados a cabo en biorreactor para ambas cepas. El porcentaje de tensión de oxígeno disuelto corresponde al promedio durante la fase exponencial de cada cultivo.

Tabla 3. Resumen de parámetros cinéticos.

Condición	Cepa OP		Cepa phbZ1 ⁻		
	500 rpm 8 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	300 rpm 5 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	500 rpm 11 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	300 rpm 5 mmol L ⁻¹ h ⁻¹	240 rpm 3.7 mmol L ⁻¹ h ⁻¹
VTO _{max}					
% TOD (promedio fase exponencial)	~ 1	~ 0.5	~ 1	~ 0.5	~ 0.2
μ (h ⁻¹)	0.080 ± 0.002	0.024 ± 0.003	0.106 ± 0.002	0.063 ± 0.003	0.053 ± 0.007
Y _{x/sac} (g g ⁻¹)	0.33 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.24 ± 0.04
P3HB (g L ⁻¹)	4.16 ± 0.38	1.69 ± 0.31	4.49 ± 0.13	3.03 ± 0.31	1.85 ± 0.01
Sacarosa consumida (g L ⁻¹) (% del total disponible)	13.8 ± 0.2 (94.5 %)	7.2 ± 0.5 (49.8 ± 2.6)	14.4 ± 0.2 (95.4 %)	9.5 ± 0.4 (64.2 %)	9.5 ± 0.3 (62.9 %)
Y _{P3HB/sac} (g g ⁻¹)	0.28 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.04	0.38 ± 0.05
% P3HB máximo (Tiempo de cultivo)	88.9 ± 4.6 (32 h)	59.5 ± 3.2 (24 h)	94.6 ± 2.0 (36 h)	82.8 ± 3.3 (46 h)	68.3 ± 1.3 (30 h)
q _p (mg _{P3HB} /g _x h)	24.3 ± 1.8	8.0 ± 1.28	26.3 ± 0.5	10.5 ± 0.8	22.8 ± 0.5
Q _p (g _{P3HB} /L _x h)	0.12	0.02	0.13	0.04	0.02

La productividad específica fue mayor con la cepa phbZ1⁻ en la condición de más alta transferencia (26.3 ± 0.05 mg_{P3HB}/g_x h) seguido de la cepa OP en la misma condición (24.3 ±

1.8 $\text{mg}_{\text{P3HB}}/\text{g}_{\text{x}}\text{h}$). La producción volumétrica máxima ($0.13 \text{ g}_{\text{P3HB}} / \text{L}_x \text{ h}$) fue alcanzada por la cepa phbZ1^- también en la condición de $11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La mayor producción de P3HB con la cepa phbZ1^- , se debió a una mayor acumulación del polímero, ya que en términos de rendimiento con base en el sustrato no hubo diferencias significativas entre cepas ($0.29 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{P3HB}}/\text{g}_{\text{sac}}$ con la cepa phbZ1^- , comparada con $0.28 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{P3HB}}/\text{g}_{\text{sac}}$ la cepa OP).

Los resultados también muestran que el rendimiento global de biomasa con base en el consumo de sacarosa es similar para diferentes VTO_{max} (Tabla 3), es decir, asimilan de manera similar la fuente de carbono; sin embargo, es la VTO_{max} , la condición que controla la cantidad de fuente de carbono que es utilizada para la producción del polímero.

Los cultivos llevados a cabo en biorreactor permitieron caracterizar por primera vez la cinética de crecimiento de las cepas OP y phbZ1^- sin llevar a cabo el control del % TOD bajo condiciones microaerófilas.

Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación del peso molecular del P3HB producido por ambas cepas a 300 y 500 rpm y la condición adicional para la cepa phbZ1^- de 240 rpm. En la Figura 24 se presentan los pesos moleculares promedio de P3HB para cada cultivo.

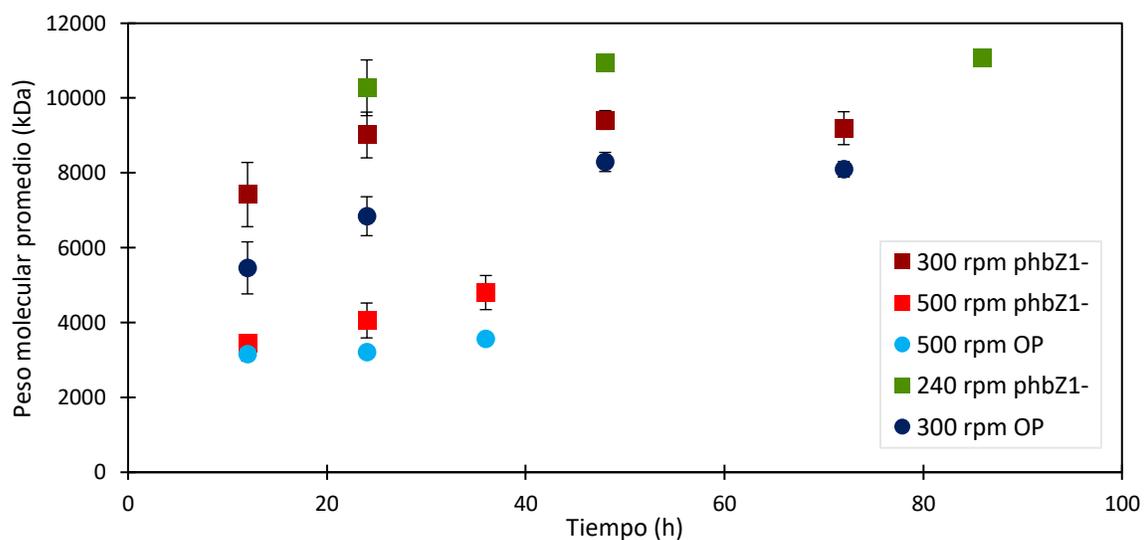


Figura 24. Peso molecular promedio a diferentes tiempos de cultivo para las cepas OP y phbZ1^- de *A. vinelandii* a 300 rpm (la VTO_{max} para ambos cultivos fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y 500 rpm (VTO_{max} con la cepa OP fue igual a $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y para la cepa phbZ1^- fue igual a $11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Para la cepa phbZ1^- la VTO_{max} a 240 rpm fue de $3.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

En la figura 24 se observa cómo en los cultivos desarrollados a menor transferencia de oxígeno, resultan en polímeros de ultra alto peso molecular. En la condición de 240 rpm con

la cepa phbZ1⁻, donde la VTO_{max} fue de 3.7 mmol L⁻¹ h⁻¹ se obtuvo el P3HB de mayor peso molecular en el intervalo de 10,276 kDa a los 11,077 kDa. Obedeciendo a esta tendencia, en la condición de 300 rpm (5 mmol L⁻¹ h⁻¹) con ambas cepas se obtuvieron pesos moleculares promedio significativamente más altos que en los cultivos a 500 rpm.

Los pesos moleculares para la cepa phbZ1⁻ en la condición de 300 rpm fueron a las 24 h de alrededor de 9,000 kDa, aumentando ligeramente hasta las 48 h (9,400 kDa) y manteniéndose prácticamente constantes hasta las 72 h de cultivo (9,200 kDa). Bajo esta misma condición, pero utilizando la cepa OP, se obtuvieron pesos moleculares al inicio del cultivo de alrededor de 6,800 kDa, comportándose de forma similar a la cepa phbZ1⁻ incrementando hacia las 48 horas del cultivo hasta llegar a los 8,300 kDa y cayendo ligeramente hacia las 72 h a un valor de 8,100 kDa.

