

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

PÉREZ VERGARA DIANA TANAIRÍ

**Escalamiento de la producción de P(3HB) en cultivos lote alimentado
utilizando la cepa OPNA de *Azotobacter vinelandii***

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA

ASESOR INTERNO

DR. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO

12 de Febrero, 2019.

Ciudad de México



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.

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 Felipe Peña Malacara. Durante la realización del proyecto se contó con la beca del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM a través del proyecto IT 2002216.

Dedicatorias

A mi madre **Ma. Eugenia Vergara Vargas** y a mi padre **Javier Francisco Pérez Pérez**, por brindarme su amor, apoyo y guía incondicional en cada una de las etapas de mi vida, por creer en mi en la adversidad, por brindarme todo sin pedir nada a cambio, por ayudarme a cumplir cada una de mis metas, por aguantar todos mis cambios de humor, por todo el tiempo que me han dedicado, por todas sus palabras de aliento, por estar para mi en cualquier instancia, quiero decirles que me siento la persona más afortunada por tenerlos en mi vida y orgullosa de poder decir que soy su hija. Siempre estaré eternamente agradecida con ustedes desde el fondo de mi corazón. No existen palabras en el mundo que puedan expresar todo el cariño, respeto y admiración que les tengo, pero pasaré el resto de mi vida demostrándoselos. Este logró es gracias a ustedes. **Los amo infinitamente.**

A mi hermano **Javier Daniel**, por ser el mejor hermano de la vida, por todos esos buenos y malos momentos, desde llantos hasta las risas, por ser mi mejor amigo, mi confidente, mi cómplice y una modelo a seguir para mi. Te amo bastaste bebé.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Peña, estaré siempre agradecida por la oportunidad de haber pertenecido a su grupo, por su paciencia, sus enseñanzas, su entera entrega y dedicación por la enseñanza que llevare el resto de mi vida, por las palabras de aliento que me hicieron crecer como profesional y persona. Mi más grande admiración y cariño.

A la Dra. Viviana Urtuvia, gracias por todos los momentos compartidos, las enseñanzas académicas y personales, los momentos de desvelos que siempre fueron amenos, por la paciencia y la ayuda otorgada durante todo el proyecto incluso a larga distancia, pero más que todo por su sincera amistad que atesorare siempre. Eres la mejor jefa que he tenido.

A la M. en C Elsa Antonieta, por ser una buena amiga y excelente compañera de mesa de trabajo, por ayudarme en el escrito de la tesis, por cada uno de los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por los regaños y enseñanzas y hacer divertidos los días. Te quiero mucho.

A las doctoras Celia Flores y Tania Castillo, por el tiempo dedicado en mi preparación profesional, por su ayuda a lo largo del proyecto, por todos los convivios compartidos y por su más sincera amistad. Las quiero.

Al Biol. Mario Caro, por toda la ayuda incondicional brindada desde el inicio del proyecto, por sus sabios consejos y los maravillosos momentos que pasamos en la planta piloto y por su hermosa amistad. Lo aprecio bastante.

A los doctores Enrique Galindo y Leobardo Serrano, por las consejos y aportaciones brindados a lo largo del proyecto.

Al M. en C. Claudio Padilla, por sus enseñanzas en el manejo de datos, su ayuda en la escritura de la tesis y su amistad.

A todos mis amigos de laboratorio, en especial a Manuel, Carlos, Tomás, Alberto, Claudio, Juan Carlos, Clara, Cristina, Miguel, Abraham, Sandra, Vanessa y Thania por su valiosa amistad, por todas las fiestas vikingas, por cada uno de los juegos de ajedrez, por su ayuda, su cariño y consejos, gracias a ustedes mi estancia en Cuernavaca fue la mejor.

A mis amigos de la Universidad, a mis tres mejores amigos **Jorge, Ilse e Ian** y a **Diana Díaz** por todo el apoyo, cariño, enseñanzas, tiempo dedicado, salidas, por todas las ilusiones y las decepciones compartidas, por estar conmigo cuando más los necesité, siempre estaré agradecida de tenerlos en mi vida, los amo con todo mi corazón.

A **Erick y Efrén** agradezco el haberlos conocido, y encontrarme con personas tan maravillosas como ustedes dos. De verdad aprecio toda su ayuda y amistad. Los quiero mucho.

A la máxima casa de estudios la **UNAM**, por brindarme la mejor educación, desde mis 12 años, espero algún contribuir y regresar al menos una parte de lo que me fue otorgado.

ÍNDICE

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Generalidades de los polihidroxicanoatos	10
4. Poli-3-hidroxi-butirato	11
5. Aplicaciones biomédicas del P(3HB)	12
6. Organismos productores de P(3HB)	12
7. <i>Azotobacter vinelandii</i>	13
8. Cepa OPNA de <i>A. vinelandii</i>	16
9.1 Cultivos lote o discontinuos.....	18
9.2 Cultivos lote alimentado o intermitentes.....	19
9. Antecedentes	19
10. Medios de cultivo	21
11. Consumo de potencia en fermentadores	22
12. Escalamiento ascendente de fermentadores	23
13.1 Criterios de escalamiento	24
13. Justificación	25
14. Hipótesis	26
15. Objetivos	26
16.1 General:	26
16.2 Específicos:.....	26
16. Estrategia experimental	27
17.1 Cepa:	28
17.2 Preservación de la cepa	28
17.3 Primera Fase: cultivo en matraces agitados.....	28

Selección del medio	28
Comparación de medios analítico e industrial.....	29
17.4 Segunda fase: cultivo en fermentadores 3 L	30
17.5 Tercera fase: escalamiento en fermentadores 30 L	31
17.6 Métodos analíticos	32
17.6.1 Cuantificación de proteína.....	32
17.6.2 Cuantificación de sacarosa residual.....	34
17.6.3 Cuantificación de P(3HB).....	36
17.6.4 Determinación de biomasa por peso seco	36
17.7 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento	37
17. Resultados y Discusión	38
18.1 Cultivo en matraces agitados.....	38
18.2 Cultivos en fermentadores de 3 L	43
18.2.1 Determinación de la P/V en fermentadores de 3 L	51
18.3 Cultivos en fermentadores de 30 L	52
18. Conclusiones	59
19. Perspectivas.....	60
20. Referencias	61

1. Resumen

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram negativa fijadora de nitrógeno presente en el suelo capaz de acumular poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) como reserva de carbono y energía. El P(3HB) es un polímero intracelular biodegradable y biocompatible, debido a esto es un producto de alto interés biotecnológico y comercial. Sin embargo, el costo de producción de este polímero resulta ser cuatro veces mayor que el costo de los plásticos convencionales derivados del petróleo, por lo que, se han empleado diversas estrategias de cultivo celular que permiten obtener P(3HB) manera eficiente, a menor costo. En el presente trabajo, se buscó como primer objetivo establecer una estrategia de escalamiento mediante cultivos lote alimentado empleando una cepa modificada genéticamente de *A. vinelandii*, OPNA que permitiera obtener una concentración de P(3HB) cercana a 30 g L⁻¹. Por otro lado, se empleó un medio de cultivo a base de productos industriales, el cual permitió reducir los costos de producción. Se realizaron pruebas en matraces agitados, en fermentadores de 3 L y posteriormente se llevó a cabo el escalamiento del proceso en fermentadores de 30 L, utilizando como criterio la potencia volumétrica (P/V). Se concluyó que, utilizando un medio con sustratos grado industrial y una estrategia de cultivo con alimentación intermitente, es posible obtener una concentración de P(3HB) de 30 g L⁻¹, a escala de 3 L. Por otro lado, utilizando como criterio de escalamiento la P/V y el uso de sustratos grado industrial en el medio de cultivo, fue posible obtener una concentración de 25 g L⁻¹ de P(3HB), en fermentadores de 30 L, lo cual permitió una disminución de los costos de producción en un 28 % lo que presenta una ventaja a nivel industrial.

2. Introducción

Los materiales plásticos, a base de polímeros sintéticos derivados del petróleo tienen como principal desventaja que no son materiales biodegradables y al ser desechados de manera inadecuada, causan contaminación. La demanda de estos materiales se ha incrementado en los últimos años; por ejemplo, en el año 2016, se reportó una producción mundial de 322 millones toneladas (Chanprateep, 2010; EuropeanPlastics, 2016). Resulta difícil reducir el consumo de productos plásticos a nivel mundial debido a la versatilidad que poseen estos materiales y a los bajos costos de producción los cuales son de alrededor de 0.7 dólares por kilogramo. Sin embargo, debido al problema mundial de contaminación que han provocado estos materiales, se han buscado alternativas que permitan reemplazar el uso de plásticos derivados del petróleo por polímeros biodegradables. Existen plásticos biodegradables como los polihidroxialcanoatos (PHA's), los polisacáridos y poliésteres alifáticos, como alternativa al uso de plásticos de la industria petroquímica (Ryu, *et al.*, 2008). Los PHA's poseen propiedades termoplásticas y termomécnicas similares a las de los plásticos convencionales; sin embargo, los costos de producción, que oscilan entre 4-5 dólares por kilogramo, no permiten que estos materiales compitan con los plásticos convencionales. Por otro lado, al ser materiales biocompatibles, sus aplicaciones se encuentran más orientadas hacia las industrias biomédica y farmacéutica (Chen & Page, 1997; Chanprateep, 2010). El poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)) fue el primer PHA en ser descubierto, por lo que es el polímero más caracterizado y utilizado por las industrias. Este polímero presenta similitudes con los plásticos convencionales como el polietileno (Chen & Wang, 2013). Los PHA's, como el P(3HB), son producidos por diversos microorganismos tales como, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Ralstonia eutropha*, *Aeromonas hydrophila* y *Azotobacter vinelandii* (Ray & Kalia, 2016). Se han buscado diversas alternativas que permitan reducir los costos de producción, una de ellas es la utilización de organismos modificados genéticamente que sean capaces de sobreproducir el polímero de interés. Un ejemplo es la cepa OPNA modificada de *A. vinelandii*, en la cual, se inactivaron dos sistemas reguladores

negativos de la biosíntesis del P(3HB): el sistema fosfotransferasa relacionado con la fijación de nitrógeno (PTS^{Ntr}) y el sistema regulador RsmA, obteniendo una bacteria capaz de acumular cerca de un 80 % de P(3HB) en peso seco (Castillo *et al.*, 2017). Aún con la utilización de organismos modificados genéticamente, la producción a escala industrial sigue siendo una limitante, por lo que, se han buscado otras alternativas que permitan disminuir los costos, como son: el diseño de nuevas estrategias de cultivo y el empleo de medios de cultivo de bajo costo (aceites de maíz, melazas o reactivos grado industrial).

3. Generalidades de los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA's) pertenecen al grupo de los poliésteres de hidroxicanoatos, conformados por monómeros de ácidos R-hidroxicanoicos, polimerizados en forma lineal y sintetizados por microorganismos en forma inclusiones lipídicas en el citoplasma. Son materiales de reserva de carbono y energía, utilizados por las bacterias en condiciones desfavorables (aporte de nutrientes no balanceado). Su fórmula general estructural se muestra en la figura 1 (Khanna & Srivastava, 2005).

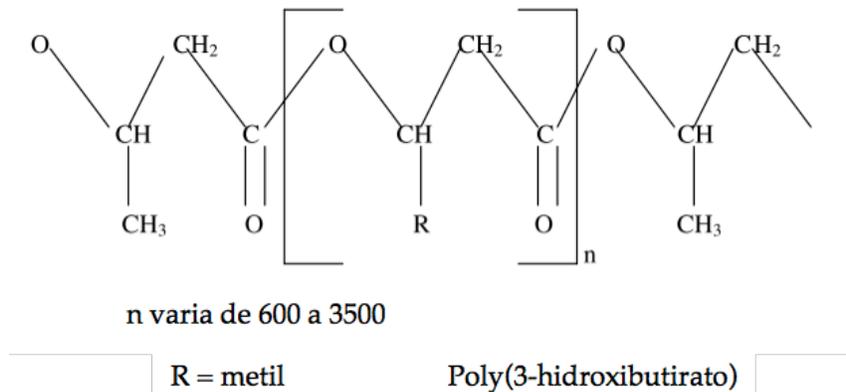


Figura 1. Estructura de los PHA's [Tomada y modificada de Khanna & Srivastava, 2005].

Presentan propiedades que van desde plásticos rígidos y quebradizos, hasta los semejantes al hule. Una de las principales ventajas de estos polímeros es su capacidad de ser biodegradables, ya que los microorganismos productores son capaces de secretar depolimerasas, enzimas que hidrolizan los enlaces éster del polímero en monómeros y oligómeros solubles en agua, permitiendo su degradación (Sudesh *et al.*, 2000; Chanprateep, 2010).

Los PHA's se clasifican en tres grupos, de acuerdo al número de átomos de carbono dentro de las cadenas: de cadena corta (< 5 átomos), de cadena media (5 – 14 átomos) y de cadena larga (> 14 átomos), siendo estos últimos los menos estudiados (Raza *et al.*, 2018).

4. Poli-3-hidroxibutirato

El poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)), fue el primer PHA en ser descubierto, está formado por la polimerización lineal de unidades monoméricas de β -hidroxibutirato, unidos por medio de enlaces éster entre el grupo carboxilo e hidroxilo vecino (Figura 2). Presenta propiedades termomécnicas similares a las de los plásticos derivados de la industria petroquímica, los cuales pueden ser producidos a partir de recursos renovables como: azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, melazas o biomasa hidrolizada (Castillo *et al.*, 2017).

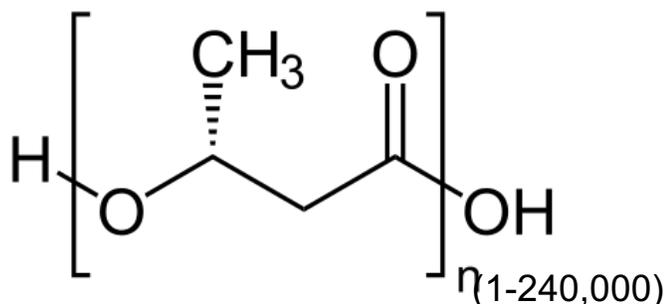


Figura 2. Estructura del poli-3-hidroxibutirato (P(3HB))

Las condiciones que favorecen la acumulación de este polímero dentro de la bacteria se relacionan con la limitación del oxígeno y un exceso en la fuente de carbono (Espín, 2002).

A pesar de sus características, no ha sido posible emplearlo para reemplazar a los plásticos convencionales, ya que su producción es costosa. Sin embargo, al ser biocompatibles, sus aplicaciones se relacionan más con las áreas farmacéuticas y biomédicas (Khanna & Srivastava, 2005).

5. Aplicaciones biomédicas del P(3HB)

El uso de biopolímeros como el P(3HB) en el área biomédica, en contraste con otros materiales, ha ido en aumento en los últimos años, debido a su origen biológico y a su biocompatibilidad. En la siguiente tabla se muestran algunas de las aplicaciones en las que se ha propuesto su uso (Tabla 1).

Tabla 1. Aplicaciones biomédicas del P(3HB) de diversos pesos moleculares.

	Aplicaciones	Peso molecular (kDa)	Referencia
P(3HB) Bajo peso molecular	Andamios de osteoblastos	220	(Shishatskaya <i>et al.</i> , 2006)
	Andamios de nanofibras utilizados en la ingeniería de tejidos	144	(Ramier <i>et al.</i> , 2014)
P(3HB) Peso molecular intermedio	Nano partículas para la administración de ácido retinoico	350	(Errico <i>et al.</i> , 2009)
	Microcápsulas para la administración de medicamentos	300	(da Silva-Valenzuela <i>et al.</i> , 2010)
	Andamios de PHB y otolitos (osteoinductor) para la regeneración del tejido óseo	300	(Fiho <i>et al.</i> , 2013)
	Andamios 3D para la ingeniería de osteoblastos	524	(Mendonca <i>et al.</i> , 2013)
P(3HB) Alto peso molecular	Andamios para ingeniería de tejidos	890	(Cao <i>et al.</i> , 2005)
	Andamios para células nerviosas	1143	(Chan <i>et al.</i> , 2014)

6. Organismos productores de P(3HB)

El P(3HB) es producido por diversos microorganismos como son: *Cupriavidus necator*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Escherichia coli*, en respuesta a un desbalance en las condiciones nutrimentales tales como: exceso en la fuente de carbono, y limitación de oxígeno, nitrógeno o fósforo (Peña *et al.*, 2014).

7. *Azotobacter vinelandii*

Entre los organismos productores de P(3HB) se encuentra *A. vinelandii*, la cual es una bacteria fijadora de nitrógeno presente en el suelo, capaz de acumular P(3HB) como reserva de carbono y energía (Noguez *et al.*, 2008).

Actualmente se conocen los genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de P(3HB) en *A. vinelandii*. Estos genes se encuentran en el operón *phbBAC* como se muestra en la Figura 3 (Segura *et al.*, 2003).

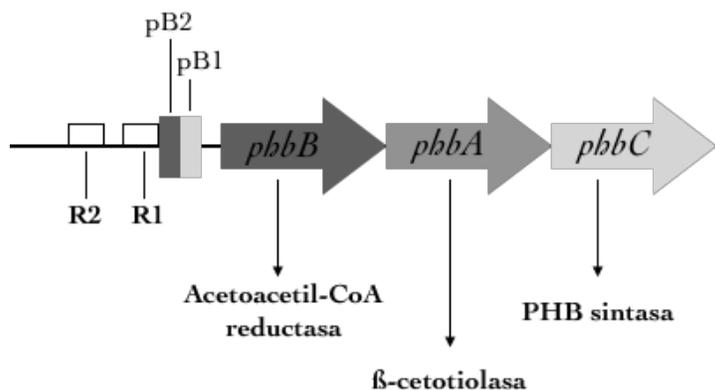


Figura 3. Organización del operón *phbBAC* en *A. vinelandii* [Tomado y modificado de Hernández, 2007].

La vía biosintética del P(3HB) comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA. La enzima que cataliza esta reacción es la β -cetotiolasa, codificada en el gen *phbA*. La acetoacetil-CoA reductasa (codificada por el gen *phbB*) convierte la acetoacetil-CoA en 3-hidroxiacetil-CoA dependiente de NADPH. Finalmente, la enzima PHB sintasa (codificada por el gen *phbC*) polimeriza los monómeros de 3-hidroxiacetil-CoA a P(3HB), liberando CoA, como se muestra en la figura 4 (Peña *et al.*, 2014).

Se sabe que la actividad de la enzima β -cetotiolasa, que cataliza la primera etapa de la ruta biosintética del P(3HB), es inhibida por la coenzima A (Senior & Dawes, 1973).

Bajo condiciones de limitación de oxígeno (valores < 4 % de saturación) y un exceso de la fuente de carbono, los cofactores NADH o NADPH inhiben las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, lo cual disminuye el flujo el carbono hacia este ciclo, generando un aumento en la relación acetil-CoA/CoA. Esto permite la estimulación de la actividad β -cetotilasa para la síntesis de P(3HB) favoreciendo su acumulación (Senior & Dawes, 1973; Segura & Espín, 2004).

Por el contrario, bajo condiciones de no limitación de oxígeno (valores > 4 % de saturación), la concentración de CoA es baja, el acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs y la actividad de la β -cetotilasa es inhibida; consecuentemente la biosíntesis de P(3HB) cesa (Babel & Steinchbüchel, 2001).

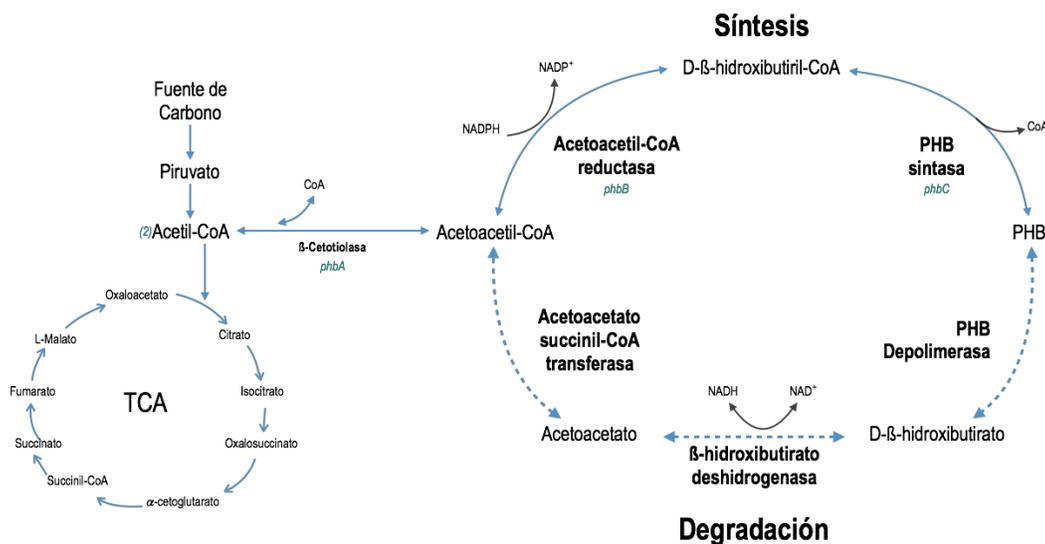


Figura 4. Ruta metabólica de la síntesis y degradación del P(3HB) en *A. vinelandii* [Tomada y modificada de Peña *et al.*, 2014].

Por otro lado, con el fin de aumentar la producción de los polímeros se han realizado manipulaciones genéticas. Entre las que se encuentran modificaciones en el metabolismo que permiten favorecer la síntesis de P(3HB), modificaciones en los sistemas reguladores que controlan la síntesis de P(3HB) y la expresión de gen *phb* en organismos recombinantes, como lo son la cepa OPN y OPNA (Peña *et al.*, 2014).

La biosíntesis de P(3HB) en *A. vinelandii* es regulada por el sistema fosfotransferasa relacionado con el nitrógeno (PTS^{Ntr}). Este sistema, es análogo del sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente del fosfoenolpiruvato o (PTS), el cual interviene en el transporte y fosforilación de carbohidratos en diversas bacterias y está conformado por una cadena de proteínas que participan en una cascada de fosforilaciones. Dicha cascada inicia con la enzima I (EI), la cual se autofosforila a partir del fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere un grupo fosfato a la proteína Hpr. Estas dos proteínas solubles son los componentes generales del sistema. Posteriormente, se transfiere el fosfato de la proteína Hpr al componente II (IIA), el cual es azúcar específico y funciona como permeasa, fosforilando al carbohidrato transportado (Espín, 2002).

En muchos géneros de bacterias se ha reportado la región 3 del gen *rpoN*, que codifica para el factor sigma 54 (σ^{54}), que participa en la regulación de la transcripción de genes que codifican para homólogos de las proteínas Hpr y IIA del sistema PTS. A estas proteínas se les denominó Npr o IIA^{Ntr}. El producto de este gen, la enzima IIA^{Ntr}, regula negativamente el operón *phbBAC* (Espín, 2002).

El sistema GacS/GacA constituye un mecanismo mediante el cual la bacteria responde a los cambios en su ambiente. GacS es una proteína membranal que hipotéticamente detecta una señal ambiental, se autofosforila y posteriormente fosforila al regulador GacA, activándolo. Una vez fosforilado GacA activa la expresión del gen *rsmZY*, cuyo producto es un RNA no codificante, el cual activa una pequeña proteína denominada RsmA, que regula a nivel postranscripcional la expresión de los genes *phbBAC* y *pbhR* al unirse a sus RNAs mensajeros inhibiendo su traducción y afectando su estabilidad. RsmA es por lo tanto un regulador negativo en la síntesis de P(3HB) (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011).

8. Cepa OPNA de *A. vinelandii*

Con la finalidad de generar una cepa genéticamente modificada de *A. vinelandii*, que tuviera como principal característica la sobreproducción de P(3HB), se construyó una cepa mutante en la que se inactivó la expresión del gen *rsmA* en el fondo genético de la cepa OP (una mutante espontánea que tiene interrumpido el gen *algU*, el cual codifica para el factor E, que está implicado en la síntesis de alginato). Dando como resultado la eliminación de uno de los reguladores negativos de la síntesis de P(3HB), esta cepa se denominó OP (Ramírez, 2011).

Posteriormente, se obtuvo una mutante sobreproductora de P(3HB) mediante la inactivación del gen *ptsN*, en donde se eliminó el regulador negativo IIA^{Ntr}. A esta cepa se le llamó OPN (Ramírez, 2011).

Finalmente, con el conocimiento previo de ambas cepas, se generó una nueva cepa, que presenta dos mutaciones en los sistemas de regulación negativa en la síntesis de P(3HB): el sistema regulador RsmA (inactivación del gen *rsmA*) y la proteína IIA^{Ntr} (inactivación del gen *ptsN*) del sistema PTS^{Ntr}, la cepa OPNA (figura. 5). La cual resultó ser una cepa sobreproductora de P(3HB).

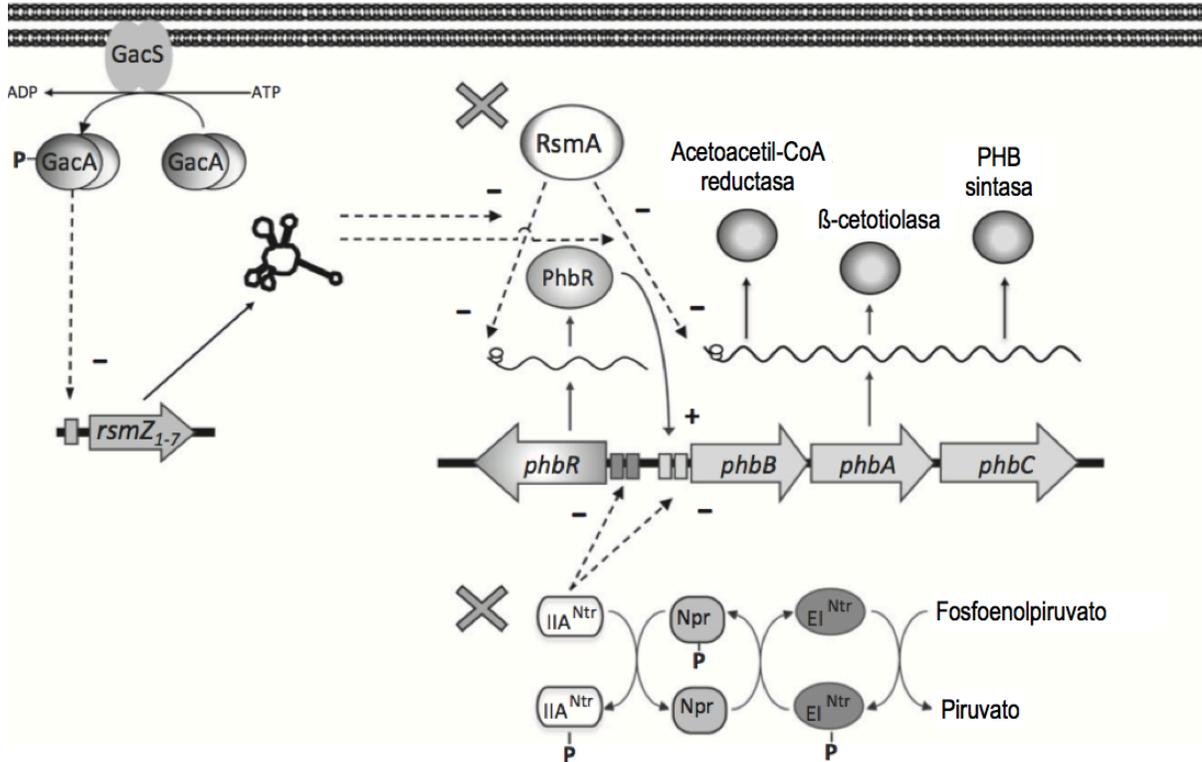


Figura 5. Modelo de los sistemas reguladores que controlan la expresión de los genes *phb* en *A. vinelandii*. (+) indican regulación positiva; (-) indican regulación negativa. [Tomado y modificado de Peña *et al.*, 2014].

Un estudio realizado por García (2014) en cultivos en matraces agitados (200 rpm), comparando las cepas OP y OPNA, utilizando un medio de cultivo definido Burk-Sacarosa (BS) permitió obtener una concentración de P(3HB) de $3.5 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$, esta concentración fue mayor en comparación con la cepa OP donde se obtuvo una producción de $1.7 \pm 0.11 \text{ g L}^{-1}$. Asimismo, los rendimientos en cuanto al crecimiento celular fueron diferentes, con la cepa OPNA se obtuvo un rendimiento de $0.25 \pm 0.02 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$ y con la cepa OP de $0.13 \pm 0.02 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$.

Estrategias de producción

Los procesos de fermentación se utilizan para convertir sustratos, catalizar reacciones, remediar materiales tóxicos o simplemente para la obtención de metabolitos microbianos (Yang, 2010).

La capacidad metabólica de los microorganismos para la obtención de altas concentraciones de producto a partir del consumo eficiente de sustrato depende, de manera puntual, del rendimiento de las reacciones individuales que conforman el metabolismo celular. El metabolismo celular, inicia con la identificación de los requerimientos nutricionales del microorganismo, de manera que provea los elementos necesarios para iniciar los procesos metabólicos. La estrategia de identificación de los requerimientos que más comúnmente se utiliza es a partir del diseño de medios de cultivos, mediante la formulación y desarrollo de experimentos que tomen en cuenta la interacción entre: las composiciones individuales de las fuentes de carbono y nitrógeno, el transporte de oxígeno y las condiciones medioambientales principalmente temperatura y pH (Gouveia *et al.*, 2001).

Para la producción de metabolitos microbianos se pueden emplear distintos tipos de cultivo, los cuales se pueden clasificar de la siguiente manera:

9.1 Cultivos lote o discontinuos

Estos cultivos se definen como: aquellos en los que no existe un intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de CO₂ y otros gases) que se suministran y retiran de forma continua (Acevedo *et al.*, 2002).

En un cultivo por lote, todos los componentes del medio y el inóculo se agregan al inicio del cultivo, por lo tanto, sus concentraciones varían a medida que las células crecen. Los productos, se colectan al final del cultivo. Los controles básicos de pH, el oxígeno disuelto, y la temperatura se mantienen normalmente constantes durante el cultivo de un reactor discontinuo (Lim & Shin, 2013).

9.2 Cultivos lote alimentado o intermitentes

Un cultivo lote alimentado es una operación semi-continua en la que los nutrientes necesarios para el crecimiento celular y la formación del producto se alimentan de forma intermitente. En este tipo de cultivos se controla la alimentación de nutrientes tales como, fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos, nutrientes precursores o inductores, así como también, se controlan, la tensión de oxígeno disuelto (TOD), pH, como parámetro de retroalimentación (Ryu, *et al.*, 1997). La adición de nutrientes puede repetirse varias veces si las células son completamente viables (Lim & Shin, 2013).