Por otro lado, en la condición de 500 rpm se observa que los pesos moleculares del P3HB alcanzados son significativamente menores (entre 3,400 y 4,800 kDa) para la cepa phbZ1⁻ y de 3,100 a 3500 para la cepa OP.

En la figura 25 se muestra el gráfico con la distribución de pesos moleculares para el PMP máximo obtenido en cada condición de cultivo con ambas cepas.

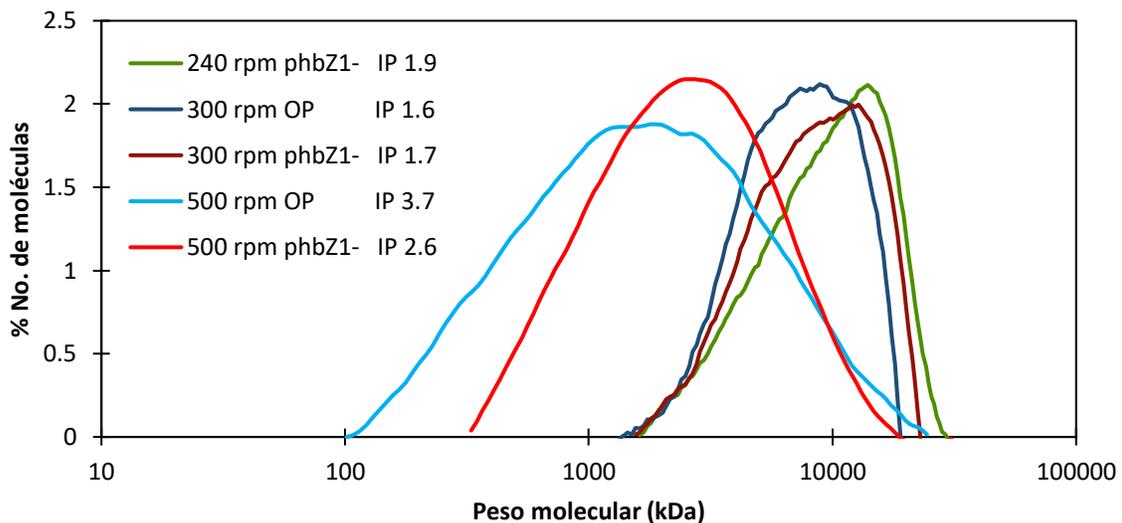


Figura 25. Distribución de pesos moleculares promedio máximos del P3HB para las cepas OP y phbZ1⁻ de *A. vinelandii* a 240, 300 rpm y 500 rpm. En el panel izquierdo se puestran los índices de polidispersión para cada condición.

Los gráficos de distribución de la figura 25, ilustran la proporción de moléculas con respecto

a su peso molecular de P3HB en el tiempo de cultivo donde se obtuvo el máximo de PMP. Es claro que en las condiciones de mayor transferencia (500 rpm) a las 36 h de cultivo (tiempo final), tanto en la cepa OP como en la mutante *phbZ1⁻* la distribución de moléculas de diferentes pesos moleculares es muy heterogénea, teniendo un índice de polidispersión de 3.7 y 2.6, respectivamente; a pesar de que en este tiempo de cultivo se produjo el P3HB con el PMP más alto para ambas cepas. En el caso de la cepa OP es posible que se esté dando una depolimerización del P3HB por actividad principalmente de la depolimerasa, ya que alrededor del 50% de las moléculas de P3HB pertenecen a la familia de pesos moleculares en el intervalo de 100 a 1000 kDa. Por otro lado, para la cepa *phbZ1⁻* la distribución es más homogénea, y con moléculas que corresponden a pesos moleculares mayores, ya que el 50% de las moléculas para esta cepa se ubican en el intervalo de 300 a 3,000 kDa.

En el caso de la condición de transferencia de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (alcanzada a 300 rpm), el índice de polidispersión fue muy similar para ambas cepas, lo cual es congruente con los PMP obtenidos; para la cepa OP el IP fue de 1.6 y para la *phbZ1⁻* fue de 1.7. Para la cepa OP la distribución del peso molecular del P3HB producido en esta condición fue de 1,300 a los 18,000 kDa; mientras que para la *phbZ1⁻* se encontraban en el intervalo de los 1,600 a los 24,000 kDa.

Para la condición de menor transferencia evaluada únicamente para la cepa *phbZ1⁻* (240 rpm), el índice de polidispersión fue de 1.9, encontrándose moléculas de P3HB que oscilan entre los 1,600 hasta los 29,500 kDa. Por esta razón, fue la condición que dio como resultado polímeros con el PMP más alto.

Con el propósito de entender mejor los mecanismos mediante los cuales se están generando pesos moleculares tan altos bajo condiciones cada vez más extremas de microaerofilia, se decidió realizar análisis de actividad enzimática de algunas de las proteínas involucradas en el ciclo de síntesis y degradación del P3HB, los cuales se realizaron por triplicado biológico (3 biorreactores de cada condición) y a su vez, por triplicado metodológico (ensayo enzimático). En la figura 26 se muestran los datos de actividades enzimáticas para 3 enzimas de síntesis β -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y P3HB sintasa, así como la actividad depolimerasa para todos los cultivos realizados en biorreactor.