El volumen inicial del cultivo aumenta durante el curso de la operación hasta finalizar el cultivo. Es una operación dinámica y es utilizada cuando se requiere una alta productividad del metabolito deseado.

9. Antecedentes

Debido a la necesidad de llevar los cultivos a escala industrial para obtener más producto, optimizando el rendimiento y la productividad, modificando los parámetros operacionales y utilizando cepas modificadas genéticamente, se han realizado varios experimentos que proponen nuevas estrategias de cultivo.

Uno de ellos es el trabajo realizado por García (2014). Este autor realizó experimentos en fermentadores de 3 L, utilizando la cepa OPNA en un medio de cultivo PY (peptona, sacarosa y extracto de levadura) usando una estrategia de cultivo exponencialmente alimentado las primeras 38 horas. Posteriormente, en el mismo cultivo, se cambió la estrategia utilizando un cultivo con alimentación por pulsos con un medio libre de peptona, el medio SE (sacarosa y extracto de levadura). Como resultado de esta estrategia, este autor obtuvo una de las concentraciones más altas de P(3HB) reportadas para esa cepa, la cual fue de 30 g L⁻¹ de P(3HB) y una productividad promedio de 0.51 g L⁻¹h⁻¹, lo que sugería que hasta ese momento era una de las mejores estrategias de cultivo para obtener más

biopolímero. Las principales aportaciones de este trabajo fueron, la eliminación de la peptona del medio de cultivo, ya que se había reportado con anterioridad que la glicina proveniente de la peptona, en combinación con otros aminoácidos como la metionina, triptófano y fenilalanina, pueden tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Debido a que la glicina interfiere con la síntesis de peptidoglicano, el cual forma parte de la pared celular de las bacterias (Page & Cornish, 1993). En este sentido la glicina origina la acumulación de UDP-glicopéptido, el cual al acumularse en el citoplasma causa pleomorfismo en la célula, así como debilitamiento de la pared celular (Maculla y Cowles, 1948).

Sin embargo, este trabajo presenta tres principales desventajas: 1. Es un proceso complejo y de difícil manejo a escala industria, ya que incorpora el cultivo exponencialmente alimentado; 2. Se controló la TOD a 4 % por mezcla de gases, lo que representa un proceso más costoso y 3. La utilización de la peptona en las primeras etapas del cultivo (lote y alimentación exponencial), tiene un impacto negativo sobre el crecimiento.

Dándole continuidad a este trabajo, Sanguino (2018), realizó experimentos en fermentadores de 3 L utilizando una estrategia de alimentación de manera intermitente de tres pulsos. El autor eliminó el control de la TOD por mezcla de gases y, en su lugar manejó dos velocidades de agitación para mantener una adecuada aireación del cultivo: 500 rpm en la primera etapa del cultivo (etapa lote) y 700 rpm en la segunda etapa del cultivo (etapa de alimentación). A su vez, utilizó un medio libre de peptona, el cuál denominó medio SE (sacarosa y extracto de levadura). Los parámetros operacionales fueron condiciones controladas de pH con valor de 7.2, una relación carbono nitrógeno de 14, una temperatura de 29 °C y un flujo de aire de 1 vvm.

Como resultado de estos cambios, el autor reporta una concentración final de 33.6 g L⁻¹ de P(3HB) y una productividad de 0.52 g L⁻¹, lo cual mejoró en un 10 % el cultivo en comparación con los resultados obtenidos previamente por García (2014).

De este trabajo se destacan las siguientes aportaciones: 1. La implementación de un medio de cultivo libre de peptona, medio S.E; 2. La estrategia experimental cultivo lote alimentado (alimentación intermitente por 3 pulsos); 3. El establecimiento de la relación C/N= 14 y 4. El manejo de dos velocidades de agitación (500 y 700 rpm) para mantener la TOD al 4 % sin mezcla de gases.

Sin embargo, esta estrategia de cultivo a pesar de ser exitosa, presenta una desventaja debido a la utilización de sustratos grado analítico, haciendo difícil la realización de cultivos a escala industrial, por los costos de producción.

10. Medios de cultivo

De acuerdo con su composición se pueden distinguir dos tipos de medios de cultivo: complejos y definidos (Acevedo *et al.*, 2002).

Los medios complejos son formulados a base de desechos, subproductos y extractos naturales, por ejemplo, melaza o extracto de levadura. Su composición química es compleja y variable. Estos medios pueden requerir suplementación con compuestos que proporcionen cantidades adicionales de algunos elementos como N, Mg y P. Estos medios complejos son ampliamente utilizados en fermentaciones industriales (Acevedo *et al.*, 2002).

Los medios definidos se formulan a base de compuestos puros, tales como glucosa, sulfato de amonio, metionina, fosfato de potasio, entre otros, ya que su composición química es conocida y reproducible, contienen fuentes de cada elemento y los nutrientes esenciales requeridos por el microorganismo (Acevedo *et al.*, 2002).

11. Consumo de potencia en fermentadores

Generalmente para mover los impulsores en los fermentadores se utiliza energía eléctrica. Para una determinada velocidad de agitación, la potencia necesaria depende de la resistencia ofrecida por el fluido a la rotación del impulsor. La potencia de mezcla para fluidos depende de la velocidad del agitador, del diámetro, geometría del impulsor y de las propiedades del fluido como la densidad y la viscosidad. La relación entre estas variables se expresa generalmente en forma de números adimensionales, como el número de Reynolds del impulsor Re_i y el número de potencia N_p que se define en la siguiente ecuación 1 (Doran, 1998).

(1)

$$N_p = \frac{P}{\rho N_i^3 D_i^5}$$

Donde:

N_p = Número de potencia

P = Potencia mecánica (W)

ρ = Densidad (Kg m⁻³)

N_i = Velocidad del agitador (s⁻¹)

D_i = Diámetro del impulsor (m)

Una vez que se conoce el valor de N_p la potencia se calcula a partir de la ecuación 2:

(2)

$$P = N_p \rho N_i^3 D_i^5$$

En el 2017, Sandoval realizó un primer acercamiento de escalamiento utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*. Esta autora utilizó como criterio de escalamiento mantener la TOD en 4%, mediante la agitación. En este trabajo a pesar, de no ser su principal objetivo mantener las potencias dadas en fermentadores de 3 L a una escala de 30 L, se muestran los valores de potencia obtenidos a dichas escalas.

En fermentadores de 3 L se registraron potencias en el rango de 0.15 W/L a 0.89 W m⁻³ para las condiciones de 500 y 700 rpm respectivamente y como resultado final de mantener la TOD a 4 % en 30 L, la autora obtuvo valores de potencia cercanos a 3.1 W m⁻³.

Con la estrategia de mantener un cultivo limitado por oxígeno, se obtuvo una disminución del 50 % del producto final obtenido. Esto llevo a pensar que sería una opción realizar un escalamiento manteniendo la potencia volumétrica del cultivo, esperando obtener mejores resultados.

12. Escalamiento ascendente de fermentadores

El escalamiento es el procedimiento mediante el cual se trasladan los resultados experimentales de un proceso obtenido en una escala menor o de laboratorio, en la que pasan por escalas intermedias o de planta piloto. Estrictamente hablando la definición dada sería un escalamiento en sentido ascendente (*scale-up*). Sin embargo, también existe el escalamiento en sentido descendente (*scale-down*) (Rodríguez & Orozco, 2015).

El objetivo en un proceso en que se pretende escalar es la selección de las condiciones de diseño y operación del reactor, que aseguren que el efecto de distintas variables sobre el sistema es el mismo en unidades de distinto tamaño, buscando lograr rendimientos y calidades de productos similares (Rodríguez & Orozco, 2015).

Lo deseable en el escalamiento de bioprocesos, sería mantener hasta donde sea posible, el mismo microambiente para el biocatalizador en las diferentes escalas, a esto se lo conoce como el “Principio de Similaridad Fisiológica”, propuesta por Votruba y Sobotka en 1992. En la siguiente tabla se muestran los parámetros, tanto lineales como no lineales que hay que tener presente en la realización de cultivos (Tabla 2) (Yang, 2010).

Tabla 2. Parámetros de escalamiento

Parámetros lineales	Parámetros no lineales
<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura - pH - Presión - Oxígeno disuelto - Flujo de aire - Volumen final e inicial de la fermentación - Concentración de nutrientes 	<ul style="list-style-type: none"> - Agitación - Tasas de alimentación no lineal - Preparación del medio - Retención de medios - Ácido y base para el control del pH - Sistemas de suministro medio, ácido/base

También existen factores bióticos y abióticos que sufren modificaciones al realizar un escalamiento, los cuales se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 3. Factores bióticos y abióticos que difieren con el cambio de escala en fermentadores [Tomado de Rodríguez & Orozco, 2015]

Tipo de Factor	Parámetros no lineales
Biológicos	Metabolismo celular, cinética de crecimiento, número de generaciones, morfología celular, probabilidad de mutación, segregación de población celular, preparación del inoculo
Químicos	pH y forma de control, composición del medio (fuentes de C, N, P etc., y su pureza), calidad del agua, potencial redox.
Físicos	Configuración del tanque, aireación, agitación y mezcla, presión hidrostática, temperatura y forma de control, formación de espuma y su control.

13.1 Criterios de escalamiento

Existen diferentes criterios de escalamiento, los más utilizados son:

- La potencia volumétrica (P/V , $W L^{-1}$).
- El coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La} , s^{-1}).
- La velocidad de agitación (rpm).
- El número de Reynolds, (Re).
- Tiempo de mezclado (s).

El buen funcionamiento de un reactor depende de su capacidad de mezclado, lo ideal sería mantener constante el tiempo de mezclado durante el cambio de escala. Sin embargo, es muy difícil de conseguir, debido a la relación existente entre el tiempo de mezclado y el consumo de potencia (Doran, 1998). Conforme se aumenta el volumen del biorreactor, se incrementa el recorrido de flujo para la circulación del fluido. Para mantener constante el tiempo de mezcla debería mantenerse la velocidad en el tanque en proporción directa a su tamaño dando como resultado la siguiente ecuación:

$$P/V \propto v^2 \quad (3)$$

Donde:

$\frac{P}{V}$ = Potencia volumétrica ($W L^{-1}$)

v = Velocidad lineal del fluido

Con base en lo que se ha expuesto, se entiende que no existe una metodología única para realizar el escalamiento, ya que el éxito de esta depende fundamentalmente del tipo de proceso y sus condiciones operacionales (Rodríguez & Orozco, 2015).

Los métodos de escalamiento basados en la P/V y el k_La se han convertido en práctica estándar en el campo de las fermentaciones (Rodríguez & Orozco, 2015).

13. Justificación

En el presente trabajo se buscó reducir los costos de producción del P(3HB), a partir del establecimiento de una estrategia de escalamiento en cultivo lote alimentado utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*, sin comprometer la producción de P(3HB) reportada para esta cepa ($30 g L^{-1}$). También se buscó obtener una concentración de P(3HB) igual o mayor a $30 g L^{-1}$ utilizando como criterio de escalamiento la potencia volumétrica (P/V).

14. Hipótesis

En cultivos lote alimentado de *A. vinelandii* OPNA, se alcanzarán títulos de producción iguales o mayores a 30 g L⁻¹ de P(3HB) en fermentadores de 3 a 30 L utilizando un medio de cultivo con componentes industriales, tomando como criterio de escalamiento la P/V.

15. Objetivos

16.1 General:

- Establecer una estrategia de escalamiento en cultivos lote alimentado en fermentadores de 3 a 30 L, para la producción de P(3HB) empleando la cepa OPNA.

16.2 Específicos:

- Evaluar la producción y productividad de P(3HB) en medios con componentes grado industrial y analíticos a escala de matraces agitados.
- Evaluar la producción y productividad de P(3HB) utilizando como estrategia un cultivo lote alimentado, empleando un medio grado industrial a escala de 3 L.
- Evaluar la producción y productividad de P(3HB) en cultivo lote alimentado y tomando como criterio de escalamiento la potencia volumétrica (P/V) a escala de 30 L.

16. Estrategia experimental

Fase 1:
Cultivo en matraces

Selección del medio de cultivo

Condiciones del cultivo		
Medio de cultivo	Sacarosa	Ext. de levadura p.a.
		Ext. de levadura ind.
Vol. de llenado	100 mL	
Agitación	200 rpm	
Temperatura	29 °C	

Comparación de medios

Condiciones del cultivo		
Medio de cultivo	Sacarosa ind.	Ext. de levadura ind.
	Sacarosa p.a.	Ext. de levadura p.a.
Vol. de llenado	50 mL	
Agitación	200 rpm	
Temperatura	29 °C	

Fase 2: Cultivo en fermentadores de 3 L

Selección del criterio de escalamiento

- Determinación de los valores de la P/V para 500 y 700 rpm

Condiciones del cultivo	
Medio de cultivo	Sacarosa ind. y Ext. de levadura ind.
pH	7.2
Vol. de llenado	2 L
Agitación	500 y 700 rpm
Temperatura	29 °C

*Extracto de levadura seleccionado en la primera fase

Fase 3: Cultivo en fermentadores de 30 L

Escalamiento

Condiciones del cultivo	
Medio de cultivo	Sacarosa ind. y Ext. de levadura p.a.
pH	7.2
Vol. de llenado	20 L
Criterio de escalamiento	P/V (0.64 y 1.76 W L ⁻¹)
Temperatura	29 °C

Figura 6. Estrategia experimental desarrollada para el escalamiento de la producción de P(3HB) en la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

17.1 Cepa:

La cepa empleada en este estudio fue proporcionada por el laboratorio de la Dra. Guadalupe Espín (IBt-UNAM). La cepa OPNA de *A. vinelandii*, mutante derivada de la cepa OP, presenta dos mutaciones en los sistemas de regulación PTS^{Ntr} y RsmA/RsmZY, lo cual la hace una cepa sobreproductora de P(3HB), capaz de acumular hasta un 80 % en peso seco (Noguez *et al.*, 2008).

17.2 Preservación de la cepa

Se preparó un Stock en gliceroles al 30 % de la cepa OPNA, con la finalidad de mantener la misma cepa durante todos los experimentos, se mantuvo a 4 °C. Las cajas se sembraron a partir de gliceroles, 4 días previos de comenzar el trabajo experimental.

El presente proyecto se dividió en 3 fases:

17.3 Primera Fase: cultivo en matraces agitados

Selección del medio

Se realizó un pre-inóculo utilizando dos asadas con la cepa OPNA y se incubó durante 24 horas a una temperatura de 29 °C. Antes de inocular, se midió la turbidez del medio del cultivo, la cual fue de 0.13 ± 0.02 . El inóculo corresponde al 10 % del volumen del matraz.

El experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de trabajo de 100 mL. Se incubaron a una velocidad de 200 rpm durante 72 horas a 29 °C. El experimento se realizó por triplicado. Se realizaron muestreos cada 6 horas durante las primeras 24 horas, y cada 12 horas hasta el final de cultivo.

Se realizaron las siguientes pruebas fuera de línea:

- Cuantificación de biomasa por peso seco.
- Cuantificación de proteína por el método de Lowry *et al.*, (1951)
- Cuantificación de sacarosa por el método de DNS (Miller, 1959).
- Cuantificación de % de P(3HB), medido como ácido crotonico por HPLC (método modificado de Karr *et al.*, 1983).

La composición del medio mantuvo una relación C/N= 14 la cual se puede observar en la tabla 4. Para el extracto de levadura grado industrial utilizado se asumió que poseía la misma concentración de nitrógeno que el extracto de levadura analítico.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para la primera fase a escala de matraces conservando una relación C/N= 14.

Componente	Concentración g L ⁻¹	Medio 1	Medio 2
Sacarosa	20	X	X
Extracto de levadura p.a.	10	X	
Extracto de levadura industrial*	10		X

Comparación de medios analítico e industrial

Para evaluar el comportamiento de un medio analítico contra un medio industrial se realizó un experimento en matraces Erlenmeyer de 250 mL con una duración de 90 horas, a una velocidad de agitación de 200 rpm y un volumen de llenado de 50 mL. El experimento se realizó por duplicado, en una incubadora innova 4330, New Brunswick Scientific.

Se realizaron las pruebas fuera de línea mencionadas anteriormente, al final del cultivo.

En la siguiente tabla se muestra la composición de los medios utilizados;

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo utilizados para la comparación de medios en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio.

Componente	Concentración g L ⁻¹	Medio 1	Medio 2
Sacarosa p.a.	30	X	
Sacarosa ind.	30		X
Extracto de levadura p.a.	15	X	
Extracto de levadura ind.	15		X

17.4 Segunda fase: cultivo en fermentadores 3 L

Se prepararon dos inóculos en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de llenado de 100 mL, de 24 horas de crecimiento, utilizando la relación C/N=14 como se muestra en la Tabla 6. Antes de inocular se midió la turbidez del medio del cultivo, la cual fue de 0.13 ± 0.02 . El inóculo corresponde al 10 % del volumen del fermentador.

Tabla 6. Medio utilizado en fermentadores de 3 L con una relación C/N=14

Componente	Concentración g L ⁻¹
Sacarosa ind.	30
Extracto de levadura ind.	15

Se utilizó un fermentador Applikon de 3 L con volumen de trabajo de 2 L, equipado con 2 impulsores. El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH el cual se mantuvo en un valor de 7.2, mediante la adición automática de NaOH (2N) y HCl (2N). Se controló la espuma adicionando antiespumante silicona al 10 % p/v. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se determinó mediante un electrodo polarográfico de oxígeno. La TOD no se controló. El cultivo lote se realizó a una temperatura de 29 °C, un flujo de 1 vvm, pH 7.2 y una agitación constante de 500

rpm (0.64 W L^{-1}) hasta la adición del primer pulso de alimentación, donde se aumentó la velocidad de agitación a 700 rpm (1.76 W L^{-1}), hasta finalizar el cultivo a las 56 horas. La toma de muestra se realizó cada 4 horas.

Al término del cultivo se realizaron las pruebas fuera de línea antes mencionadas.

17.5 Tercera fase: escalamiento en fermentadores 30 L

Para inocular el fermentador se prepararon dos inóculos en matraces Fernbach de 2.8 L con un volumen de llenado de 1 L, con 24 horas de crecimiento, utilizando la relación C/N=14 como se muestra en la Tabla 3. Antes de inocular, se midió la turbidez del medio del cultivo, la cual estuvo en 0.13 ± 0.02 . El inóculo corresponde al 10 % del volumen del fermentador.

Se utilizó un fermentador Sartorius de 30 L con volumen de trabajo de 20 L y 2 L de inóculo, equipado con 2 impulsores. El pH se midió en línea utilizando un electrodo de pH el cual se mantuvo en un valor de 7.2, mediante la adición automática de NaOH (6N) y HCl (3N). Se controló la espuma adicionando antiespumante silicona al 30 % (p/v). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se determinó mediante un electrodo polarográfico de oxígeno. El fermentador cuenta con un difusor de aire de 7 orificios, equipado con 3 impulsores con $D_i/D_T = 0.39 \text{ cm}$, la TOD no se controló. El cultivo lote se realizó a una temperatura de 29 °C, un flujo de 1 vvm, pH 7.2.

Se realizó el escalamiento tomando como criterio la potencia volumétrica, utilizando las correlaciones 1 y 2, donde se obtuvo como resultado una velocidad de agitación de 240 rpm en la etapa lote y 334 rpm para la etapa de alimentación, tomando como referencia la P/V obtenida a escala de 3 L.

El cultivo tuvo una duración de 56 horas y se tomó muestra cada 4 horas, al término del cultivo se realizaron las pruebas fuera de línea antes mencionadas.

17.6 Métodos analíticos

17.6.1 Cuantificación de proteína

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

Curva patrón: Se preparó una curva patrón con albúmina bovina (US biological) a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL (Fig. 7). La curva se realizó por duplicado de la siguiente manera: Se tomaron 200 μ L de la solución estándar y se añadió 1 mL de solución reactiva. La mezcla se agitó y se dejó reaccionar por 10 min. Posteriormente, se añadió 100 μ L de reactivo Folin (Sigma-Aldrich). Se agitó y se dejó reaccionar 30 min en oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia a 625 nm (espectrofotómetro Variant Cary 1E).

Preparación de muestras: Se tomó 1 mL de la muestra del caldo de cultivo y se centrifugó a 11,000 rpm durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y se re suspendió el pellet en 1 mL de agua MilliQ. Se hicieron diluciones dependiendo la concentración de la muestra. Se adicionó 1 mL de la solución reactiva, se agitó y se dejó reaccionar por 10 min. Posteriormente, se añadió 100 μ L de reactivo Folin. Se agitó y se dejó reaccionar 30 min en oscuridad. Finalmente, se centrifugó por 2 min a 11,000 rpm para eliminar restos celulares y se determinó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro contra un blanco constituido de la mezcla se reactivos utilizando como muestra agua MilliQ.

Soluciones: Se preparó una solución reactiva que está constituida de tres soluciones mezcladas en relación 98:1:1 mL para las soluciones A, B, C, respectivamente.

- Solución A: Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1N
- Solución B: Tartrato de sodio y potasio 2 %

- Solución C: CuSO₄ 1%
- Reactivo Folin: Se hizo una dilución 1:1 con agua destilada

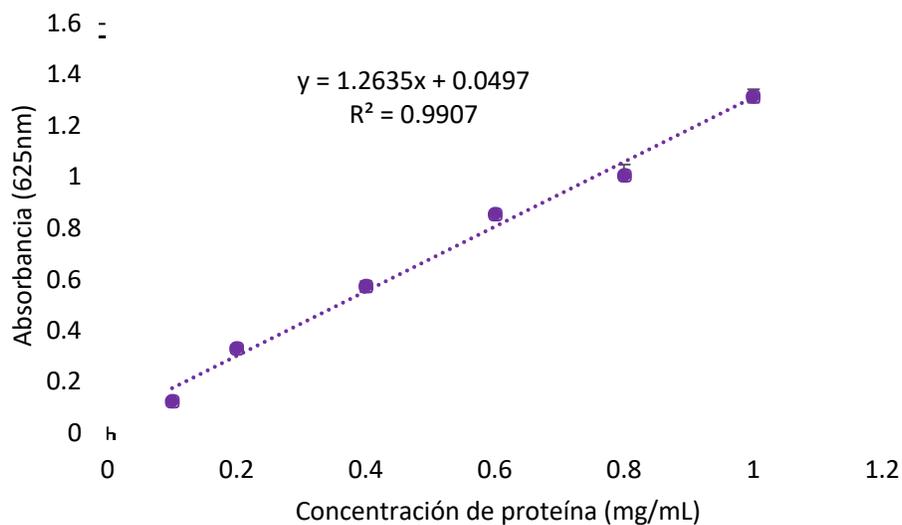


Figura 7. Curva estándar empleada para la cuantificación de la concentración de proteína.

Para realizar la cuantificación, se empleó la siguiente ecuación:

(4)

$$Proteína \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{Absorbancia - 0.0497}{1.2635} \right) * Dilución$$

17.6.2 Cuantificación de sacarosa residual

Se determinó espectrofotométricamente, utilizando el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich)(Miller, 1959). El método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando la enzima invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). En la reacción se forma un compuesto nitro-aminado (amarillo) cuya densidad óptica medida a 540 nm es proporcional a la concentración de los grupos reductores.

Curva patrón: Se realizó una curva de calibración utilizando sacarosa en concentraciones de 0.1 a 1.0 g/L (Fig. 8).

Preparación de muestras: Se tomó 1 mL de la muestra del caldo de cultivo y se centrifugó a 11,000 rpm durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se realizaron diluciones dependiendo de la concentración de sacarosa en la muestra. Se tomó 90 µL de muestra en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se mezcló con 10 µL de la solución enzimática. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente, se adicionaron 100 µL de la solución de DNS a cada muestra. Los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 5 min, enfriándolos posteriormente en baño de hielo- A cada tubo se le adicionaron 1 mL de agua MilliQ. Finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific) contra un blanco constituido de la mezcla de reactivos y utilizando como muestra agua MilliQ.

Soluciones:

· Solución de DNS: Se preparó disolviendo 16 g de NaOH y 300 g de tartrato de sodio y potasio en 800 mL de agua destilada. Con calentamiento suave de la solución se añadieron lentamente 16 g de DNS. Finalmente, la solución se aforó a 1 L con agua destilada.

: Buffer de citratos: Se disolvieron 0.197 g de ácido cítrico en 50 mL de agua destilada. De forma independiente se disolvieron 9.1g de citrato de sodio en 50 mL de agua destilada. Posteriormente se adicionó lentamente 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 (Bakers Yeast, Sigma-Aldrich) con 1 mL de buffer de citratos (0.035 M, pH 4.6). Se tomó 1 mL del caldo de fermentación y se realizó una dilución 1:10 – 1:30 con agua destilada, para obtener lecturas de absorbancia dentro del intervalo de linealidad de la curva estándar de sacarosa.

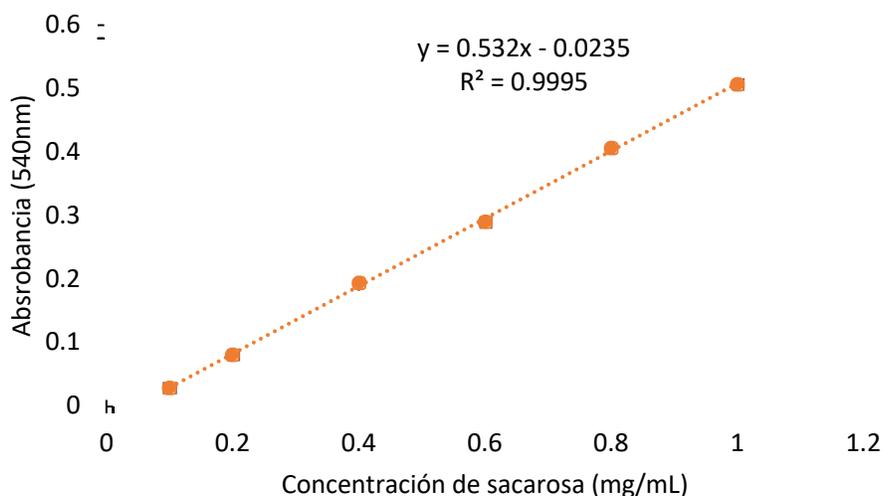


Figura 8. Curva estándar empleada para la cuantificación de la concentración de sacarosa residual.

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

(5)

$$\text{Sacarosa} \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia} + 0.0235}{0.532} \right) * \text{Dilución}$$

17.6.3 Cuantificación de P(3HB)

La cuantificación de P(3HB) se determinó mediante la conversión a ácido crotonico por tratamiento con H₂SO₄. Las muestras se analizaron por HPLC empleando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), utilizando como fase móvil H₂SO₄ 5 mM, un flujo de 0.65 mL/min y una temperatura de análisis de 50°C. El detector usado fue de arreglo de diodos (Waters 2994).

Se tomaron entre 2-5 mg de biomasa seca y se les adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se incubó a 90°C y 700 rpm durante 1 h. Las muestras se dejaron enfriar y posteriormente se realizó una dilución 1/50 con agua MilliQ y se inyectaron 20 µL de la muestra al HPLC. El área bajo la curva del cromatograma se cuantifico a 220 nm y se empleó la ecuación 6, obtenida de soluciones de P(3HB) comercial a concentraciones conocidas entre 0.01- 0.1 mg mL⁻¹ (Castillo *et al.*, 2017).

(6)

$$P(3HB) (\%) = \left[\frac{\left(\frac{\text{Área bajo la curva} + b}{m} \right) * \text{Dilución}}{\text{Biomasa utilizada}} \right] * 100$$

17.6.4 Determinación de biomasa por peso seco

La determinación de la concentración de biomasa se llevó a cabo mediante el método gravimétrico de peso seco. Para cada muestra se tomó una alícuota de 5 mL de caldo de cultivo y se centrifugo a 11,000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Eppendorf (modelo 5804). Se separó el sobrenadante y el paquete celular fue re suspendido con agua MilliQ y filtrado al vacío a través de membranas *Millipore* de 0.22 µm de tamaño de poro, previamente pesadas. Las membranas con las células 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.

17.7 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento

Los datos obtenidos experimentalmente de la cinética de crecimiento celular fueron descritos por la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (7)$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹) y X_{max} es la concentración máxima de biomasa (g L⁻¹). Integrando la ecuación 7, considerando que $X_0 = X(t=0)$ y redondeando los términos se obtiene la ecuación 8, la cual describe el crecimiento bacteriano en el tiempo.

$$X_{(t)} = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right) (1 - e^{\mu t})} \quad (8)$$

Reordenando términos, se obtiene

$$\mu t = -\ln \left[\left(\frac{X_{max}}{X_0} \right) - 1 \right] + \ln \left[\frac{\left(\frac{X_t}{X_{max}} \right)}{\left(1 - \left(\frac{X(t)}{X_{max}} \right) \right)} \right] \quad (9)$$

Al graficar $\ln \left[\left(\frac{X(t)}{X_{max}} \right) / \left(1 - \left(\frac{X(t)}{X_{max}} \right) \right) \right]$ contra el tiempo se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (representada por la pendiente del gráfico) para cada condición evaluada.

17. Resultados y Discusión

18.1 Cultivo en matraces agitados

En la primera fase, se evaluaron dos medios de cultivo con una relación Carbono-Nitrógeno 14 (C/N = 14) las cuales son referenciadas de la siguiente manera:

Tabla 7. Medio utilizado en matraces agitados con una relación C/N=14, utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

Medio	Sacarosa analítica (20 g L ⁻¹)	Ext. de levadura analítico (10 g L ⁻¹)	Ext. de levadura industrial (10 g L ⁻¹)
1	X	X	
2	X		X

En trabajos previos con la cepa OPNA de *A. vinelandii* modificando las relaciones Carbono-Nitrógeno, se demostró que la relación C/N = 14 con sacarosa y extracto de levadura es una relación óptima para obtener la mayor cantidad de P(3HB) (Sanguino, 2018). En el presente trabajo se tiene como principal objetivo el escalamiento, por ello se buscó utilizar una fuente de carbono de menor costo (componentes grado industriales).