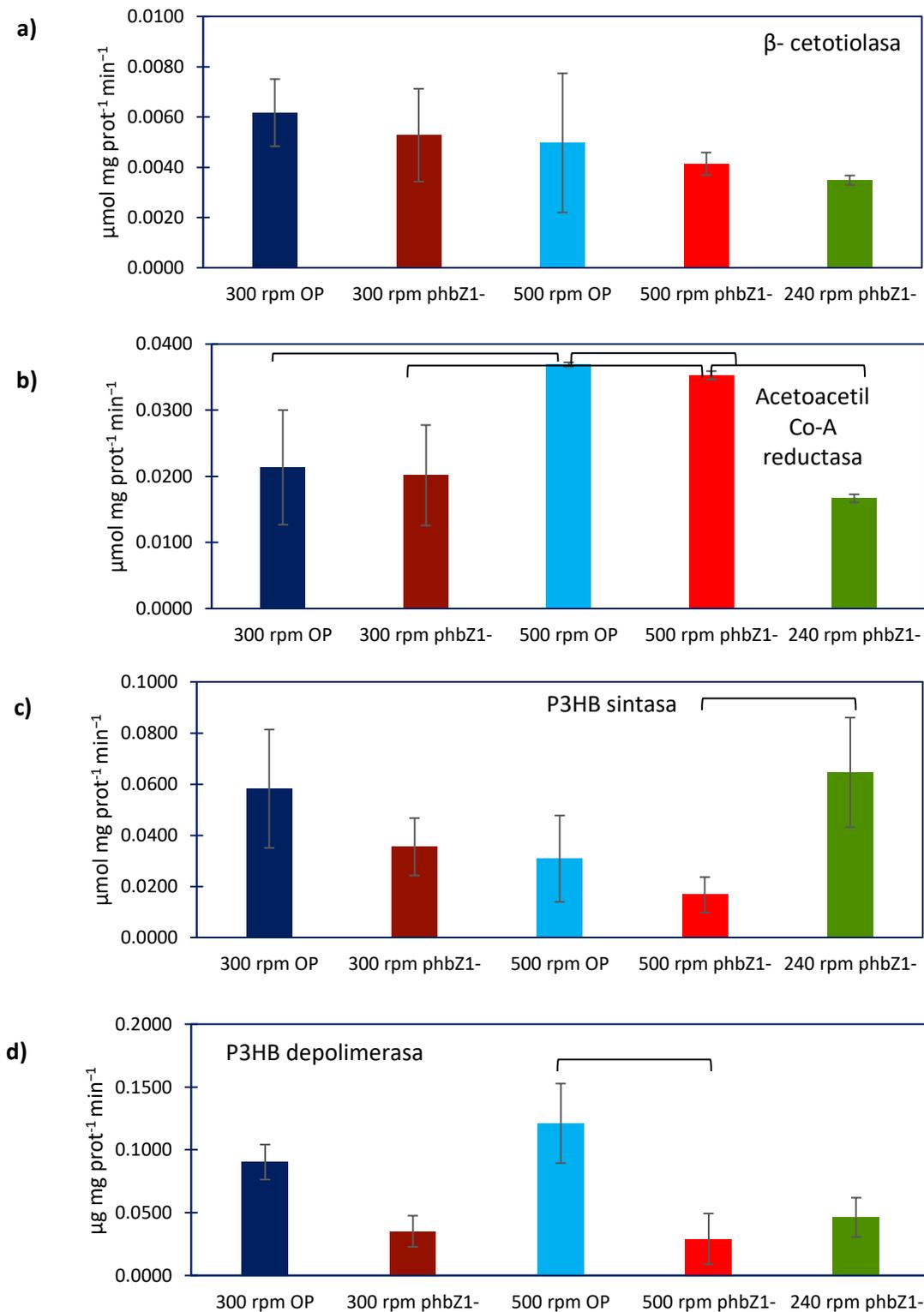


Figura 26. Actividades enzimáticas que participan en el ciclo del P3HB durante la fase exponencial de los cultivos de *A. vinelandii* OP y phbZ1- de *A. vinelandii* a 240, 300 rpm y 500 rpm. Para β -cetotiolasa (a), acetoacetyl-CoA reductasa (b), P3HB sintasa (c) 1 unidad (U) se definió como $\mu\text{mol min}^{-1}$. Para la actividad P3HB depolimerasa (d) 1 unidad (U) se definió como $\mu\text{g min}^{-1}$. Las llaves indican diferencia significativa entre pares de datos, pruebas estadísticas en Anexo 1.

En el Anexo 1, se encuentran las pruebas estadísticas de los resultados obtenidos en los ensayos de actividades enzimáticas.

Como se puede observar en la figura 26 a) la actividad β -cetotiolasa, que es la primera enzima del operón *phbBAC* para la síntesis de P3HB, es muy similar para ambas cepas, tanto en las condiciones de más baja como de alta transferencia. Se realizaron pruebas estadísticas de t de Student para observar si existe diferencia significativa entre condiciones de transferencia y cepas, con un valor de significancia del 95 % ($p= 0.05$), si la p de la prueba resulta mayor a este valor, no existe diferencia significativa entre los resultados (Anexo 1, Tabla 4). Después de realizar los análisis estadísticos se concluyó que no existía diferencia significativa entre las condiciones evaluadas ni entre las cepas para la actividad beta-cetotiolasa; por lo que los resultados de este ensayo no son suficiente prueba para justificar las diferencias tanto en el porcentaje de acumulación del P3HB como de su peso molecular.

En la figura 26 b) se muestra la actividad de la enzima acetoacetyl-CoA reductasa, que corresponde a la segunda enzima de síntesis de P3HB. Claramente, se observa una actividad estadísticamente aumentada de esta enzima con ambas cepas bajo condiciones de alta transferencia, lo que podría indicar que el ciclo de síntesis de P3HB se encuentra más activo a 500 rpm (Anexo 1, Tabla 5). No se observaron diferencias significativas entre las cepas para la condición de 300 rpm; sin embargo, si se observan en la condición de 500 rpm. Al comparar la condición de menor transferencia de oxígeno (240 rpm) para la cepa *phbZ1⁻* con la actividad medida a 300 rpm no existió diferencia significativa. Sin embargo, al comparar con la condición de mayor transferencia sí existe una clara diferencia significativa (Anexo 1, Tabla 5). La actividad aumentada de esta enzima bajo la condición de alta transferencia podría indicar que el ciclo de síntesis de P3HB se encuentra más activo bajo esta condición independientemente de la cepa.

En la figura 26 c) se muestran los niveles de actividad de la P3HB sintasa, que corresponde a la enzima que polimeriza el P3HB. La actividad más alta es la que se da en las condiciones de más baja transferencia, para 240 rpm con la cepa *phbZ1⁻* y corresponde a 0.0646 ± 0.0214 U/ mg proteína. Para esta enzima sólo se encontraron diferencias significativas entre la condición de 240 rpm y 500 rpm con la cepa *phbZ1⁻* (Anexo 1, Tabla 6). La actividad visiblemente aumentada en la condición de muy baja transferencia podría estar relacionada

con los altos pesos moleculares encontrados.

La actividad P3HB depolimerasa se muestra en la Figura 26 d). La actividad más alta es la que se da en las condiciones de más alta transferencia, para 500 rpm con la cepa OP y corresponde a 0.1210 ± 0.0317 U/mg proteína. En el caso de la cepa *phbZ1⁻*, como era de esperarse, la actividad depolimerasa se vio disminuida en gran medida siendo 0.0291 ± 0.0202 U/mg proteína a 500 rpm. Al realizar el análisis estadístico se observó que sí hubo diferencia significativa a esta condición de transferencia entre ambas cepas (Anexo 1 Tabla 7). Sin embargo, no se encontraron diferencias bajo las condiciones de baja transferencia de oxígeno entre ambas cepas. Con base en estos resultados, la actividad depolimerasa parece ser la responsable de la diferencia en los pesos moleculares del P3HB a diferentes condiciones de transferencia de oxígeno.

En los estudios realizados previamente en nuestro grupo de investigación (Millán *et al.*, 2016) reporta que, en cultivos en biorreactor de 3 L con la cepa OP, a bajas velocidades de transferencia de oxígeno ($6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), controlando el oxígeno a 1 % TOD y con una agitación de 500 rpm, se alcanzó una acumulación de P3HB del 80 %, en comparación al valor que se obtiene en los cultivos a una alta transferencia de oxígeno ($32 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 15 % TOD) donde se alcanzó 45 % de P3HB.

Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con lo ya reportado por Millán y colaboradores (2016), ya que a mayor transferencia se acumuló más P3HB. Por ejemplo, a 500 rpm se alcanza, durante la fase exponencial, también 1 % TOD para la cepa OP y hasta 1.7 % TOD para la cepa mutante *phbZ1⁻* y una $V_{TO \text{ max}} = 8$ y $11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y una acumulación máxima de P3HB de 88 y 94 %, respectivamente. Es posible que este comportamiento se debe a la transferencia total que se está suministrando en cada sistema.

Se probó una segunda condición de transferencia de oxígeno, inédita para las dos cepas, bajo condiciones sin control de oxígeno en biorreactor, con una velocidad de agitación de 300 rpm. Durante la fase exponencial, se alcanzó 0.5 % TOD para la cepa OP y cerca de 0.3-0.9% de TOD para la cepa mutante *phbZ1⁻*, la $V_{TO \text{ max}} = 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en ambas cepas; la acumulación máxima del polímero fue de 56 % para la cepa OP y 82 % para la cepa *phbZ1⁻*. En la tercera condición de transferencia bajo una agitación de 240 rpm probada únicamente con la cepa *phbZ1⁻*, la $V_{TO \text{ max}}$ fue de $3.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, estando el oxígeno disuelto en valores

muy cercanos a 0.2 %, esta condición dio como resultado una acumulación de P3HB cercana a 68 %. Nuevamente observándose el fenómeno de acumulación aumentada de P3HB al disminuir la VTO_{max} del cultivo.

Los cultivos en biorreactor en todos los casos mostraron condiciones de limitación de oxígeno durante el crecimiento bacteriano, esto se demuestra en los perfiles de TOD y de evolución de la VTO. En todos los casos se presentó un porcentaje de acumulación de P3HB considerado alto (mayor al 80%), los cuales están en concordancia con estudios previos (Castillo *et al.*, 2013; Díaz-Barrera *et al.*, 2015; García *et al.*, 2014), con excepción de la cepa OP a 300 rpm y la *phbZ1⁻* a 240 rpm, donde la acumulación máxima fue de 56 % y 68 %, respectivamente.

La producción de P3HB en dichos cultivos estuvo directamente asociada al crecimiento. En los cultivos a 500 rpm (VTO_{max} 8 y 11 $mmol L^{-1} h^{-1}$) se obtuvo una mayor velocidad específica de crecimiento, por lo que, tanto la concentración de biomasa como de P3HB fueron mayores, comparadas con los cultivos realizados a una menor $VTO_{max} = 5 mmol L^{-1} h^{-1}$. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en biorreactor de 3 L con la cepa OP, donde se observó este mismo fenómeno; cuando la condición de agitación se incrementó de 500 rpm ($VTO_{max} = 7 mmol L^{-1} h^{-1}$) a 600 rpm ($VTO_{max} = 9.5 mmol L^{-1} h^{-1}$), la acumulación de P3HB incrementó de 46% a 65% con base en peso seco (Díaz-Barrera *et al.*, 2015).

Una de las aportaciones importantes de este estudio consiste en la relación inversa que se encontró entre la acumulación de P3HB y el peso molecular del mismo. Con respecto a los valores de peso molecular y la condición de agitación utilizada en los cultivos en biorreactor, sólo se tienen antecedentes en condiciones de limitación de oxígeno controlado a 1 % de TOD y una VTO_{max} de 6 $mmol L^{-1} h^{-1}$. En dichos cultivos se alcanzaron pesos moleculares entre 3,000 y 6,000 kDa, dependiendo del tiempo de cultivo y la cepa (Millán *et al.*, 2016).

Con los resultados descritos hasta ahora es posible establecer una correlación entre algunos parámetros cinéticos y el peso molecular obtenido. De manera general, se puede concluir que a una baja VTO_{max} de 5 $mmol L^{-1} h^{-1}$, la cual fue alcanzada con una agitación de 300 rpm (% TOD= 0.5 para la cepa OP y 0.3 a 0.9 % para la cepa *phbZ1⁻*, en fase exponencial), resulta en una menor acumulación del polímero (56 % para la cepa OP y 82% para la cepa *phbZ1⁻*), esto tiene un impacto también tanto en los títulos de producción como en la productividad

volumétrica del mismo (Tabla 1). Los pesos moleculares obtenidos para estos cultivos, fueron los más altos reportados hasta ahora ($\sim 8,300$ kDa para la cepa OP y $\sim 9,400$ para la cepa phbZ1⁻). La baja concentración de oxígeno en estos cultivos parece estar influyendo positivamente las enzimas de síntesis del polímero para que generen un producto de mayor peso molecular, sacrificando por otro lado su producción.

Por otro lado, cuando los cultivos se conducen a más alta $VTO_{max} = 8 - 11 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, (500 rpm, % TOD = 1 % para la cepa OP y 1 a 1.7 % para la cepa phbZ1⁻ durante la fase exponencial), se tiene un comportamiento inverso. A esta condición, se favorece la acumulación del polímero (88 % para la cepa OP y 94 % para la cepa phbZ1⁻). Para estos cultivos, los pesos moleculares máximos fueron de $\sim 3,500$ kDa para la cepa OP y $\sim 4,800$ para la cepa phbZ1⁻. Bajo estas condiciones de cultivo, se puede estar favoreciendo el flujo de la vía de biosíntesis de P3HB de manera que se incrementa su producción, pero en detrimento de su peso molecular.

En un estudio previo sobre las P3HB sintasas, se sugirió que la sintasa de clase I, como la que está presente en *A. vinelandii* es más *procesiva*, es decir, que genera moléculas de mayor longitud sin reiniciar el proceso para generar nuevas moléculas de P3HB, que las sintasas de clase II o clase III (Tian *et al.*, 2005). Esto se debe a que, cuando existe una proporción aumentada de sustrato con respecto a la enzima (S/E alto), el 3-hidroxiacil-CoA está disponible para cargar a toda la enzima presente; la polimerización puede ser procesiva de tal modo que no se detecten intermediarios y los oligómeros ya preformados no puedan ser extendidos, sino únicamente se generan cadenas *de novo* de forma ininterrumpida. También se sugiere que la sintasa de clase I, también tiene actividad hidrolasa, la cual le permite controlarse a sí misma y modular el tamaño del polímero y su reiniciación (Tian *et al.*, 2005).

Dados estos antecedentes, una posibilidad sería que, en condiciones de microaerofilia, y en las condiciones específicas de este estudio, la sintasa se regula a sí misma de tal forma que es muy procesiva y no hace uso de su actividad hidrolasa, como lo haría cuando se encuentra en condiciones de mayor transferencia de oxígeno. Esto también podría estar relacionado con la actividad aumentada que observamos en los análisis enzimáticos a baja transferencia de oxígeno con ambas cepas (Figura 26); sin embargo, al no haber diferencia

significativa entre ambas cepas a 300 rpm, la diferencia en el peso molecular es resultado de la actividad simultánea de la depolimerasa, en el caso de la cepa OP.

Se realizó una tercera condición de transferencia únicamente con la cepa phbZ1⁻, donde se alcanzó una VTO_{max} más baja de 3.7 mmol L⁻¹ h⁻¹, la acumulación de P3HB fue menor al la del cultivo llevado a cabo a 300 rpm donde el porcentaje de P3HB máximo fue de 82 %, pero oscilaba entre 64 y 80% a lo largo del cultivo; en este caso la acumulación se mantuvo prácticamente constante en el intervalo de 56 % y 60% al final del cultivo, alcanzando un máximo a las 30 h.