En la figura 9 se muestran las cinéticas de crecimiento y consumo de sacarosa obtenidas en este experimento. Como se puede observar en la figura 9 (A), ambos medios de cultivos mantienen una tendencia similar, lo que sugiere que el uso de un compuesto grado industrial, como lo es el extracto de levadura no parece afectar el crecimiento en términos de biomasa, ya que al final del cultivo se obtuvo una producción volumétrica de biomasa de 9 g L⁻¹ para ambos cultivos. En la figura 9 (B) se presenta el consumo de sacarosa para ambos medios evaluados. En ambos casos se consumió completamente la sacarosa inicial a las 72 horas, obteniéndose un rendimiento de 0.46 g_{bio}/g_{sac} (con base en la biomasa total).

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de un componente grado industrial como lo es el extracto de levadura, no afecta el crecimiento, ni el consumo de la fuente de carbono.

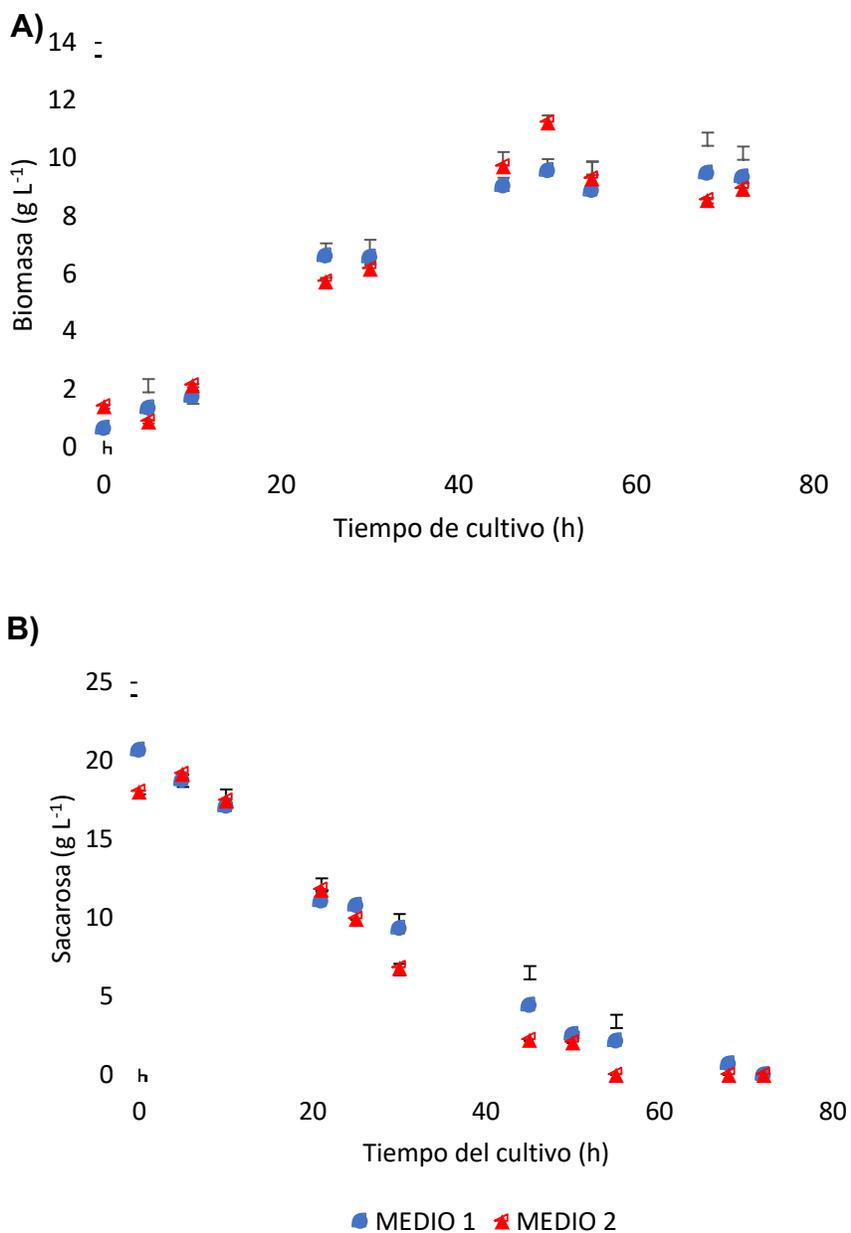


Figura 9. Cinética de crecimiento en biomasa **(A)** y de consumo de sacarosa **(B)**, de los cultivos en matraces agitados utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

Para el cultivo realizado en matraces agitados también se determinó el porcentaje de acumulación y la concentración de P(3HB) como se muestra en la figura 10. De acuerdo con la acumulación de P(3HB) medida como porcentaje de biomasa total obtenida en el cultivo (figura 10 (A)), se obtuvo un valor promedio en la etapa de alimentación de $71.4 \pm 7.3 \%$, para el medio 1, y un valor promedio en la etapa de alimentación de $70.7 \pm 12.2 \%$ para el medio 2. Estos resultados indican que no hubo diferencias significativas en la acumulación, ya que fue mayor al 70 % en ambos medios, esto concuerda con los valores previamente reportados para la cepa OPNA (García, 2014; Castillo *et al.*, 2017; Sanguino, 2018).

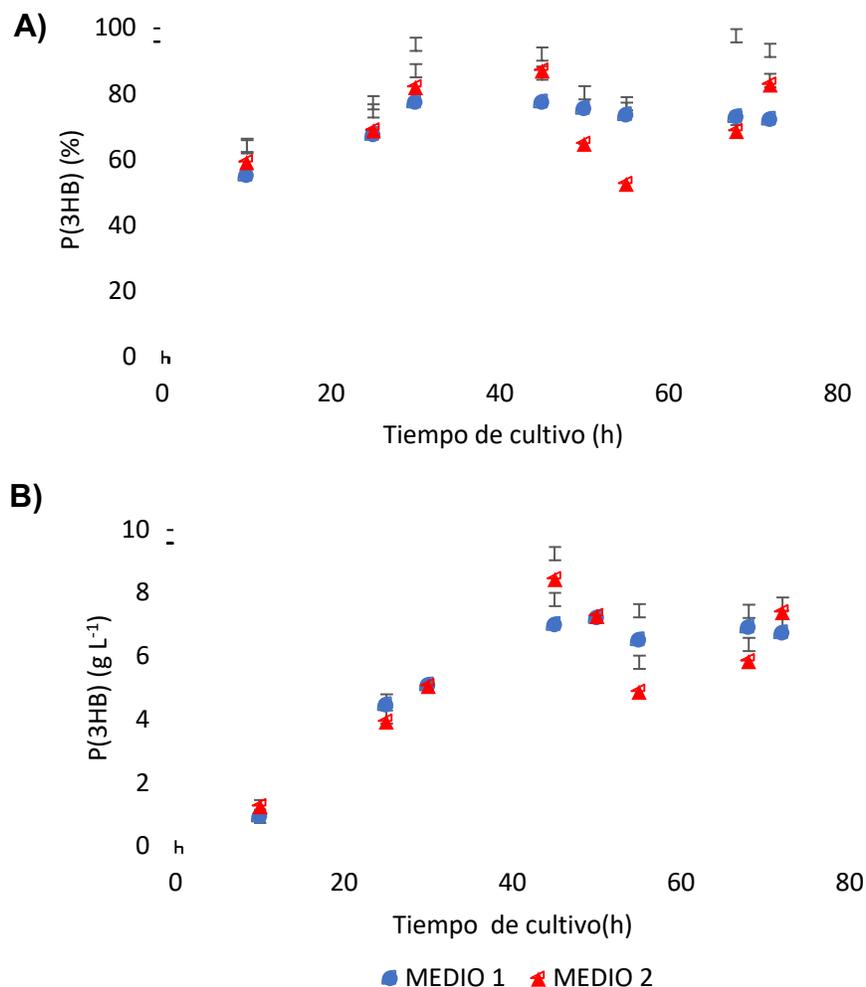


Figura 10. Cinética de acumulación medida como porcentaje de la biomasa total (A) y concentración (B) de P(3HB) con la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

En cuanto a la concentración de P(3HB) (Fig. 10. (B)), a las 72 horas del cultivo se alcanzó una producción de 6.72 g L⁻¹ en el medio 1, esta concentración fue menor en comparación con el medio 2 donde se obtuvo un valor de 7.39 g L⁻¹

Realizando una comparación de ambos medios, dados los resultados obtenidos y presentados en este trabajo, se puede observar que el uso de extracto de levadura grado industrial en cultivos a matraces agitados no afecta el crecimiento celular y la producción de P(3HB) es 10 % mayor a la que se alcanza con el medio con extracto de levadura grado analítico.

Sin embargo, al buscar una reducción mayor de costos de producción, se decidió realizar un experimento en matraces agitados empleando como fuente de carbono sacarosa grado industrial, lo cual proporcionaría una reducción de costos de hasta un 97 %.

El experimento se realizó con el fin evaluar la concentración y acumulación de P(3HB) en presencia de un medio completamente industrial. El experimento se realizó a una concentración de 30 g L⁻¹ de sacarosa y 15 g L⁻¹ de extracto de levadura ya que, en la fase de 3 L, estas son las concentraciones establecidas.

Se evaluaron dos medios de cultivo con una relación Carbono-Nitrógeno 14 (C/N = 14) a los cuales se les referirá de la siguiente manera:

Tabla 8. Medio utilizado en matraces agitados con una relación C/N=14, utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

Medio	Sacarosa analítica (30 g L ⁻¹)	Sacarosa industrial (30 g L ⁻¹)	Ext. de levadura analítico (15 g L ⁻¹)	Ext. de levadura industrial (15 g L ⁻¹)
1	X		X	
2		X		X

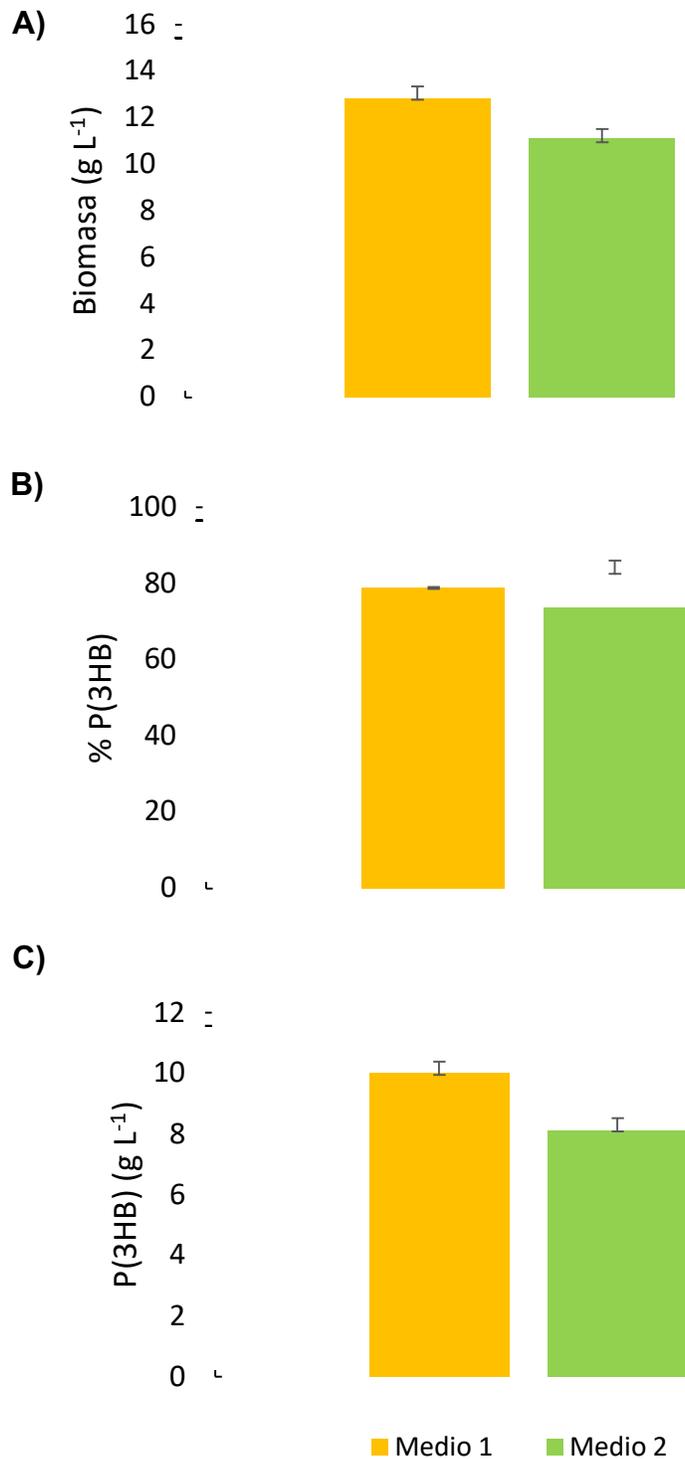


Figura 11. Concentración de biomasa máxima **(A)**, acumulación medida como porcentaje de la biomasa total **(B)** y concentración **(C)** de P(3HB) al final del cultivo, empleando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

En la figura 11 (A), se muestran los datos obtenidos de biomasa mediada como peso seco a las 90 h de cultivo (muestra final del cultivo), donde se observa que con el medio 1 (medio analítico) se alcanzó un valor de biomasa promedio de $12.8 \pm 0.51 \text{ g L}^{-1}$ en comparación con el medio 2 (medio industrial), el cual presentó un valor promedio de $11.1 \pm 0.42 \text{ g L}^{-1}$.

Sin embargo, en cuanto a la acumulación de P(3HB), ambos medios alcanzaron valores mayores del 70 %, y debido al error estándar, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 11. (B)). Finalmente, en cuanto a la concentración de P(3HB), se observa el mismo comportamiento que lo obtenido en la acumulación, para el medio 1, se obtuvo una concentración de $10 \pm 0.37 \text{ g L}^{-1}$ de P(3HB) y para el medio dos $8.1 \pm 1.67 \text{ g L}^{-1}$ (Fig. 11. (C)).

Como conclusión de este experimento se tiene, que es posible utilizar un medio grado industrial, ya que no afecta ni el porcentaje de acumulación, ni la concentración de P(3HB). Por lo que se decidió realizar la segunda fase de este proyecto, empleando un medio industrial en fermentadores de 3 L.

18.2 Cultivos en fermentadores de 3 L

En la segunda fase del proyecto, se llevaron a cabo los primeros cultivos a escala de 3 L. Se realizaron dos cultivos con medio industrial, utilizando como estrategia un cultivo lote con alimentación intermitente mediante dos pulsos de igual manera a una relación C/N =14. El tiempo de los cultivos fue de 56 horas.

La adición del primer pulso se realizó con el criterio de tener una concentración de sacarosa residual menor a 15 g L^{-1} . Por otro lado, se tomó como referencia el trabajo de Sanguino (2018) para la adición de dos pulsos de alimentación, donde se observó que la adición de tres pulsos disminuye la velocidad de crecimiento, el autor propone que con el exceso de nutrientes se podrían acumular productos

secundarios o residuales en el medio de cultivo, afectando algunas de las funciones metabólicas y por tanto el crecimiento celular.

El objetivo principal de este experimento fue observar el comportamiento del medio de cultivo a una escala de 3 L, así como realizar los cálculos de la P/V.

En la figura 12 se muestra el perfil de oxígeno disuelto durante el cultivo. Como se puede observar, los cultivos se encuentran limitados por oxígeno desde las 8 horas de la etapa lote, presentando valores de 0.64 ± 0.8 % de saturación de aire. Al realizar el primer pulso e incrementar la velocidad de agitación de 500 a 700 rpm, se observó un aumento ligero del porcentaje de saturación de aire, presentando valores de 3.26 ± 1.2 %.