En esta condición de cultivo se obtuvo un polímero con el peso molecular más alto 11,077 kDa. Esto podría tener ventajas en términos de mayor resistencia mecánica, particularmente para aplicaciones biomédicas. Por lo tanto, desde una perspectiva tecnológica, una de las aportaciones de este trabajo es la posibilidad de producir polímeros de P3HB de un peso molecular específico mediante la manipulación de la VTO.

Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de que se puede obtener P3HB de un peso molecular muy alto a una baja VTO_{max}, la concentración del polímero obtenida (1.7 g/L) bajo esta condición aún está lejos de ser de interés comercial a nivel industrial; para poder incrementar el rendimiento del P3HB sin comprometer el peso molecular, se deben implementar estrategias alternativas de fermentación (mejoras en el medio de cultivo, implementación de un quimiostato o, una estrategia mixta que inicialmente maximice la producción de biomasa y posteriormente favorezca la acumulación de P3HB de alto peso molecular) . Por otro lado, si el interés es producir P3HB con pesos moleculares en el intervalo de los 3,000-4,000 kDa, un incremento en la VTO llevaría a un incremento considerable en el rendimiento de P3HB con respecto a la sacarosa.

En el género *Azotobacter* la presencia de P3HB es considerada una evidencia importante para el enquistamiento (Chowdhury *et al.*, 2018; Sadoff, 1975; Setubal *et al.*, 2009). Los resultados muestran que una tasa respiratoria menor, que es la que se obtiene cuando la VTO es más baja, sugiere que un incremento en el peso molecular de P3HB puede ser una respuesta de la bacteria para sobrevivir bajo condiciones nutricionales adversas en ambientes naturales, donde la limitación de oxígeno es común.

Con respecto a los resultados obtenidos en los experimentos con matraces agitados, se puede comparar el peso molecular promedio con respecto a la VTO máxima del cultivo obtenido con los cultivos en biorreactor (Figura 27).

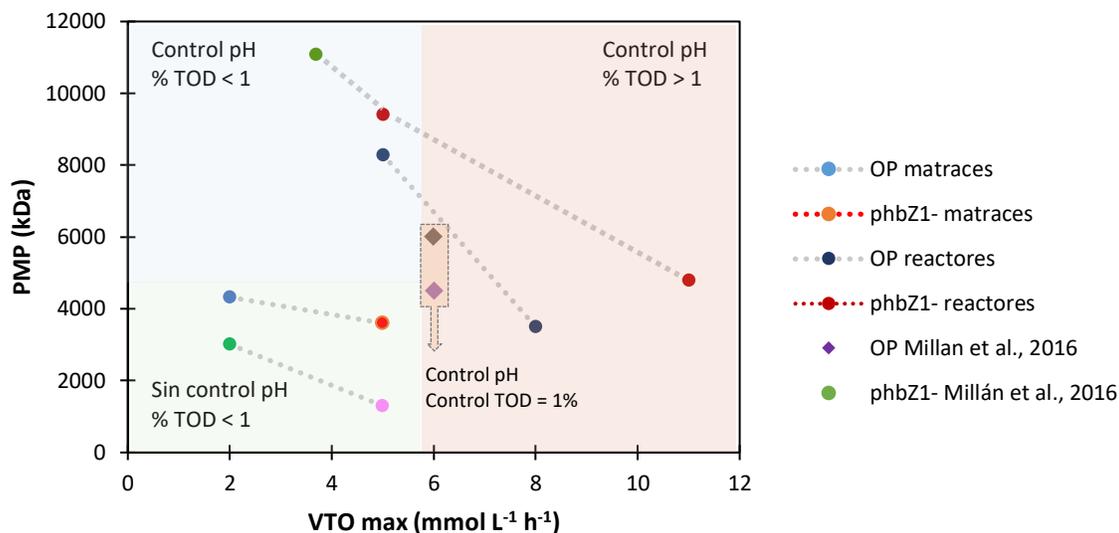


Figura 27. Peso molecular promedio para las cepas OP y phbZ1⁻ de *A. vinelandii* en cultivos en biorreactor a 240 rpm, 300 rpm, 500 rppm, cultivos con matraces y de estudios previos en biorreactor en función de la VTO max alcanzada en cada condición de cultivo.

Como se puede observar en el cuadrante verde de la figura 27, donde se encuentran los PMP de los cultivos en matraces agitados, es claro que, a pesar de haberse llevado a cabo en condiciones de transferencia consideradas de microaerofilia, no se obtienen los pesos moleculares que se alcanzan en los polímeros generados en biorreactor bajo condiciones de transferencia de oxígeno en valores cercanos. Una de las diferencias principales entre los cultivos en matraces y en biorreactor es el control del pH. En cultivo con matraces no puede llevarse a cabo el control y monitoreo de este parámetro; mientras que en biorreactor se lleva a cabo la adición automática de NaOH 2 N para controlar el pH en un valor de 7.2 medido en línea; por lo que este parámetro en el medio de cultivo podría estar teniendo un importante efecto sobre los procesos de síntesis y degradación, dando como resultado un polímero de peso molecular más bajo.

Por otra parte, existen diferencias sobre la transferencia de oxígeno total que se suministra en biorreactor contra la que se da en matraces agitados. A pesar de que la VTO_{max} que se alcanza en matraces con capacidad de 500 mL con un volumen de llenado de 100 mL es de 5 mmol L⁻¹ h⁻¹ y la que se alcanza con un volumen de llenado de 200 mL es de 2 mmol L⁻¹ h⁻¹

¹, la velocidad de transferencia de oxígeno total o acumulada que se suministra a lo largo del cultivo es mayor. En la figura 28 a continuación se muestra un ejemplo de esto, en el biorreactor, se calculó que la $VTO_{m\acute{a}x}$ en la fase exponencial de cultivo fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 300 rpm con la cepa OP. Sin embargo, se puede observar que al realizar la sumatoria de la transferencia de oxígeno en dicho sistema a las 60 h de cultivo da una sumatoria de $571 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por otro lado, utilizando un equipo de respirometría para matraces agitados, en un cultivo donde la VTO máxima también fue de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, se puede observar que la sumatoria de la VTO a las 60 h de cultivo da como resultado $702 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Este fenómeno es una evidencia de que los matraces agitados y los biorreactores tanque agitado son sistemas muy diferentes en términos de la cantidad de oxígeno que pueden suministrar a las células que se encuentran dentro del mismo medio de cultivo. Es por ello, que resulta complicado en muchos procesos biotecnológicos que tienen como punto crítico la transferencia de oxígeno tratar de escalar o igualar los procesos que se dan en matraz hacia biorreactor.

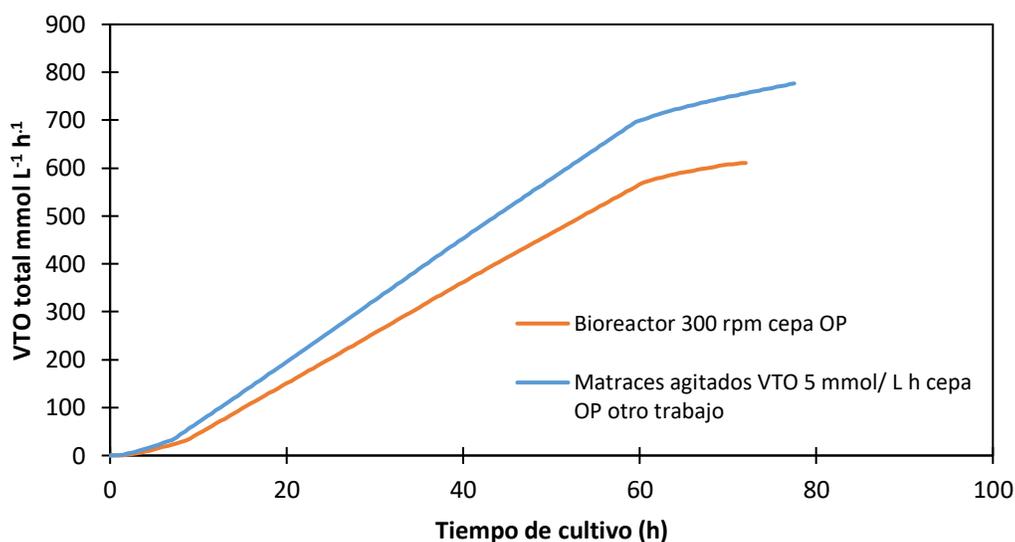


Figura 28. Velocidad de transferencia de oxígeno total suministrada en dos sistemas de cultivo: matraces agitados y biorreactor de 3 L a 300 rpm utilizando la cepa OP (ambos con una $VTO_{m\acute{a}x}$ de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

Finalmente, es del interés de nuestro grupo de investigación tratar de mejorar la producción de poli-3-hidróxibutirato a una mayor escala obteniendo las mejores características posibles del material. Este trabajo tuvo como aportación elucidar si la transferencia de oxígeno juega un papel relevante en el grado de polimerización del P3HB producido por cepas mutantes de *A. vinelandii*. A continuación se sugiere un modelo mecanístico enfocado

al cultivo en biorreactor (Figura 29) con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se encontró un vínculo entre la VTO del cultivo y el peso molecular del P3HB, así como la influencia de las actividades enzimáticas sobre el mismo.

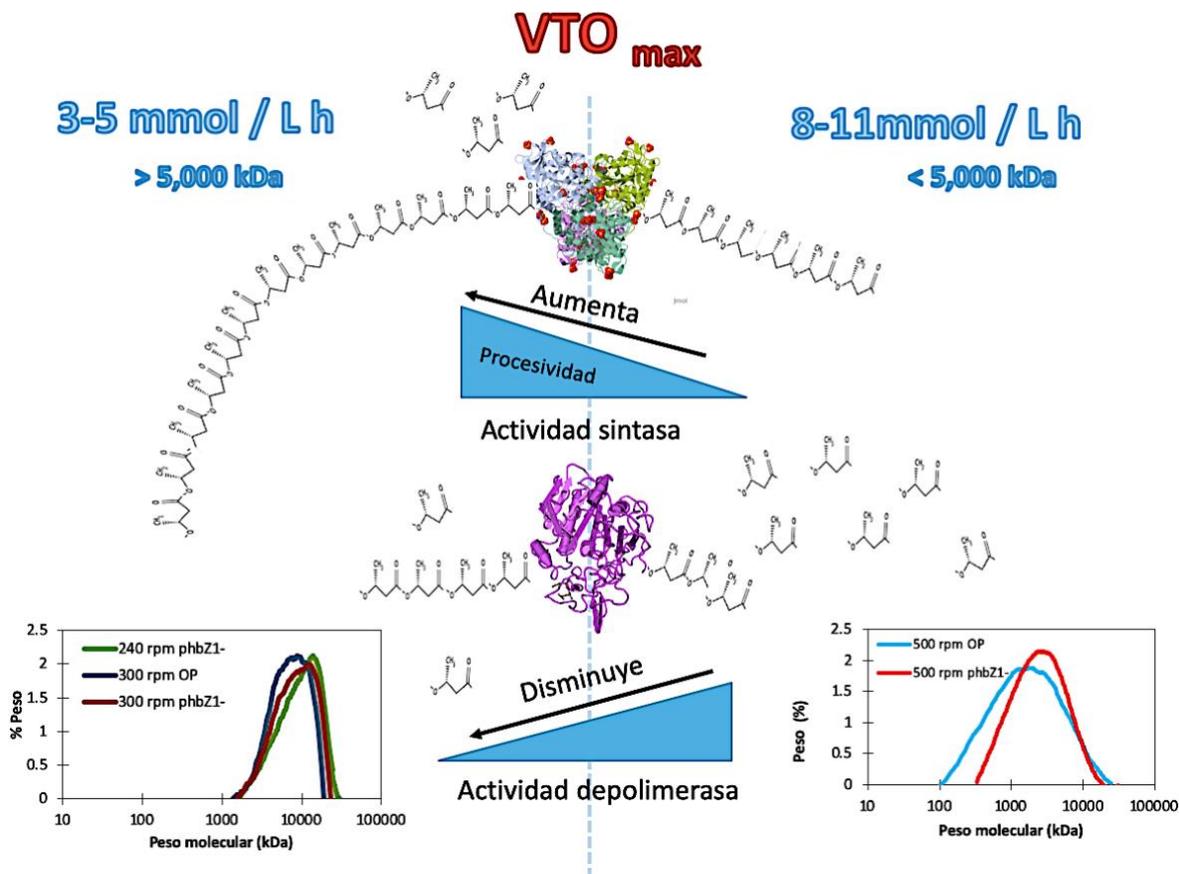


Figura 29. Modelo mecanístico sobre la influencia de la velocidad de transferencia de oxígeno máxima sobre el peso molecular del P3HB producido por las cepas OP y phbZ1- de *A. vinelandii* de cultivos en biorreactor.

Como se muestra en la figura 29, se encontró que en cultivos con biorreactor de 3 L, la VTO máxima determina los pesos moleculares del P3HB producido por la cepas OP y phbZ1-. La VTO máxima puede estar determinando la actividad incrementada de la enzima P3HB sintasa, haciéndola más procesiva e impidiendo su función hidrolasa sobre las cadenas del polímero, dando como resultado P3HB de ultra alto peso molecular. Por otro lado, la VTO también tiene un efecto sobre la actividad depolimerasa, es claro que en la condición de alta transferencia con la cepa OP existe una depolimerización importante y puede deberse a la presencia de la depolimerasa Z1. Sin embargo, en el caso de la cepa mutante, parece

ser que el PMP (mayor al de la cepa OP) resultante es consecuencia del efecto combinado de una baja actividad depolimerasa y una síntesis favorecida de moléculas de P3HB de alto peso molecular.

Conclusiones

Se determinó por primera vez el peso molecular del P3HB producido por la cepa phbZ1⁻ en cultivos en matraces agitados, observando que una menor transferencia de oxígeno en estos cultivos juega un papel relevante en la síntesis de polímeros de mayor peso molecular, en comparación con la cepa OP.

Con la cepa phbZ1⁻ se logró producir P3HB de mayor peso molecular del P3HB con respecto a la cepa OP y, además, se observó que a más bajas VTOs ($< 5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se incrementaron significativamente los pesos moleculares para ambas cepas y no únicamente para la cepa OP.