Se sabe que en condiciones de limitación de oxígeno (valores menores al 4 % de TOD) la bacteria tiende a acumular una mayor cantidad de P(3HB); mientras que, en condiciones de no limitación de oxígeno (valores mayores a 4 % de TOD), *A. vinelandii* utiliza la fuente de carbono para la producción de biomasa (Sabra *et al.*, 1999).

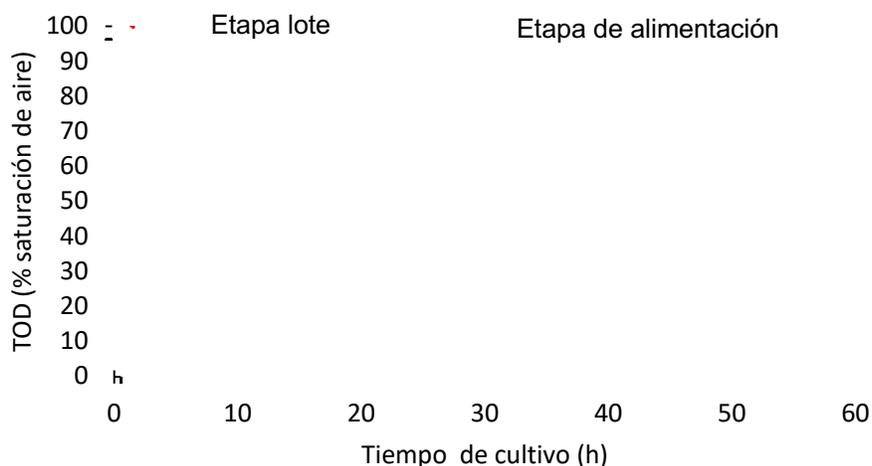


Figura 12. Perfil de oxígeno disuelto (TOD) en fermentador de 3 L, utilizando un medio de cultivo grado industrial para la cepa OPNA de *Azotobacter vinelandii*, la línea punteada separa la **etapa lote** y la **etapa de alimentación**.

En la figura 13 se muestran las cinéticas de crecimiento con base en biomasa, proteína y sacarosa. Las líneas punteadas indican el tiempo donde se realizó la alimentación. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) fueron calculadas con base a proteína. Se obtuvieron 3 μ , representando cada etapa.

En la figura 13 (A) se observa la cinética de crecimiento de biomasa obtenida para ambos cultivos. Como se puede observar en los dos cultivos se conservó una tendencia similar para la generación de biomasa en todas las etapas, lo que permite alcanzar concentraciones similares de biomasa en los últimos tiempos de cultivo, de tal forma que el cultivo R1 se obtuvo una concentración máxima de biomasa de 37 g L^{-1} y 36 g L^{-1} para el R2. Esto sigue y apoya los resultados a escala de matraces, que la utilización de un medio con componentes industriales no parece afectar el crecimiento en términos de biomasa.

Respecto a la cinética de crecimiento con base en proteína figura 13(B) se puede observar que las velocidades específicas de crecimiento guardan similitudes entre ambos reactores, observándose la siguiente tendencia: en la etapa lote ambos reactores presentan una μ de 0.13 h^{-1} para el R1 y 0.12 h^{-1} para el R2, los cuales son mayores que los valores reportados por Sanguino (2018) de $0.071 \pm 0.025 \text{ h}^{-1}$.

En la etapa de alimentación la velocidad específica de crecimiento disminuye en ambas etapas de alimentación (Pulso 1 y Pulso 2) presentando valores de 0.04 h^{-1} . Este comportamiento se ha reportado con anterioridad en otros trabajos (García, 2014; Page & Cornish, 1993; Sandoval, 2017; Sanguino, 2018) y sigue que la disminución de la velocidad específica está relacionada con la acumulación de compuestos provenientes de las células (debris celulares) así como del medio de cultivo agotado, lo cual podrían estar afectando el crecimiento celular.

En la figura 13 (C) se muestran las cinéticas de consumo de sacarosa, para cada una de las etapas se calcularon las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s). En la etapa lote se observa una velocidad de consumo específico mayor para

el cultivo R1, siendo de $0.41 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$; mientras que, el cultivo R2 presentó un valor de $0.24 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En la etapa del primer pulso se mantiene la diferencia en el consumo, obteniendo valores de $0.15 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el R1, y un valor de $0.08 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el R2. Sin embargo, para la etapa del pulso 2 la diferencia de la q_s disminuye presentando valores de $0.08 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el R1 y $0.05 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el R2.

Es importante destacar que la q_s se encuentra relacionada con la velocidad específica de crecimiento, y como resultado se obtienen una tendencia similar, en la etapa lote ambos valores resultan altos y posteriormente conforme avanza el cultivo la q_s y la velocidad de crecimiento disminuyen. Respecto al rendimiento calculado con base al sustrato ($Y_{p/s}$) se observa un aumento en las primeras dos etapas del cultivo (etapa lote y pulso 1) en el R2 en comparación con el R1. En la primera etapa se obtuvo un valor de $0.31 \text{ g}_P \text{ g}_s^{-1}$ para el R1; mientras que, para el R2 se obtuvieron $0.5 \text{ g}_P \text{ g}_s^{-1}$. Este comportamiento se sigue observando después del primer pulso de alimentación, donde se presentan valores de $0.24 \text{ g}_P \text{ g}_s^{-1}$ y $0.53 \text{ g}_P \text{ g}_s^{-1}$, presentando un rendimiento mayor el R2. Sin embargo, en la etapa final del cultivo no se observan diferencias, encontrando un valor de $0.5 \text{ g}_P \text{ g}_s^{-1}$ para ambos reactores.

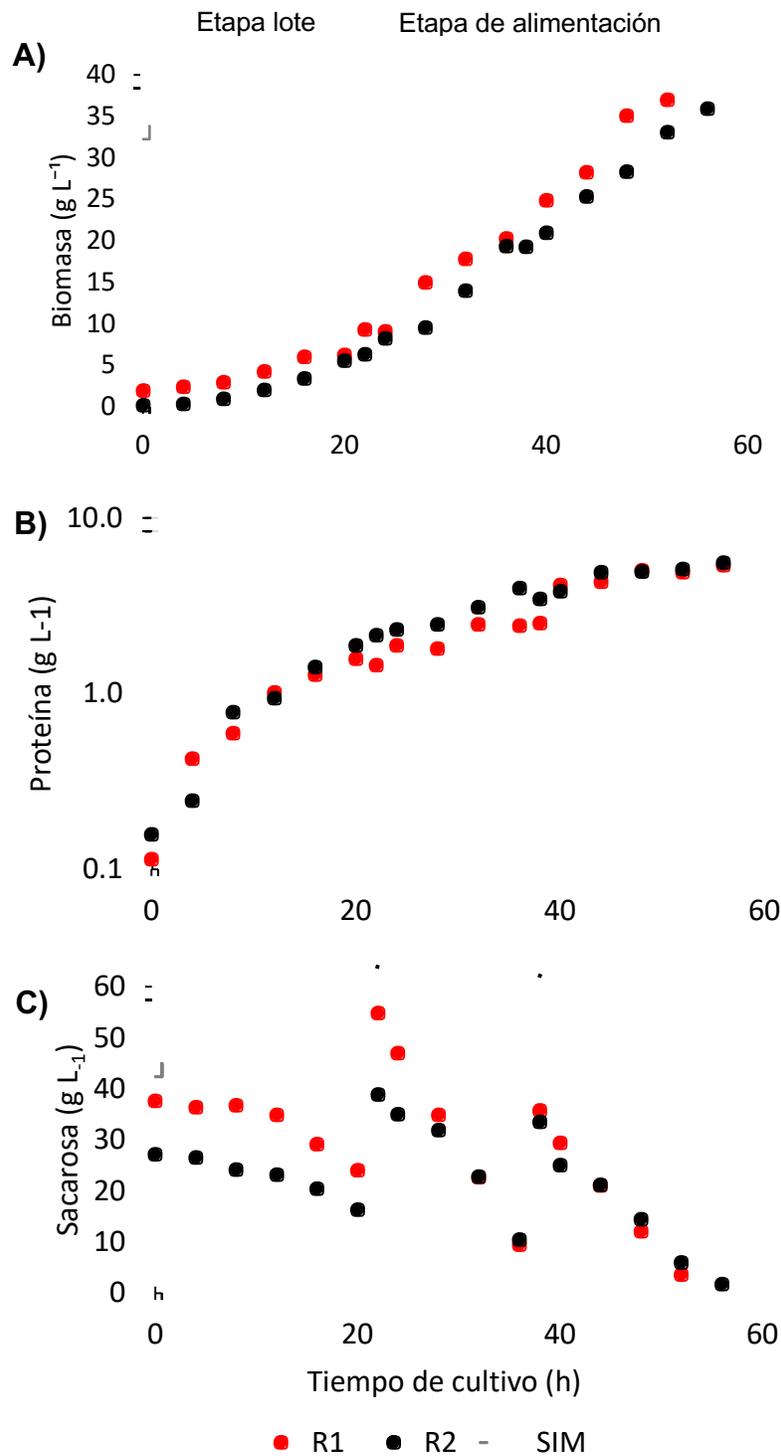


Figura 13. Cinética de crecimiento en biomasa **(A)**, de proteína total **(B)** y de consumo de sacarosa **(C)**, de los cultivos en fermentadores de 3 L utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*. En color rojo de muestra el reactor 1 (R1) y en color negro el reactor 2 (R2).

En la figura 14 se muestran las cinéticas de acumulación y concentración de P(3HB) obtenidas para ambos cultivos. En cuanto a la acumulación, medida como porcentaje de biomasa total, se puede observar después de las 28 h, y hasta el final del cultivo, el porcentaje de acumulación que de biopolímero es mayor al 70 %.

Respecto a la concentración de P(3HB), al final de los cultivos se obtuvo una concentración máxima de 29 g L⁻¹ para el R1 y 30 g L⁻¹ para el R2. Estos valores son 10 % inferiores a los reportados previamente por Sanguino (2018), de 33.6 g L⁻¹ de P(3HB); sin embargo, en este caso se alcanzaron con componentes de cultivo grado industrial. Existen trabajos en donde se buscó como objetivo, al igual que este trabajo, reducir los costos de producción buscando sustituir la fuente de carbono con compuestos agroindustriales donde se reporta una disminución de la concentración de P(3HB) de hasta en un 50 % (Sandoval, 2017).

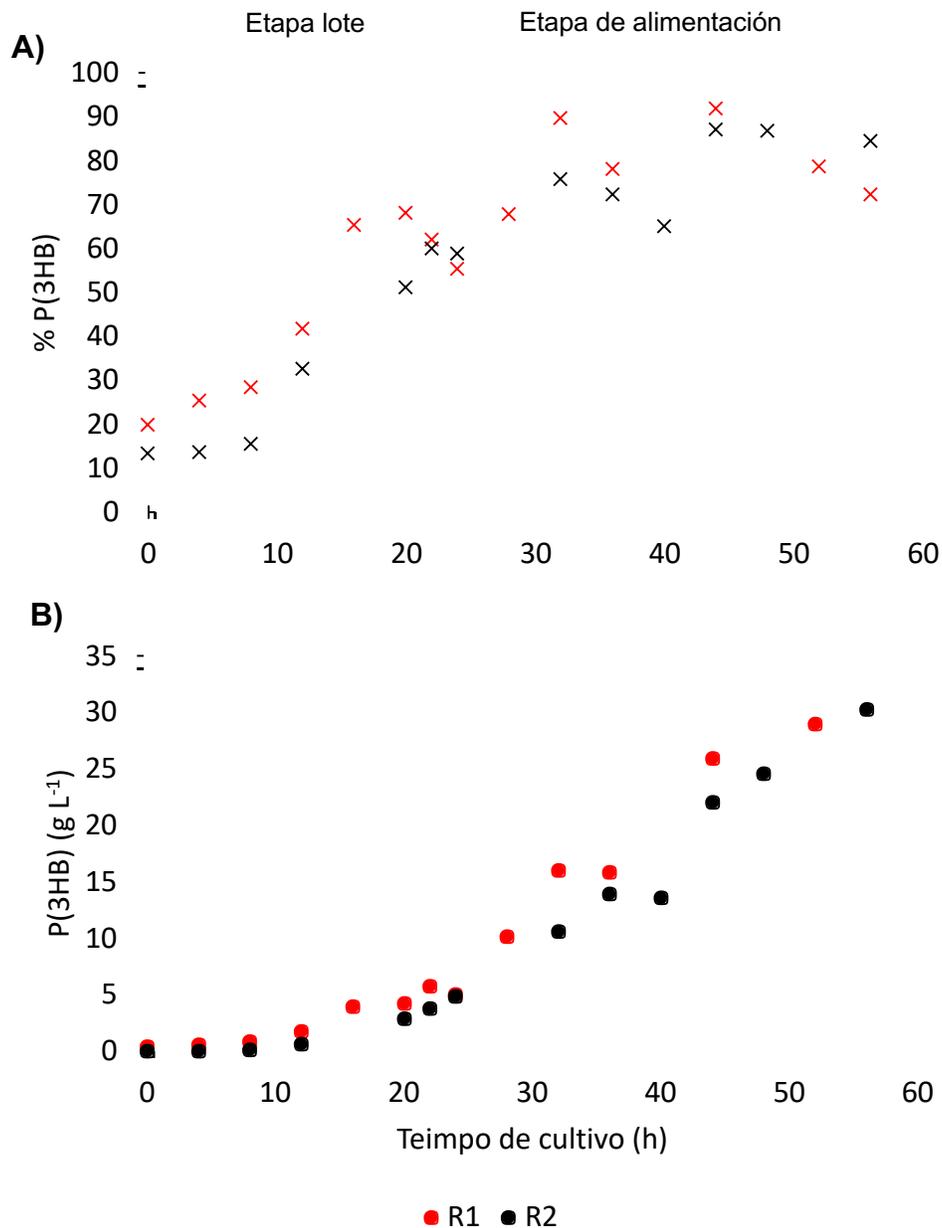


Figura 14. (A) Cinética de acumulación medida como porcentaje de la biomasa total y **(B)** concentración de P(3HB), de los cultivos en fermentadores de 3 L utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*

Si bien, no se alcanzaron resultados similares a los obtenidos por Sanguino (2018), estos resultados si son comparables con el trabajo de García (2014), donde se obtuvieron 30 g L⁻¹ de P(3HB). Además, estos cultivos cumplen con el objetivo de reducir los costos de producción incluso en un 97 %, utilizando un medio de cultivo grado industrial.

La productividad obtenida en ambos cultivos resulto ser más alta de lo ya reportado por Sanguino (2018), este autor obtuvo una productividad de $0.53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; mientras que, en promedio la productividad de ambos reactores fue de $0.55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esto se debe a que los cultivos realizados fueron 8 horas más cortos que los de Sanguino, y a la utilización dos pulsos de alimentación en lugar de tres.

En la tabla 9 se presenta un resumen de los valores de los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos en las diferentes etapas del cultivo; la etapa lote (del tiempo 0 – 16 h), la primera etapa de alimentación denominada primer pulso (del tiempo 22 – 36 h) y la segunda etapa de alimentación denominada pulso dos (del tiempo 38 – 56 h).

Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, en fermentadores de 3 L.

Etapa	R1			R2		
	Lote	Pulso 1	Pulso 2	Lote	Pulso 1	Pulso 2
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.13	0.04	0.04	0.12	0.04	0.03
$q_s \text{ (g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.41	0.15	0.08	0.24	0.08	0.05
$Y_{X/S} \text{ (g}_{\text{prot}} \text{ g}_s^{-1}\text{)}$	0.31	0.24	0.5	0.5	0.53	0.52
$Y_{P/S} \text{ (g}_P \text{ g}_s^{-1}\text{)}$	0.29	0.22	0.68	0.26	0.41	0.6
Productividad ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.56			0.54		

Finalmente, para dar por concluida esta fase, se realizó una comparación de los resultados obtenidos por Sanguino, (2018) en términos de la concentración de P(3HB) y los resultados obtenidos en este trabajo (figura 15), la adición de los pulsos en ambos trabajos se realizaron al mismo tiempo de cultivo, a la hora 22 para el primer pulso y a la hora 38 para el segundo pulso. El último pulso realizado por Sanguino fue a la hora 56.

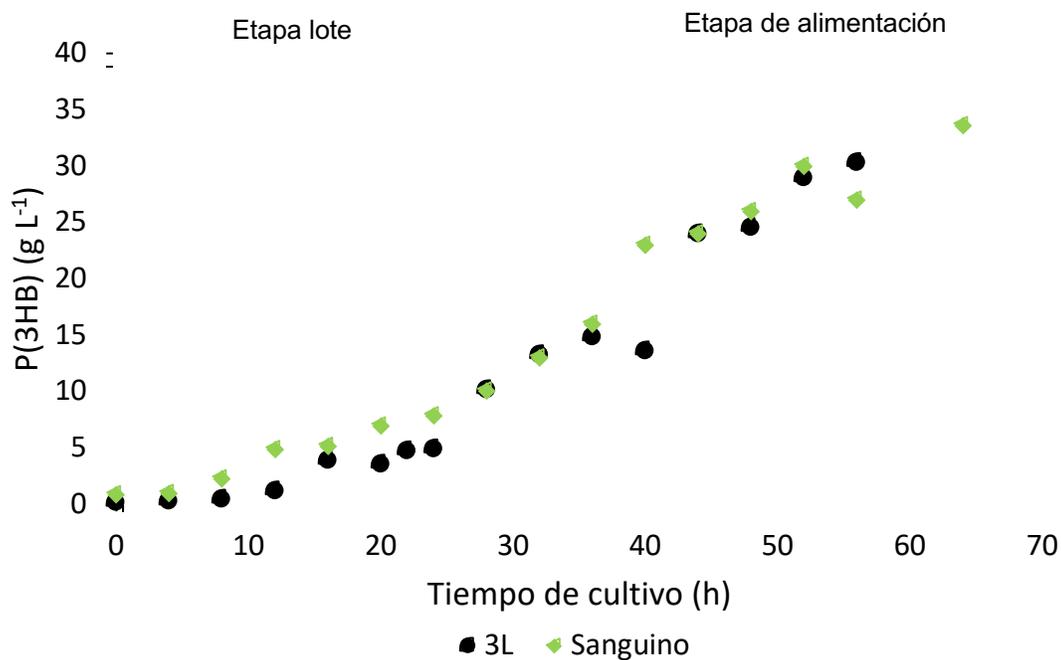


Figura 15. Comparación de las cinéticas de concentración de P(3HB), de los cultivos realizados en este trabajo (**3L**) y los resultados obtenidos por **Sanguino (2018)** en fermentadores de 3 L utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*

Como se puede observar en la figura 15, los cultivos resultan ser muy similares en términos de concentración de P(3HB), a pesar de la diferencia en el medio de cultivo, ya que uno es analítico y otro grado industrial. Dados estos resultados se observa que en esta etapa del proyecto el uso de un medio grado industrial no afecta la productividad ni la concentración de P(3HB) obtenida; por otro lado, una aportación nueva del trabajo es que la utilización de dos pulsos de alimentación, son suficientes para obtener una concentración cercana a los 30 g L⁻¹ de P(3HB).

18.2.1 Determinación de la P/V en fermentadores de 3 L

Para la estimación de la P/V se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 descritas con anterioridad. Se consideró un número de potencia (N_p) de 6 por cada turbina. La P/V se estimó para dos velocidades de agitación 500 y 700 rpm. Como resultado se obtuvo una P/V de 0.64 W L⁻¹ para 500 rpm, y un valor de 1.76 W L⁻¹ para 700 rpm.

Una vez estimados los valores iniciales de la P/V, se realizaron los cálculos para obtener las velocidades de agitación requeridas para el fermentador de 30 L. Como resultado se obtuvo una velocidad de 240 rpm para 0.64 W L^{-1} y 334 rpm para 1.76 W L^{-1} .

18.3 Cultivos en fermentadores de 30 L

Se realizó un cultivo en el fermentador de 30 L Sartorius, ubicado en la planta piloto del Instituto de Biotecnología-UNAM. Las condiciones operacionales de temperatura, flujo de aire y pH, se mantuvieron iguales que a escala de 3 L; al escoger como criterio de escalamiento la P/V se realizó únicamente la modificación de las velocidades de agitación antes descritas para igualar las P/V del reactor de 3 L. La alimentación se realizó a las 22 y 38 horas, guardando los tiempos establecidos en la fase anterior.

El objetivo principal de este experimento fue replicar el comportamiento observado a escala de 3 L en un fermentador de 30 L. Del experimento se presentan los perfiles de tensión de oxígeno disuelto (TOD), cinéticas crecimiento con base en biomasa, proteína y sacarosa, así como la acumulación y concentración de P(3HB). En la figura 16 se muestran el perfil de oxígeno obtenido en la cinética de cultivo utilizando un medio con componentes industriales.

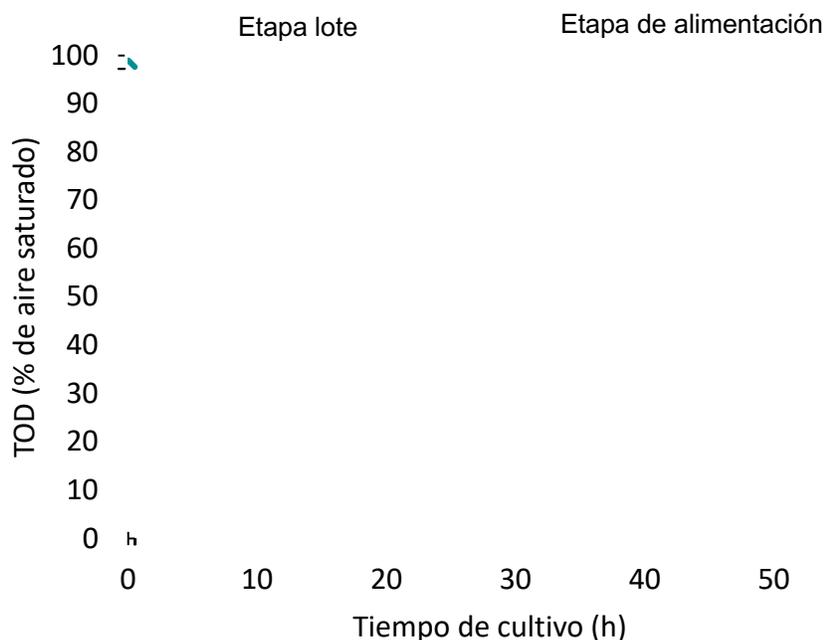


Figura 16. Perfil de oxígeno disuelto (TOD) en el fermentador de 30 L, utilizando un medio de cultivo sacarosa industrial y extracto de levadura analítico, para la cepa OPNA de *Azotobacter vinelandii*.

Como se puede observar en la figura 16, el cultivo se encontró limitado por oxígeno después de las 8 horas de cultivo, con valores cercanos a 0 % de saturación de aire. Este comportamiento es similar al observado en la etapa lote del reactor a escala de 3 L. La diferencia se observa en la etapa de alimentación cuando se hace la adición del primer pulso; en el fermentador a escala de 30 L no se observa un aumento en la TOD y el cultivo se queda limitado hasta el final. Por otro lado, en el cultivo a escala de 3 L, se muestra un aumento de la TOD. Lo que sugiere una menor concentración de biomasa respecto al cultivo a escala de 3 L.

En la figura 17 se muestran las cinéticas de crecimiento con base en biomasa, y proteína y de consumo de sacarosa. Las líneas punteadas indican el tiempo donde se realizó la alimentación. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) fueron obtenidas con base a proteína. Al igual que en el experimento anterior se obtuvieron tres velocidades específicas de crecimiento.

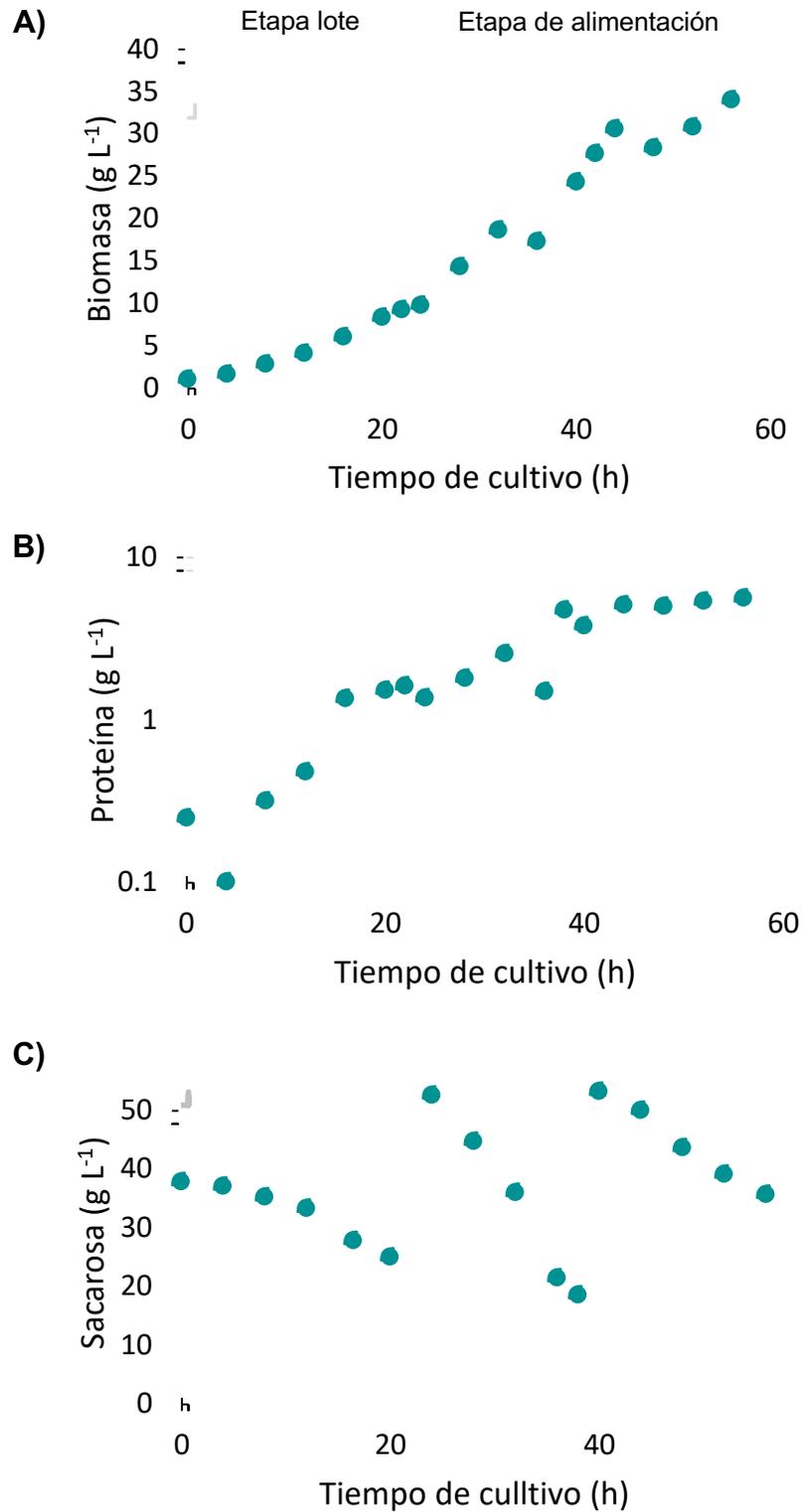


Figura 17. Cinética de crecimiento con base en biomasa **(A)**; de proteína total **(B)** y de consumo de sacarosa **(C)**, de los cultivos en fermentadores de 30 L utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

En la figura 17 (A) se observa la cinética de biomasa obtenida en el cultivo. Como se puede observar el cultivo mantiene una tendencia de crecimiento en las primeras dos etapas del cultivo; sin embargo, en la última etapa en la adición del segundo pulso de alimentación, parece disminuir el crecimiento que lleva el cultivo. Al final del cultivo se obtiene una concentración máxima de biomasa de 34 g L^{-1} . Comparando estos resultados con los obtenidos a escala de 3 L, se obtiene una menor concentración.

Respecto a la cinética de proteína figura 17 (B), se observa en la primera etapa una velocidad de crecimiento de tipo exponencial con una μ de 0.09 h^{-1} . En la primera etapa de alimentación la velocidad de crecimiento disminuye y se obtienen valores parecidos a los calculados en el biorreactor de 3 L. Sin embargo, al adicionar el segundo pulso de alimentación, la velocidad cae drásticamente presentando valores de 0.01 h^{-1} , esto lleva a pensar que la acumulación en los componentes contenidos en el medio se concentraron al realizar la adición del segundo pulso, causando un efecto negativo sobre el crecimiento.