Se encontró que la producción y acumulación de P3HB en cultivos en biorreactor es dependiente de la VTO_{max} alcanzada en cada cultivo y de la cepa utilizada. A una mayor VTO_{max} y utilizando la cepa phbZ1⁻ se produce y acumula la mayor cantidad de polímero.

Los pesos moleculares del P3HB obtenidos en biorreactor de 3 L son mayores a los obtenidos en matraces, además que el peso molecular del P3HB aumenta significativamente en los cultivos llevados a cabo a VTO_{max} de 3.7 y 5 $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (11,077 y 9,400 kDa, respectivamente) con la phbZ1⁻ y (8,300 kDa) con la cepa OP y ; mientras que, a VTO_{max} entre 8 y 11 $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se obtienen pesos moleculares entre 3,000-4,800 kDa.

La determinación de la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación del P3HB fue de utilidad para plantear un modelo sobre el mecanismo de polimerización y depolimerización del P3HB bajo condiciones de microaerofilia donde, a una menor transferencia de oxígeno se favorece la síntesis de polímeros de ultra alto peso molecular y se disminuye la actividad depolimerasa.

Perspectivas

Realizar el cultivo en biorreactor a 240 rpm con la cepa OP para poder confirmar si existe el mismo comportamiento que se ha observado con la cepa *phbZ1⁻* donde, a medida que se disminuye la transferencia de oxígeno, se incrementa el peso molecular del polímero y determinar si la cepa OP produce un polímero con un peso molecular igual o menor que con la cepa *phbZ1⁻* en esta condición.

Con el objetivo de completar un modelo sobre la síntesis de P3HB de ultra alto peso molecular a baja transferencia de oxígeno, se desea realizar un análisis de expresión de los genes involucrados en la síntesis del P3HB a nivel transcripcional. Los genes a estudiar serían: *Avin23640* (β -cetotiolasa), *Avin23650* (Acetoacetyl-CoA reductasa), *Avin23630* (PHB sintasa), *Avin03910* (PHB depolimerasa).

Además, dicho modelo podría completarse mediante un análisis de flujo metabólico, para evaluar la concentración de cofactores (NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺) así como de los intermediarios del ciclo de síntesis del polímero, y su contribución en el peso molecular del P3HB bajo estas condiciones de transferencia de oxígeno y con las cepas OP y *phbZ1⁻*.

Realizar una optimización de la estrategia de cultivo en la que se favorezca inicialmente la producción de biomasa para maximizar la producción de P3HB y posteriormente, disminuir la transferencia de oxígeno para lograr un polímero de ultra alto peso molecular con un mejor rendimiento y productividad.

Realizar cultivos exploratorios en matraces y biorreactor con las 6 cepas mutantes para las depolimerasas restantes de *A. vinelandii* (en proceso de construcción en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología), de manera que se pueda comprobar el papel de cada una sobre el peso molecular del P3HB producido.

Bibliografía

- Adaya, L., Millán, M., Peña, C., Jendrossek, D., Espín, G., Tinoco-Valencia, R., Guzmán, J., Pfeiffer, & D., Segura, D. (2018). Inactivation of a new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(6):2693-2707.
- Agus, J., Kahar, P., Hyakutake, M., Tomizawa, S., Abe, H., Tsuge, T., Satoh, T., Tajima, K. (2010). Unusual change in molecular weight of polyhydroxyalkanoate (PHA) during cultivation of PHA-accumulating *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2250–2254. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.09.009>
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450–472.
- Aoyagi, Y., Doi, Y., Iwata, T. (2003). Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: Effects of annealing and two-step drawing. *Polymer degradation and Stability*, 79(2), 209-216.
- Asenjo, J. A., Schmidt, A. S., Andersen, P.R., Andrews, B.A. (1995). Effect of single nutrient limitation of poly- β -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes europus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 46(5).
- Babel W., & Steinbüchel, A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in *Biochemistry. Engineering. Biotechnology*. 1, 342.
- Bellenger, J., Wichard, T., Xu, Y., & Kraepiel, A. (2011). Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N₂-fixing bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1395–1411.
- Bocanegra, J. K., Pradella, J. G. C., da Silva, L. F., Tacir, o M. K. , Gomez, J. G. C. (2013). Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170(6), 1336–1347.
- Bonartsev, A., Boskhomdzhev, A., Voinova, V., Makhina, T., Myshkina, V., Yakovlev, S., Z., I., Filatova, E., Zernov, A., Bagrov, D., Andreeva, N., Rebrov, A., Bonartseva, G., & Iordanskii, A. (2012). Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its derivatives: Characterization and kinetic behavior. *Chemistry and Chemical Technology*, 6(4), 385–392.
- Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 91-98.
- Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K., & Peña M, C. F. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*, 48(7), 995–1003.
- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434.
- Chen, G. Q., & Wang, Y. (2013). Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, 31(5), 719–736.
- Chowdhury-Paul, S., Pando-Robles, V., Jiménez-Jacinto, V., & Segura, D. (2018). Proteomic analysis revealed proteins induced upon *Azotobacter vinelandii* encystment. *Journal of Proteomics*, (181) 47–59.

- Cornish, A., & Page, W. J. (1998). The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology*, 144(7).
- Dawes, E. (1988). Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer. *Bioscience Reports*, 8(6).
- Díaz-Barrera, A., Andler, R., Martínez, I., & Peña, C. (2015). Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), 1063–1071.
- Díaz-Barrera, A., & Soto, E. (2010). Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects. *African Journal of Biotechnology*, 9(33), 5240–5250. <https://doi.org/10.5897/AJB10.025>
- Fekete, F., Spence, J., & Emery, T. (1983). Siderophores Produced by Nitrogen-Fixing *Azotobacter vinelandii* OP in Iron-Limited Continuous Culture. *Applied Environmental Microbiology*, 46(6), 1297–1300.
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6, (7).
- García, A., Ferrer, P., Albiol, J., Castillo, T., Segura, D., & Peña, C. (2018). Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 17(10).
- García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña, C. (2014). High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123.
- Ghosh, S., Gnaim, R., Greiserman, S., Fadeev, L., Gozin, M., & Goldberg, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource Technology*, 271, 166–173.
- Harris, J. O. (1946). A study of the effect of growth substrate on the respiration of *Azotobacter*. *Journal of Biological Chemistry*, 162(48), 11–20.
- Herrera López, S. L. (2012). Efecto de las condiciones de aireación y medio de cultivo sobre el rendimiento y el peso molecular del polihidroxibutirato (PHB) producido por las cepas OP y OPN de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Licenciatura, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Iwata, T. (2005). Strong fibers and films of microbial polyesters. *Macromolecular Bioscience*, 5(8), 689–701.
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3195–3202.
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, 16(8), 2357–2373.
- Kim, B. S. (2000). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 774–777.
- Kim, E. J., & Kim, K. J. (2014). Crystal structure and biochemical characterization of PhaA from *Ralstonia eutropha*, a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(1), 124–129.
- Kusaka, S., Abe, H., Lee, S. Y., & Doi, Y. (1997). Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(2), 140–143.