En la figura 17 (C) se muestra la cinética de consumo de sacarosa. Para cada una de las etapas se calcularon las velocidades específicas de consumo (q_s). En la etapa lote se obtiene una q_s de $0.15 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que representa la mitad de lo obtenido a escala de 3 L; de la misma forma que en la cinética de crecimiento con base en biomasa las velocidades se igualan en la primera etapa de alimentación. Sin embargo; en la última etapa de alimentación el consumo presenta valores de $0.01 \text{ g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

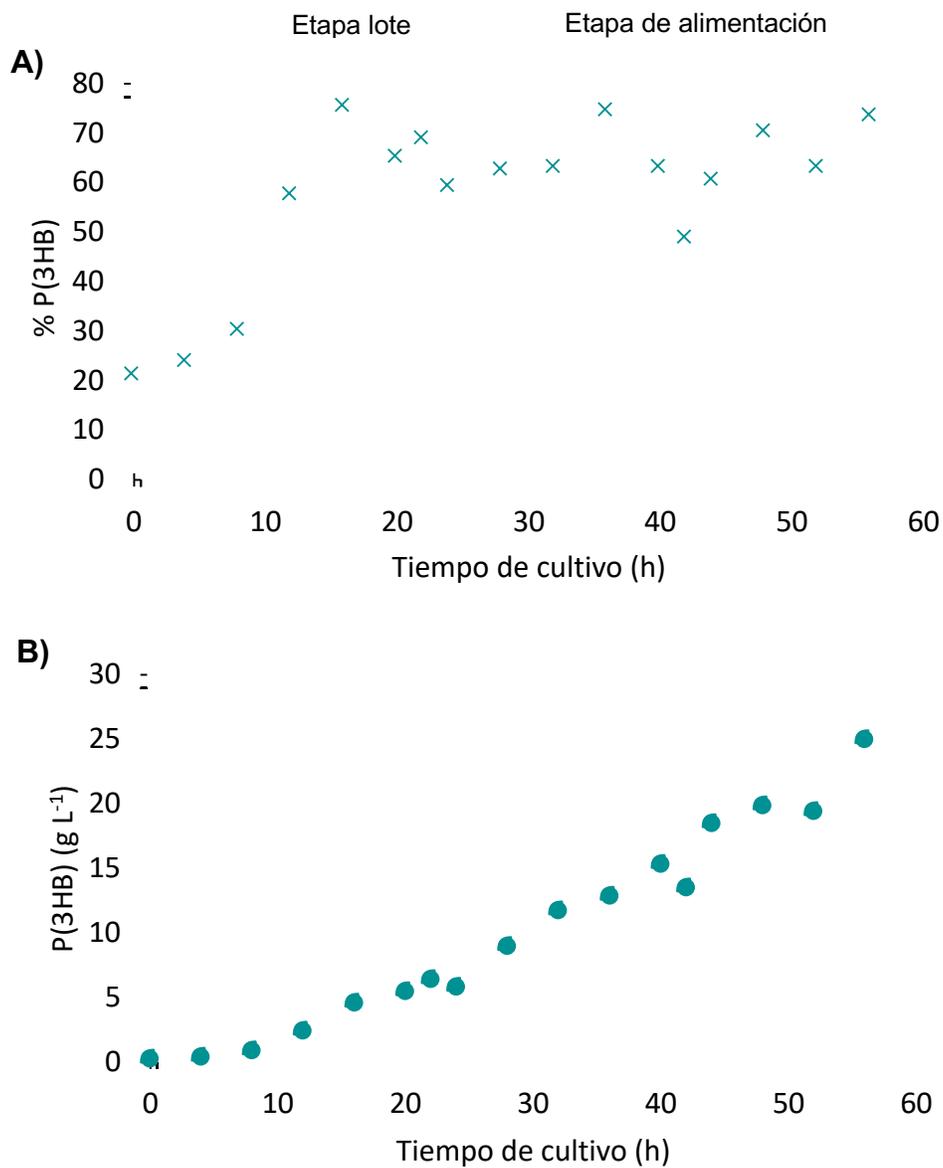


Figura 18. (A) Cinética de acumulación medida como porcentaje de la biomasa total y **(B)** concentración de P(3HB), de los cultivos en fermentadores de 3 L utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

En la figura 18 (A), se muestra la cinética de acumulación, medida como porcentaje de biomasa total obtenida en los fermentadores de 30 L. El porcentaje de acumulación en la etapa de alimentación fue mayor del 60 %, estos resultados representan valores menores respecto a lo reportado en 3 L. En cuanto a la concentración de P(3HB) obtenida se obtuvo un valor de 25 g L⁻¹. Esto es reflejo de la concentración de biomasa alcanzada y la acumulación del biopolímero, este

cultivo presentó una productividad de $0.44 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Es importante destacar, que como primer acercamiento de escalamiento si bien no se obtuvieron los 30 g L^{-1} de P(3HB) propuestos, la cantidad obtenida resulta ser óptima, ya que en este trabajo sólo se realizó un cultivo. Para comprobar esto se necesitaría realizar las replicas del experimento.

En la tabla 10 se muestra un resumen de los datos obtenidos a lo largo del cultivo.

Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa OPNA de *A. vinelandii*, en fermentadores de 30 L.

Reactor 30 L			
Etapa	Lote	Pulso 1	Pulso 2
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.09	0.04	0.01
$q_s \text{ (g}_s \text{ g}_{\text{prot}}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.15	0.15	0.01
$Y_{X/S} \text{ (g}_{\text{prot}} \text{ g}_s^{-1}\text{)}$	0.56	0.26	0.55
$Y_{P/S} \text{ (g}_P \text{ g}_s^{-1}\text{)}$	0.33	0.19	0.55
Productividad $\text{(g L}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$	0.44		

Finalmente, para dar por concluida esta etapa del proyecto, se realizó la comparación de los resultados obtenidos a escala de 3 L contra los resultados obtenidos a escala de 30 L. Para esto en la figura 14 se muestran las cinéticas de crecimiento como biomasa y concentración de P(3HB).

Como se puede observar en la figura 19 (A), el comportamiento de la biomasa sigue la misma tendencia en las dos primeras etapas del cultivo, posteriormente se observa una disminución en la última etapa que se ve reflejada en la biomasa final obtenida.

Respecto a las cinéticas de concentración de P(3HB) como se muestra en la figura 19 (B), ocurre lo mismo que en la biomasa; el cultivo es similar en las primeras dos

etapas, sin embargo, en la última etapa disminuye la concentración, lo que resulta en una disminución del 17 % de P(3HB)

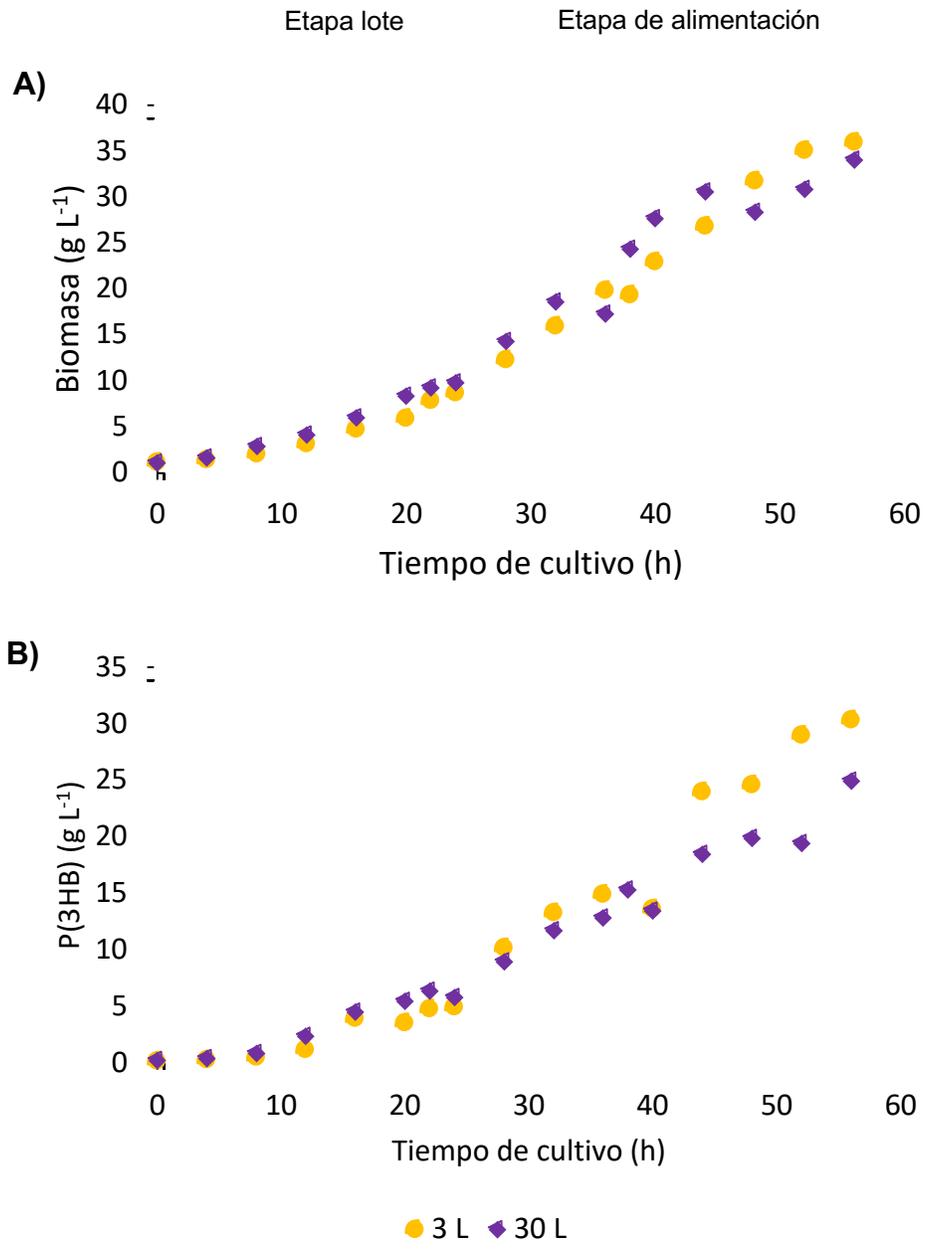


Figura 19. (A) Cinética de biomasa y (B) concentración de P(3HB), de los cultivos en fermentadores de 3 L y 30 L utilizando la cepa OPNA de *A. vinelandii*.

18. Conclusiones

- En cultivos realizados a nivel de matraces con la cepa OPNA de *A. vinelandii*, el uso de componentes grado industrial tanto el extracto de levadura o sacarosa no afecta el crecimiento celular ni la producción de P(3HB).
- En cultivos realizados a nivel de fermentadores de 3 L, se encontró que la implementación de una estrategia lote alimentado mediante la adición de dos pulsos, es suficiente para obtener una concentración máxima de 30 g L⁻¹ de P(3HB).
- En cultivos realizados a nivel de fermentadores de 3 L, se encontró que el uso de un medio de cultivo grado industrial permite obtener concentraciones de 30 g L⁻¹, además de reducir los costos de producción hasta en un 97 %, por lo que lo hace rentable a escala industrial.
- En cultivos realizados a nivel de fermentadores de 30 L, se encontró que el uso de la P/V como criterio de escalamiento, si bien no permite la obtención de 30 g L⁻¹ de P(3HB), incrementa su producción en un 32 %, en comparación con intentos previos de escalamiento (Obtenidos de acuerdo con Sandoval, 2017).

19. Perspectivas

- Debido a los valores de concentración de P(3HB) obtenidos, sería interesante determinar el peso molecular obtenido en el proceso, de esta manera se podría determinar sus propiedades y aplicación en los distintos sectores industriales.
- Continuar con los experimentos de escalamiento a escala de 30 L con el uso de otros criterios como el kLa o la potencia gaseada.

20. Referencias

- Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2002). *Archivos de ingeniería bioquímica. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica* (Ediciones). Santiago de Chile.
- Babel, W., & Steinbüchel, A. (2001). *Biopolyesters. Special issue of advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer-Verlag.
- Cao, W., Wang, A., Jing, D., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2005). Novel biodegradable films and scaffolds of chitosan blended with. *Journal of Biomaterials Science*, 16(11), 1379–1394.
- Castillo, T., Flores, C., Segura, D., Espín, G., Sanguino, J., Cabrera, E., Peña, C. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(7), 1809–1816.
- Chan, R., Russell, R., Marcal, H., Lee, T., Holden, P., & Foster, J. (2014). BioPEGylation of poly-hydroxybutyrate promotes nerve cell health and migration. *Biomacromolecules*, 15, 339–349.
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632.
- Chen, G., & Page, W. J. (1997). Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. *Biotechnology Techniques*, 11(5), 347–350.
- Chen, G. Q., & Wang, Y. (2013). Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, 31(5), 719–736.
- da Silva-Valenzuela, M. G., Wang, S. H., Wiebeck, H., & Valenzuela-Díaz, F. R. (2010). Nanocomposite Microcapsules from Powders of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Smectite Clays. *Materials Science Forum*, 660–661, 794–798.
- Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocursos*. España: Editorial Acriba, S.A.

- Errico, C., Bartoli, C., Chiellini, F., & Chiellini, E. (2009). Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10.
- Espín, G. (2002). Biología de *Azotobacter vinelandii*. *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, (35), 1–17.
- EuropeanPlastics. (2016). Plastics – The Facts 2017. An analysis of European plastics, demand and waste data.
- Fiho, L., Olyveira, G., Basmaji, P., & Manzine-Costa, L. (2013). Novel electrospun nanofibers/PHB scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Nanoscience Nanotechnology*, 13, 4715–4719.
- García Romero, A. (2014). *Producción de poli-β-hidroxibutirato en cultivos multietapas y en lote alimentado usando cepas mutantes de Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Gouveia, E. R., Baptista-neto, A., Bandino Jr, A., & Hokka, C. (2001). Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letter*, 23, 157–161.
- Hernandez-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by *PhbR* and *RpoS*. *Microbiology*, 157(11), 3014–3023.
- Hernández, J. (2007). *Identificación de genes de Azotobacter vinelandii cuyos productos interactúan con la proteína IIA Ntr*. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Karr, D., Waters, J., & Emerich, D. (1983). Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Applied Environmental Microbiology*, 46, 1339–1344.
- Khanna, S., & Srivastava, A. k. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(1), 607–619.
- Lim, H., & Shin, H. (2013). *Fed-Batch Cultures. Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors*.

- Lowry, O. H., Resebrought, N. J., Farr, L. A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.
- Maculla, E. S., & Cowles, P. B. (1948). The use of glycine in the disruption of bacterial cells. *Science*, *107*(2780), 376–377.
- Mendonca, R., de Oliveira, T., Ferreira de Costa, M., & Silva, R. (2013). Production of 3D scaffolds applied to tissue engineering using chitosan swelling as a porogenic agent. *Journal of Applied Polymer Science*, *129*, 614–625.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme INtr, NPr and IANtrare involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *15*(4), 244–254.
- Page, W. J., & Cornish, A. (1993). Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(12), 4236–4244.
- 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., López, S., García, A., Espín, G., Romo-Urbe, A., & Segura, D. (2014). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, *64*(1), 39–47.
- Ramier, J., Boudierlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., Grande, D. (2014). Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrospayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, *38*(1), 161–169.

- Ramírez, R. (2011). *Optimización de un medio de cultivo para la producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) utilizando cepas mutantes de Azotobacter vinelandii*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Ray, S., & Kalia, C. (2016). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, 57(3), 337–383.
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). International Biodeterioration & Biodegradation Polyhydroxyalkanoates : Characteristics , production , recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126(October 2017), 45–56.
- Rodríguez Monroy, M., & Orozco Sánchez, F. (2015). *Caracterización, operación y escalado de biorreactores*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
- Ryu, H. W., Cho, K. S., Goodrich, P. R., & Park, C. H. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD using swine wastewater: Effect of supplementing glucose, yeast extract, and inorganic salts. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(6), 651–658.
- Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K., & Chang, H. N. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(1), 28–32.
- Sabra, W., Zeng, A., Sabry, S., Omar, S., & Deckwer, W. (1999). Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometric of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 773–780.
- Sandoval Hernández, Y. B. (2017). *Escalamiento de un proceso fermentativo multietapa para la producción de polihidroxibutirato (PHB) empleando la cepa mutante Azotobacter vinelandii OPNA*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.
- Sanguino Teyer, J. (2018). *Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en cultivos alimentados utilizando la cepa mutante Azotobacter vinelandii OPNA*. Instituto de Biología UNAM.

- Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003). Encystment and alkyresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate. *Archives Microbiology*, 179, 437–443.
- Segura, D., & Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 414–418.
- Senior, P. J., & Dawes, E. a. (1973). The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *The Biochemical Journal*, 134(1), 225–238. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0354-1>
- Shishatskaya, E., Khilusov, I., & Volova, T. (2006). A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. *Journal Biomaterials Science Polymer Edition*, 17, 481–498.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 25(10), 1503–1555.
- Yang, X. (2010). Scale-Up of Microbial Fermentation Process. *American Society for Microbiology*, 47, 669–675. <https://doi.org/10.1128/9781555816827.ch47>