- Law, J., Slepecky, R. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82(1958), 33–36.
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2014). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 397–442.
- Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, B., & Sainte-Rose, B. (2018). Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports* (Vol. 8).
- Liebergessell, M., Schmidt, B., Steinbüchel, A. (1992). Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. *FEMS Microbiology Letters*, 99(2-3), 227-232.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lozano, E., Galindo, E., & Peña, C. (2011). Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 13.
- Maldonado, R., Jimenez, J., & Casadesus, J. (1994). Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 3911–3919.
- Matsumoto, K., Tanaka, Y., Watanabe, T., Motohashi, R., Ikeda, K., Tobitani, K., Yao, M., Tanaka, I., & Taguchi, S. (2013). Directed Evolution and Structural Analysis of NADPH-Dependent Acetoacetyl Coenzyme A (Acetoacetyl-CoA) Reductase from *Ralstonia eutropha* Reveals Two Mutations Responsible for Enhanced Kinetics. *Applied Environmental Microbiology*, 79(19), 6134–6139.
- Millán, M., Segura, D., Galindo, E., & Peña, C. (2016). Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is determined by the ratio of synthesis and degradation under fixed dissolved oxygen tension. *Process Biochemistry*, 51(8), 1–16.
- Millán, M., Salazar, M., Segura, D., Castillo, T., Díaz-Barrera, Á., & Peña, C. (2017). Molecular mass of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum. *Journal of Biotechnology*, 259, 50–55.
- Millán Ponce, M. (2017). Estudio de los procesos de polimerización y depolimerización del poli-3-hidroxibutirato (P3HB) en cultivos de *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones controladas de tensión de oxígeno disuelto. Tesis Doctoral, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Myshkina, V. L., Nikolaeva, D. a, Makhina, T. K., Bonartsev, a P., & Bonartseva, G. a. (2008). Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(5), 482–486.
- Normi, Y. M., Hiraishi, T., Taguchi, S., Abe, H., Sudesh, K., Najimudin, N., & Doi, Y. (2005). Characterization and properties of G4X mutants of *Ralstonia eutropha* PHA synthase for poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Escherichia coli*. *Macromolecular Bioscience*, 15(5), 197–206.
- Numata, K., Abe, H., & Iwata, T. (2009). Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials. *Materials*, 2(3), 1104–1126.
- Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. (2000). Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* Gene Products in Alginate Production. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6550–6556.

- Page, W. (1989). Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 329–333.
- Page, W. (1992). Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnology Letters*, 14, 385–390.
- Pau, R. (1993). Metal Regulation of Nitrogenases and Molybdenum Transport in *Azotobacter vinelandii*. *New Horizons in Nitrogen Fixation*, 17, 117–122.
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 278–293.
- Peña, C., Castillo, T., Núñez, C., & Segura, D. (2011). Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii*. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering, (Bioprocess Design)*, 27.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5672–5677.
- Premakumar, R., Lemos, M., & Bishop, P. (1984). Evidence for two dinitrogenase reductases under regulatory control by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 797, 64–70.
- Quagliano, M. & Miyazaki, S. (1997). Effect of aeration and carbon / nitrogen ratio on the molecular mass of the biodegradable polymer poly- β -hydroxybutyrate obtained from *Azotobacter chroococcum* 6B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 662–664.
- Ragan, B. (2008). Molecular weight modulation in polyhydroxybutyrate fermentations. Thesis (Ph.D.) Dept. of Chemical Engineering. Massachusetts Institute of Technology.
- Rehm, B. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J*, 15(376), 15–33.
- Rehm, B. (2007). Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: A Platform Technology for the Production of Tailor-Made Bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology*, 9(1), 41–62.
- Röckel, D., Hernando, J. J., Vakalopoulou, E., Post, E., & Oelze, J. (1983). Localization and activities of nitrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase in *Azotobacter vinelandii* grown in oxygen-controlled continuous culture. *Archives of Microbiology*, 136(1), 74–78.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516–539.
- Segura, D., Vargas, E., & Espin, G. (2000). Beta-ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene*, 260(1–2), 113–120.
- Senior, P. J., & Dawes, E. A. (1973). Poly- β -hydroxybutyrate Biosynthesis and the Regulation of Glucose Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J*, 125, 55–66.
- Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvag, H., Espin, G., Rubio, L. M., & Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534–4545.

- Shimizu, H., Tamura, S., Shioya, S., & Suga, K. I. (1993). Kinetic study of poly-D (-)-3-hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(6), 465-469.
- Song, H., Zhang, Y., Kong, W., & Xia, C. (2012). Activities of Key Enzymes in the Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate by *Methylosinus trichosporium* IMV3011. *Chinese Journal of Catalysis*, 33(11-12), 1754-1761.
- Tian, J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2005). Class III Polyhydroxybutyrate Synthase: Involvement in Chain Termination and Reinitiation. *Biochemistry*, 44(23), 8369-8377.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437-1449.
- Volova, T. G., Kalacheva, G. S., Gorbunova, O. V., & Zhila, N. O. (2004). Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha* B5786. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(2), 170-177.
- Volova, Tatiana G., Zhila, N. O., Kalacheva, G. S., Brigham, C. J., & Sinskey, A. J. (2013). Effects of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) reserves on physiological-biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha*. *Research in Microbiology*, 164(2), 164-171.
- Walmsley, J., & Kennedy, C. (1991). Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 622-624.
- Williams, S. F., & Martin, D. P. (2005). Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. *Biopolymers Online*, 1-38.
- Wu, G., Moir, A., Sawers, G., Hill, S., & Poole, R. (2001). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 215-220.
- Zeng, A.-P., & Deckwer, W.-D. (1996). Bioreaction techniques under microaerobic conditions: from molecular level to pilot plant reactors. *Chemical Engineering Science*, 51(10), 2305-2314.

ANEXO 1

Tabla 4. Prueba estadística para resultados de actividad beta cetotilasa.

Condiciones	Valor crítico de t (dos colas)	p (T<=t) dos colas	Diferencia signiicativa (p<0.05)
300 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.53	NO
500 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.88	NO
OP (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.53	NO
phbZ1 ⁻ (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	1.00	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 300 rpm)	3.182	0.28	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 500 rpm)	3.182	0.28	NO

Tabla 5. Prueba estadística para resultados de actividad acetoacetyl-CoA reductasa.

Condiciones	Valor crítico de t (dos colas)	p (T<=t) dos colas	Diferencia signiicativa (p<0.05)
300 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.867	NO
500 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.017	SI
OP (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.036	SI
phbZ1 ⁻ (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.026	SI
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 300 rpm)	3.182	0.581	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 500 rpm)	3.182	0.000	SI

Tabla 6. Prueba estadística para resultados de actividad sintasa

Condiciones	Valor crítico de t (dos colas)	p (T<=t) dos colas	Diferencia signiicativa (p<0.05)
300 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.200	NO
500 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.250	NO
OP (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.173	NO
phbZ1 ⁻ (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.069	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 300 rpm)	3.182	0.130	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 500 rpm)	3.182	0.031	SI

Tabla 7. Prueba estadística para resultados de actividad depolimerasa

Condiciones	Valor crítico de t (dos colas)	p (T<=t) dos colas	Diferencia signiicativa (p<0.05)
300 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.198	NO
500 rpm (OP vs phbZ1 ⁻)	2.776	0.013	SI
OP (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.198	NO
phbZ1 ⁻ (300 rpm vs 500 rpm)	2.776	0.680	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 300 rpm)	3.182	0.438	NO
phbZ1 ⁻ (240 rpm vs 500 rpm)	3.182	0.392	NO